



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE RECURSOS NATURALES



Maestría en Ciencias en Ecología Integrativa

**PERMANENCIA DE INMUNO-TOLERANCIA INDUCIDA MEDIANTE
DESVIACIÓN INMUNITARIA ASOCIADA A LA CÁMARA
ANTERIOR DEL OJO EN RATAS WISTAR**

TESIS

PRESENTA:

ANA LAURA PELAYO GÓMEZ

Como requisito para obtener el título profesional de

MAESTRO EN CIENCIAS

Tutor de Tesis:

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

Co-Tutor de Tesis:

Dra. Alma Lilia Fuentes Farías

Morelia, Mich. Abril 2016

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con todo mi cariño a Dios por darme la vida y la oportunidad de llegar hasta este día y por permitirme realizarme.

A mis padres, que me han apoyado incondicionalmente siempre para superarme:

María Graciela Gómez Castillo y J. Jesús Pelayo Pelayo

A todos mis hermanos que me han ayudado y acompañado en mí caminar:

María Cristina Pelayo Gómez
Salvador Daniel Pelayo Gómez
José de Jesús Pelayo Gómez
Juan de Dios Pelayo Gómez
Emmanuel Pelayo Gómez
Lucy Amor Pelayo Gómez
Moisés David Pelayo Gómez
Diego Josafat Pelayo Gómez
Ángel Misael Pelayo Gómez

A mis sobrinos:

Yoshua Alexander Martínez Pelayo
Joseph Eli Martínez Pelayo

A mi amado Jorge Luis Gómez Villa

AGRADECIMIENTOS

Este logro es solo mérito de Dios y de las personas que me han amado, acompañado, cuidado, guiado y regañado para conseguir llegar aquí.

Agradezco infinitamente a Dios por los dones que me dio para que yo alcance mi ideal y sobre todo y el privilegio de tener personas tan buenas y amorosas a mi alrededor como también de poder hacer lo que amo, es debido a Él que tengo las capacidades necesarias para poder alcanzar este logro.

Agradezco con todo mi corazón a mi mamá por que ha dado todo para que alcancemos nuestros sueños, las palabras nunca podrán explicar el sacrificio ni la entrega que ha tenido por mí y cada uno de mis hermanos para que nos realicemos.

A mi papá por todo su amor y dedicación, por sus consejos y regaños y por todo su esfuerzo para que seamos mejores cada día que sin su ayuda, apoyo, compañía y consejo sería muy difícil su ayuda.

A mis hermanos por sus consejos y ayuda al estudiar, me facilitaron el aprendizaje además de hacer más amenas mis horas de estudio y principalmente por aguantarme.

A mi amado que me ha escuchado, acompañado y apoyado en este proceso, ha sido un gran soporte para mí.

A mis amigos y compañeros por todas las clases que compartimos y todas las horas que pasamos juntos que fueron muy gratas para mí.

A mis maestros y asesoras que me han enseñado que la educación debe ser integral, que me han hecho esforzarme y adquirir conocimiento que jamás imagine, que me han ayudado a adquirir el carácter necesario para enfrentar retos y problemas.

ÍNDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE.....	5
RESUMEN	8
Palabras clave	8
ABSTRACT	9
Key words.....	9
REFERENCIA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	13
CAPITULO II.....	13
FIGURAS	13
CAPITULO III.....	13
FIGURAS	13
TABLAS.....	13
CAPÍTULO I	14
INTRODUCCIÓN GENERAL	14
SISTEMA INMUNOLÓGICO Y RESPUESTA INFLAMATORIA	15
PRIVILEGIO INMUNOLÓGICO E INMUNO-TOLERANCIA.....	22
ENFERMEDADES CRÓNICO-INFLAMATORIAS	25
DESVIACIÓN INMUNITARIA ASOCIADA A LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO.....	26
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS PARTICULARES	30
LITERATURA CITADA	31
CAPÍTULO II.- Evaluación de la permanencia de la inmuno-tolerancia a albúmina de suero bovino, inducida mediante desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo en ratas Wistar	39

RESUMEN	40
Palabras clave:	40
ABSTRACT	41
Key words:.....	41
INTRODUCCIÓN	42
METODOLOGÍA.....	46
ANIMALES	46
INOCULACIÓN DEL ANTÍGENO EN LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO.....	46
PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETRASADO	46
EVALUACIÓN DE LA PERMANENCIA DE LA INMUNO-TOLERANCIA.....	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	54
LITERATURA CITADA	55
CAPÍTULO III.- Evaluación de la permanencia de inmuno-tolerancia a antígenos medulares inducida mediante desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo en ratas Wistar	
RESUMEN	60
Palabras clave:	61
ABSTRACT	61
Key words:.....	61
INTRODUCCIÓN	62
METODOLOGÍA.....	64
ANIMALES	64
DISEÑO EXPERIMENTAL	64
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.....	65
INOCULACIÓN DEL ANTÍGENO EN LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO.....	66
PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETRASADO	66
EVALUACIÓN DE LA PERMANENCIA DE LA INMUNO-TOLERANCIA.....	67

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE LAS RATAS	67
Medidas de masa corporal y evaluación de motilidad	67
Biometrías hemáticas	68
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
RESULTADOS	70
LAS PROTEÍNAS DERIVADAS DE TEJIDO MEDULAR SANO PRESENTAN ANTIGENICIDAD.....	70
INDUCCIÓN DE INMUNO-TOLERANCIA A AgN DERIVADOS DE TEJIDO SANO	71
PERMANENCIA DE INMUNO-TOLERANCIA A AgN A TRAVÉS DEL TIEMPO	72
ÍNDICES DEL ESTADO DE SALUD EN ANIMALES INMUNO-TOLERANTES	74
DISCUSIÓN	78
CONCLUSIONES	80
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES INTEGRADAS	81
LITERATURA CITADA	83
ANEXOS	90
Anexo 1.....	90
Anexo 2.....	90
Anexo 3.....	95

RESUMEN

El ojo es un órgano inmuno-privilegiado capaz de regular la respuesta inflamatoria para generar una tolerancia específica y sistémica para los antígenos que son inoculados en su interior. Esta capacidad puede ser aprovechada para modular la respuesta inmunológica en enfermedades degenerativas que cursen con inflamación crónica. Sin embargo, hasta el momento se desconoce: 1) el tiempo que permanece la inmuno-tolerancia inducida mediante esta vía tanto en individuos juveniles como en adultos y 2) si está relacionada con el número de determinantes antigénicos y su complejidad. En este contexto, este trabajo evaluó la permanencia de la inmuno-tolerancia a la albúmina de suero bovino (BSA) y a un coctel de antígenos derivados de tejido medular (antígenos neurales, AgN) durante ocho meses en ratas Wistar. Para llevar a cabo este trabajo, la BSA y los AgN fueron inoculados en la cámara anterior del ojo de ratas juveniles (30 días de edad) y adultas (2.5-4 meses de edad) para inducir tolerancia. La inducción y permanencia de la inmuno-tolerancia fue evaluada mediante pruebas de hipersensibilidad de tipo retrasado (HTR). El estado de salud de los animales fue monitoreado a través del peso corporal, pruebas de comportamiento para descartar encefalomiелitis experimental autoinmune y biometrías hemáticas. Nuestros resultados muestran: 1) que es posible inducir inmuno-tolerancia a la BSA y a los AgN en ratas juveniles y adultas con una sola inoculación; 2) que esta inmuno-tolerancia permanece al menos ocho meses en animales juveniles y adultos incluso después de varios retos; y 3) que la inmuno-tolerancia no genera cambios patológicos en la respuesta inmunológica a largo plazo. En conjunto, los resultados sugieren que la inmuno-tolerancia inducida por la inoculación de un antígeno (BSA) o un coctel (AgN) en la cámara anterior puede modular la respuesta inmunológica a largo plazo en enfermedades crónico-inflamatorias. Más aún, la inducción y permanencia de esta inmuno-tolerancia es independiente del número de determinantes antigénicos o su complejidad. Debido a que es igual de eficiente si es inducida en animales juveniles y adultos, podría ser empleada como estrategia preventiva o terapéutica.

Palabras clave: privilegio inmunológico, permanencia de inmuno-tolerancia.

ABSTRACT

The eye is an immune-privileged organ that regulates the inflammatory response to generate specific and systemic tolerance to antigens inoculated within it. This ability can be used to modulate the immune response in degenerative diseases that course with chronic inflammation. Nevertheless, several issues are unknown: 1) the time that the immune-tolerance induced by this route persists in juvenile and adult individuals and 2) whether it is related to the number of antigenic determinants and their complexity. In this context, the present study evaluated the permanence of immune-tolerance to bovine serum albumin (BSA) and a cocktail of antigens derived from spinal cord tissue (neural antigens, NAg) throughout eight months in Wistar rats. To achieve this, BSA and NAg were inoculated into the anterior chamber of the eye of juvenile (30 days old) and adult rats (2.5-4 months old) to induce tolerance. The induction and persistence of the immune-tolerance was evaluated by the delayed-type hypersensitivity (DTH) test. The health of animals was monitored via body weight, behavioral tests to discard experimental autoimmune encephalomyelitis and hematic biometry assays. Our results show that: 1) it is possible to induce immune-tolerance to BSA and NAg in juvenile and adult rats with one inoculation; 2) this immuno-tolerance remains for at least eight months when induced in juvenile and adult animals even after several challenges; and 3) this immuno-tolerance generates no pathological changes in the immune response over time. Together, the results suggest that the immune-tolerance induced by inoculation of one antigen (BSA) or several (NAg) into the anterior chamber is an efficient strategy to modulate for a long term the immune response in chronic-inflammatory diseases. Moreover, the induction and permanence of this immune tolerance is independent of the number of antigenic determinants. Furthermore, since it is equally efficient if induced in juvenile and adult animals, it could be used both as a preventive or therapeutic strategy.

Key words: immune privilege, permanence of immune-tolerance.

REFERENCIA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

Ab:	Anticuerpo o anticuerpos
Ag:	Antígeno
AgN:	Antígenos neurales
Ags:	Antígenos
BSA:	Albúmina de suero bovino
CA:	Cámara anterior
CHCM:	Concentración de hemoglobina corpuscular media
DAMPs:	Patrones moleculares asociados al daño
DIACA:	Desviación Inmunitaria Asociada a la Cámara Anterior
EAE:	Encefalomiелitis experimental autoinmune
Ed.:	Editorial
Edic.	Edición
ERI:	Eritrocitos o glóbulos rojos
ES:	Error estándar de la media (standard error of the mean)
Et al.:	(abreviatura latina) y otros o y los demás
FasL:	Ligando Fas
FcR:	Receptor Fc (Receptor de la porción Fc de inmunoglobulina)
Fig.:	Figura
Foxp3:	Factor de transcripción Forkhead/winged hélix
GPCRs:	Receptores acoplados a proteínas G
HCM:	Hemoglobina Corpuscular Media
Hct:	Hematocrito
HTR:	Hipersensibilidad de tipo retrasado
i.d.:	Intradérmica
i.p.:	Intraperitoneal
IDE:	Intervalo de Distribución de Eritrocitos, también llamada Amplitud de la Distribución Eritrocitaria (ADE)

IDP:	Inmunodeficiencias Primarias
IFN- γ :	Interferón gamma
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
ITregs:	Células T reguladoras inducibles
LEU:	Leucocitos
LPS:	Lipopolisacáridos
CMH:	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CMH -I:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
CMH -II:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
μ g:	Microgramo
min.:	Minutos
μ L:	Microlitro
mL:	Mililitro
MPV:	Volumen plaquetario medio
MPV:	Volumen plaquetario medio
NK:	Células asesinas naturales
nTregs:	Células T reguladoras tímicas o naturales
PAMPs:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCT:	Procalcitoninas
Pgs.:	Páginas
PLT:	Recuento de plaquetas
PRRS:	Receptores de reconocimiento de patrones intracelulares o expresados en la superficie
RBC:	Cuentas de glóbulos rojos
S.N.:	Sistema Nervioso Central
SI:	Sistema inmunológico
Tc:	Linfocitos citotóxicos

TCR:	Receptor de linfocitos T
TGF:	Factor de crecimiento transformante
Th:	Linfocitos T cooperadores
TLR:	Receptores se encuentran los tipo Toll
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
Tregs.:	Linfocitos T reguladores
VCM:	Volumen corpuscular medio (volumen promedio de los glóbulos rojos)
Vol.:	Volumen
VSG:	Velocidad de sedimentación globular

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

CAPITULO II

FIGURAS

Figura 2 1	49
Figura 2 2.....	50

CAPITULO III

FIGURAS

Figura 3 1	71
Figura 3 2.....	72
Figura 3 3.....	73
Figura 3 4.....	74
Figura 3 5.....	76
Figura 3 6.....	77

TABLAS

Tabla 1	65
Tabla 2	65
Tabla 3	66

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Existen tejidos inmuno-privilegiados como el ojo, el útero y los testículos, los cuales son capaces de regular la respuesta inflamatoria a fin de preservar sus funciones (1). En el ojo, esta forma de inmunidad privilegiada evita la inflamación y favorece la inmuno-tolerancia específica al antígeno (Ag) (2, 3). Así, ante una segunda exposición, el sistema inmunológico no desarrolla una respuesta de ataque contra ese Ag (1-5). El sistema nervioso central (SNC) también es un tejido inmuno-privilegiado capaz de modular activamente su respuesta inflamatoria bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, bajo condiciones traumáticas o infecciones que involucran el rompimiento masivo de las barreras que lo protegen, se altera el delicado equilibrio entre ambos sistemas (*i.e.* nervioso e inmunológico) y se desencadena una respuesta inflamatoria que incrementa la lesión del tejido nervioso (6, 7). Esta respuesta inflamatoria conduce al establecimiento de una patología autoinmune contra AgN (8, 9 y 10), siendo una de las principales limitantes para la reparación del SNC. Con el fin de explorar la factibilidad de la inducción de inmuno-tolerancia a los AgN como estrategia preventiva o terapéutica en enfermedades neurodegenerativas o traumáticas que cursan con inflamación crónica, el presente trabajo evaluó la permanencia en el tiempo del estado de inmuno-tolerancia a AgN en ratas de la cepa Wistar. Debido a que no existen trabajos en los que se haya estudiado la inducción y permanencia de la inmuno-tolerancia a un homogenado completo de Ag, en el presente trabajo se evaluó también la permanencia de inmuno-tolerancia a la proteína albúmina de suero bovino (BSA) como Ag control.

En este capítulo se abordará cómo responde el sistema inmunológico ante el daño y los eventos que ocurren durante la respuesta inflamatoria para poder enfatizar la importancia del inmuno-privilegio del ojo y las ventajas conferidas. En el capítulo 2 se presentan los resultados de la evaluación en el tiempo de la permanencia de inmuno-tolerancia a BSA y el capítulo 3 presenta la evaluación de la permanencia de inmuno-tolerancia a AgN.

SISTEMA INMUNOLÓGICO Y RESPUESTA INFLAMATORIA

El sistema inmunológico (SI) es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones causadas por bacterias, virus, parásitos, hongos, etc. A través de una reacción bien organizada, el cuerpo ataca y destruye a los organismos infecciosos que lo invaden. El SI también es el encargado de sentir cualquier tipo de daño y responder eficientemente para reparar la zona lesionada (i.e. daño causado por un traumatismo).

Los órganos del SI se dividen en dos: primarios (centrales) y secundarios (periféricos). Los primarios son la médula ósea y el timo. En estos órganos se generan, maduran y alcanzan la inmuno-competencia las diferentes poblaciones celulares. En la médula ósea se producen las células hematopoyéticas precursoras de las células sanguíneas y linfocitos (11 y 12), y en el timo maduran los linfocitos. Los órganos secundarios son el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos linfoides asociados a mucosas. En ellos se desencadena la respuesta inmunitaria humoral. En el primer contacto con un Ag (toda sustancia capaz de inducir una respuesta inmunitaria) determinado, se activan las células de respuesta del SI innato, en el segundo contacto con ese Ag la respuesta puede darse en otros puntos del organismo porque ya se estableció una memoria inmunológica que mantiene pequeñas poblaciones de

linfocitos circulantes en la periferia. Esta segunda respuesta del SI es más rápida y específica (11-13).

El sistema de defensa puede ser dividido en 3 niveles: (1) barreras fisiológicas y anatómicas; (2) respuesta inmunológica innata; y (3) respuesta inmunológica adaptativa. El incumplimiento de cualquiera de estos sistemas aumentará en gran medida la susceptibilidad a la infección (13).

1.- Barreras fisiológicas y anatómicas. Algunos ejemplos son: la piel sana que genera resistencia mecánica, el pH bajo de estómago y vagina, mecanismos de aclaramiento mucociliar (mecanismo de autolimpieza de la mucosa por medio de los cilios) y las lisozimas bacteriolíticas en lágrimas, saliva, entre otros. La extrema susceptibilidad a las infecciones observada en sujetos con severas quemaduras cutáneas, demuestra que el SI innato y el adaptativo no son capaces de compensar la protección que brindan las barreras anatómicas y fisiológicas.

2.- La respuesta inmunológica innata comúnmente denominada como inmunidad inespecífica se basa en un repertorio limitado de receptores para detectar patógenos invasores. Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés). Las células del SI innato que residen en los tejidos (*i.e.*, macrófagos, fibroblastos, células cebadas, y células dendríticas, así como leucocitos circulantes: monocitos y neutrófilos) reconocen a los DAMPs y los PAMPs mediante los receptores de reconocimiento de patrones intracelulares expresados en la superficie (PRRS, por sus siglas en inglés). Dentro de estos receptores se encuentran los tipo Toll (TLR, por

sus siglas en inglés), tipo RIG-I (RLRs, por sus siglas en inglés), de oligomerización de nucleótidos de dominio similar (NLRs por sus siglas en inglés), y los acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés), así como las selectinas e integrinas (14). La respuesta inmunológica innata comienza con la entrada del Ag y desencadena una respuesta inflamatoria para combatir la infección y/o lesión de los tejidos.

La velocidad es una característica definitoria del SI innato: a pocos minutos de exposición a agentes patógenos el SI comienza a generar una respuesta inflamatoria de protección. Las células hematopoyéticas que participan en la inmunidad innata incluyen a los macrófagos, las células dendríticas, los mastocitos, los neutrófilos, los eosinófilos, las células asesinas naturales (NK) y las células T NK. Estos últimos tipos celulares son capaces de establecer contacto y eliminar directamente a un Ag. Además de las células hematopoyéticas, la capacidad de respuesta inmunológica innata es una propiedad de la piel y las células epiteliales que recubren las vías respiratorias, gastrointestinales y el aparato genitourinario. Para aumentar estas defensas celulares, la respuesta inmunológica innata también tiene un componente humoral que incluye elementos bien caracterizados, tales como las proteínas del complemento (conjunto de moléculas plasmáticas implicadas en distintas cascadas bioquímicas, cuyas funciones son potenciar la respuesta inflamatoria, facilitar la fagocitosis y dirigir la lisis de células incluyendo la apoptosis), la proteína de unión a LPS, la proteína C reactiva y otras pentraxinas, colectinas, y péptidos antimicrobianos (incluyendo a las defensinas). En conjunto, los elementos del componente humoral actúan como antibióticos con actividad citolítica sobre los microorganismos invasores. Todos estos elementos son parte de un proceso conocido como inflamación (11-16).

La inflamación sigue las siguientes fases:

- a) Liberación de mediadores por el tejido lesionado: histamina, bradiquina, serotonina, prostaglandinas y leucotrienos.
- b) Vasodilatación: provoca incremento en la permeabilidad capilar de las células endoteliales que atraen a neutrófilos principalmente.
- c) Adhesión y rodamiento de leucocitos atraídos por quimiotaxis.
- d) Diapédesis: atraviesan la pared de los vasos capilares para llegar a la zona de lesión.
- e) Infiltración de células hematopoyéticas a zona de daño: neutrófilos, monocitos, linfocitos, etc.
- f) Activación de células: en esta fase se fagocitan o lisan los patógenos, los neutrófilos circulantes se convierten en macrófagos y se capturan los Ags liberados de los restos celulares.
- g) Producción y liberación de moléculas pro-inflamatorias: citocinas: moléculas de bajo peso molecular que contribuyen a la diferenciación y maduración de células del SI (12).

La respuesta inmunológica innata desempeña un papel central en la activación de la respuesta inmunológica adaptativa subsiguiente. La conexión entre la respuesta innata y adaptativa es llevada a cabo mediante las células dendríticas conocidas también como las células presentadoras de Ag profesionales (11, 14 y 16).

3.- La respuesta inmunológica adaptativa también tiene un componente humoral formado por anticuerpos (Abs, anticuerpo: Ab), y un componente celular que consta de dos poblaciones: los linfocitos T y B.

Linfocitos T

Los linfocitos T son los responsables de coordinar la respuesta inmunológica celular constituyendo el 70 % del total de los linfocitos que secretan citocinas. Estas células poseen un receptor especial en la superficie de la membrana, el receptor de linfocitos T (también llamado TCR). Los linfocitos T al ser activados por el Ag, secretan citocinas o citotoxinas. Así, en función de las moléculas que liberen los linfocitos T pueden ser cooperadores (Th), citotóxicos (Tc) y reguladores (Tregs). Los Th y Tc son los responsables de la inmunidad celular y actúan principalmente contra patógenos intracelulares, hongos y tumores. Los linfocitos Th expresan el receptor CD4 y se les denomina cooperadores por la ayuda que ejercen a través de las citocinas. Estos linfocitos se encargan de iniciar la cascada de la respuesta inmunológica mediante la interacción con el complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH-II). Cuando se activan, los linfocitos CD4+ se especializan, diferenciándose a su vez en linfocitos efectores.

De acuerdo a las citocinas secretadas se subdividen en:

- Th1. Estos linfocitos producen interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ) y migran a los tejidos infectados. Estas citocinas activan a los linfocitos NK y a los macrófagos, respectivamente, por lo que se reconocen como participantes en la respuesta celular. Son importantes en la defensa frente a los microorganismos intracelulares y la inflamación.
-
- Th17. Produce: IL-17, además de IL-22; son las principales mediadoras en algunas reacciones alérgicas.
- Th2. Estos linfocitos producen IL-4 (que estimula la secreción de Ig-E, que a su vez activa a los mastocitos), IL-5 (que activa a los eosinófilos), IL-6, IL-9 e IL-13 (que estimulan a

los linfocitos B e intervienen en la generación de Abs, por lo que se involucran en la respuesta humoral).

La diferenciación en Th1, Th2 o Th17 no es al azar, sino que depende de los estímulos que reciba el linfocito T virgen cuando contacte un Ag extraño.

Los linfocitos Tc expresan el receptor CD8 y se denominan citotóxicos por el daño que producen a través de las enzimas que secretan. Estos linfocitos inducen apoptosis celular y son los encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular, mediante la interacción con el CMH-I. Los linfocitos CD8+ reconocen a las células infectadas por el patógeno y las destruyen secretando una serie de moléculas (perforina, granzimas, FasL) que activan la apoptosis de la célula diana (17 y 18).

Los linfocitos Tregs tienen como función principal eliminar la inmunidad mediada por células al final de la reacción inmunológica y eliminar a las células T auto-reactivas que escaparon al proceso de selección negativa en el timo: uno de sus mecanismos es generar el estado de anergia (incapacidad de los linfocitos de reaccionar ante la presencia de un Ag) en la periferia. Datos recientes demuestran que las células Tregs son importantes en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica y la auto-tolerancia (19). Las células Tregs juegan un papel importante en el control de la respuesta inmunológica y pueden ser clasificadas en dos grupos principales: tímicas o naturales (nTregs) e inducibles (iTregs). Las nTregs se producen en el timo y están presentes en el torrente sanguíneo del huésped antes de la exposición a patógenos o daño. Las iTregs son aquellas células que adquieren una función reguladora en el contexto de una infección dada o un proceso neoplásico.

Las poblaciones de células iTregs incluyen:

- 1) células Treg 1 (Tr1) que secretan IL-10 y Factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (son CD4+CD25-);
- 2) células T auxiliares 3 (Th3) que secretan TGF- β (son CD4+CD25-),
- 3) células Tregs que secretan IL-10 y TGF- β (son CD4+CD25+Foxp3+) (20 y 23).

Las células iTregs se generan en la periferia y ejercen su actividad supresora principalmente mediante la producción de IL-10, IL-35, y TGF- β (21 y 22). Inicialmente, estas células son iTreg convencionales que expresan niveles bajos o nulos de CD25 (CD25^{low/-}) (25). La expresión de CD25 podría ser regulada de acuerdo a las condiciones ambientales (23-24). Por otro lado, la expresión de Foxp3 está regulada por las vías de señalización iniciadas por los TCR, moléculas coestimuladoras, IL-2R, el ligando de muerte programada 1 (PDL1), el receptor TGF- β y Notch. TGF- β promueve la inducción de las células Treg acompañada por un aumento en la expresión de Foxp3. En ratones, se ha demostrado que el TGF- β es capaz de convertir CD4 + CD25-Foxp3- no Tregs en CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg (26). Las células Tregs como células anti-inflamatorias clave, están implicadas críticamente en la limitación de la respuesta inflamatoria.

Linfocitos B

Los linfocitos B al ser activados por el Ag, se transforman en células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas (Ig) y son los responsables de la inmunidad humoral. Estas células actúan principalmente contra bacterias extracelulares. Existen 2 tipos: el B-1 que se origina en la etapa prenatal y tiene el marcador CD5. En el adulto se encuentra una escasa cantidad (menos del 5%) principalmente en peritoneo y secretan IgM, en ausencia de infección. Por su parte, el B-2 que se genera en la etapa postnatal, es el linfocito

predominante (95%) (25). Los linfocitos B adquieren receptores específicos para Ags (BCR) y pueden ser activados por el estímulo de un linfocito T o también por las células presentadoras de Ag sin ese estímulo.

Las Ig son proteínas que actúan como Abs. En general se usa el término Ig para expresar estructura y Ab para expresar función. La estructura básica de las Ig es una unidad formada por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Estas unidades contienen dominios variables y dominios constantes. Los dominios variables de las cadenas L y H son responsables de la unión al Ag, mientras que las regiones constantes de las cadenas pesadas son responsables de la activación del complemento y de la capacidad de algunas de estas unidades de formar polímeros. Existen cinco clases de Ig: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM.

La respuesta inmunológica adaptativa o adquirida comienza con la presentación del Ag y culmina con la producción de Abs (en caso de ser necesarios), por lo que está diseñada para resolver la inflamación. En principio, la inflamación es un mecanismo homeostático que se dispara para 1) eliminar los patógenos invasores o restos celulares provenientes de muerte celular y 2) promover la reparación tisular y la angiogénesis. Sin embargo, una inflamación crónica no resuelta puede evitar la reparación del tejido y extender la lesión hacia zonas aledañas sanas.

PRIVILEGIO INMUNOLÓGICO E INMUNO-TOLERANCIA

El daño producido por una inflamación pobremente resuelta puede tener consecuencias negativas en los tejidos con escasa capacidad para regenerar (*i.e.*, los ojos, las gónadas o el útero grávido), por lo que en estos tejidos existe un mecanismo denominado *privilegio inmunológico*. Así, el privilegio inmunológico puede ser definido como la capacidad que

tienen dichos tejidos para autorregular su respuesta inflamatoria a fin de preservar sus funciones. Las características del inmuno-privilegio son: poseer una barrera, no tener contacto con los ganglios linfáticos o una usencia de drenaje linfático, tener un ambiente inmuno-supresor (*i.e.*, ambiente rico en el ligando FAS: conduce a la apoptosis a las células que presentan este receptor, presenta inhibidores del complemento, etc.) e inmuno-modulador (*i.e.*, inducción de células Tregs). Este privilegio inmunológico es llevado a cabo a través del establecimiento de una inmuno-tolerancia específica de Ag (1).

Definimos la tolerancia inmunológica o inmuno-tolerancia como la respuesta de no reactividad hacia determinados Ags, ya sean propios o extraños, inducida por el contacto previo con dichos Ags. Se trata de un estado activo donde el sistema inmunológico responde a estos Ags (no es una simple ausencia de respuesta), dotado de especificidad hacia dichos Ags y de memoria que permite que permanezca por periodos prolongados de tiempo (27). Es por tanto un fenómeno inverso a la inmunidad, ya que la respuesta inflamatoria es atenuada. La tolerancia a auto-Ags se adquiere naturalmente a lo largo del desarrollo embrionario y en las primeras semanas de vida postnatal mientras los animales no tienen desarrollado el sistema inmunológico (8, 23, 27-30). Esta tolerancia inmunológica a los auto-Ags, se lleva a cabo mediante selección negativa, en la que todos los linfocitos reactivos para el CMH propio son eliminados por deleción clonal (27). Si algún linfocito auto-reactivo escapa de la selección negativa, éste se queda en la memoria inmunológica y ante una segunda exposición al Ag puede desencadenar una respuesta autoinmune (39, 49, 51-52). La inducción de tolerancia a Ag externos en esta etapa de la vida puede ser transitoria,

y dar como resultado una respuesta de inflamación muy agresiva después de la maduración del SI (27).

Además de la tolerancia natural que ocurre en etapas tempranas de la ontogenia, es posible inducir tolerancia experimentalmente a través de las vías: intravenosa, intrauterina y a través de las mucosas respiratorias, digestivas y oculares a lo largo de la vida. Cada vía es activada por diferentes señales químicas (como citocinas y quimiocinas) que son liberadas en un principio por las células presentadoras de Ags (i.e. macrófagos y células dendríticas; 23, 27-41). En el caso de la vía intravenosa, la citocina más importante es la IL-12. En el caso de la vía intrauterina las citocinas liberadas son TGF- β e IL-6 (41). Para el caso de las mucosas es más sencillo inducir la tolerancia, ya que existe un contacto directo y constante con Ags (35). En la tolerancia por vía nasal, la producción de citocinas es de tipo Th2 (IL 4, IL5, IL13). Estas citocinas generan un balance Th2/Th1, lo que conlleva a una tolerancia parcial (40). Para la tolerancia oral se secretan las citocinas IL-10 e IL-4 propias de la respuesta tipo Th2, por lo que solo se suprime la respuesta inflamatoria de tipo Th1. Para lograr la permanencia del estado de inmuno-tolerancia inducida se requiere que el Ag persista (32).

La tolerancia evita una respuesta auto-reactiva a los Ags propios y ocurre de forma natural en el huésped. En los órganos inmuno-privilegiados es más fácil que se desencadene una respuesta de tolerancia específica de Ag porque poseen un ambiente rico en citocinas que la favorecen. Se pueden aprovechar de las ventajas que ofrecen los órganos inmuno-privilegiados para inducir tolerancia experimental a los Ags deseados como una forma de protección contra respuestas de inflamación crónica.

ENFERMEDADES CRÓNICO-INFLAMATORIAS

Existe una amplia gama de enfermedades que presentan cuadros de inflamación crónica (53). Estos eventos inflamatorios constantes pueden ser causados por inadecuados mecanismos de reparación (*i.e.*, infecciones mal tratadas, lesiones constantes en los tejidos, exposición constante de autoantígenos por causa de patógenos), por ciertos medicamentos (*i.e.*, procainamida, hidralazina, etc), por falta de reconocimiento a lo propio (autoinmunidad) o por una respuesta exacerbada e inapropiada ante un Ag (53-55). Las enfermedades que cursan con inflamación crónica son principalmente de tipo autoinmune y/o degenerativo. Un elemento fundamental de las enfermedades autoinmunes, es el rompimiento de la tolerancia a los Ags propios. Esta alteración ocurre cuando las células del SI confunden a las células normales con agentes dañinos y las atacan, por lo que una de las consecuencias de esta disfunción es la producción de autoanticuerpos que reaccionan hacia una gran variedad de proteínas propias (54-55). Las enfermedades autoinmunes más comunes son: enfermedad de Graves, enfermedad intestinal inflamatoria, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis, diabetes tipo 1 y colitis ulcerativa (55-58). Dentro de las enfermedades degenerativas se encuentran las del SNC. *Las enfermedades neurodegenerativas se definen como cualquier disfunción cognitiva y/o motora asociada con la pérdida progresiva de neuronas en el SNC* (57). Estas enfermedades se caracterizan por presentar eventos destructivos secundarios que pueden afectar a células que no habían sido dañadas por la lesión primaria (59). Una gran cantidad de estudios destacan el efecto detrimental que una respuesta inflamatoria crónica tiene tanto para el establecimiento como para la progresión de numerosas enfermedades

neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (59-62).

DESVIACIÓN INMUNITARIA ASOCIADA A LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO

El ojo se considera un órgano inmuno-privilegiado y comprende un conjunto de procesos celulares y moleculares muy complejos que controlan la inflamación para prevenir el daño. Las características del inmuno-privilegio del ojo incluyen: 1) barrera hematorretinal; 2) ausencia de drenaje linfático en la cámara anterior (CA); 3) humor acuoso rico en el ligando FAS, en inhibidores del complemento y TGF- β ; 4) capacidad para inducir Tregs (1-3, 13, 42-43). Esta respuesta es principalmente desarrollada por la inmunidad adaptativa donde participan las poblaciones de las Tregs que inhiben los procesos inflamatorios generando tolerancia a los Ag que penetren en la CA (1). Esta inmuno-tolerancia es sistémica y específica de Ag y se lleva a cabo a través de un mecanismo denominado desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior (DIACA). El fenómeno de DIACA favorece la inmuno-tolerancia de Ag al suprimir la respuesta de las células T efectoras Th1 y Th2 e incrementar la acción de las células Tregs (2 y 3). Esta respuesta lleva una serie de procesos bien organizados que explicaré a continuación. El humor acuoso rico en el ligando FAS induce a las células que tienen este receptor entren en apoptosis si llegaran a infiltrarse en este medio. La captura del Ag comienza cuando un entra en la CA, este es fagocitado por los macrófagos residentes F4/80+ (células presentadoras de Ag no profesionales), por la acción de TGF- β los macrófagos oculares están programados para inducir simultáneamente la regulación positiva de IL-10 y la regulación negativa de IL-12, posteriormente migran al timo través a través de la malla trabecular hacia el torrente sanguíneo. En el timo las

F4/80+ inducen la generación de células CD4-, CD8-, NK1.1+T y en el bazo MIP-2 (un quimioattractante de células D4+NKT), interactúan con los linfocitos T, NKT provenientes del timo y linfocitos B de la zona marginal del bazo para inducir la producción de las células Tregs específicas de Ag, las cuales limitan la respuesta inmunológica Th1 y Th2 tanto local como sistémicamente (1, 42 y 43). Las F4/80+ también secretan TGF- β tanto en el timo como en el bazo, que conlleva al desarrollo de las células T reguladoras aferentes (CD4+CD25+) y eferentes (CD8+CD25+). Las aferentes inhiben la respuesta inmunológica en la etapa de sensibilización, mientras que las eferentes inhiben la respuesta de hipersensibilidad de tipo retrasado (HTR) (1). También favorece la producción de IL-10 que regula a la baja la producción de un gran número de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, INF- γ y TNF- α (44). Todo está perfectamente organizado para culminar en la generación de la tolerancia inmunológica sistémica y específica llevando a cabo una respuesta anti-inflamatoria (1, 4-5, 7, 45 y 46).

DIACA COMO UNA ESTRATEGIA POTENCIAL PARA INMUNO-MODULAR LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Tomando en consideración que la respuesta inflamatoria asociada a cualquier patología es bifuncional (genera efectos positivos que favorecen la homeostasis y la reparación tisular, pero también efectos negativos si no se resuelve adecuadamente), es nuestro principal interés desarrollar una estrategia de inmuno-modulación que instruya al sistema inmunológico de ratas a tolerar a AgNs evitando las fases de inflamación descontrolada. Un elemento fundamental para garantizar la posible eficacia de este tratamiento es el mantenimiento de la inmuno-tolerancia a lo largo de la vida del animal. Varios estudios en

los que se genera una inmuno-tolerancia específica y sistémica a Ags han sido desarrollados en roedores (50, 63-64). Estos estudios han destacado la relevancia de la inducción en etapas tempranas de la vida, en tanto los animales con un sistema inmunológico inmaduro parecen requerir concentraciones menores de Ag y un menor número de aplicaciones para mantener el estado de inmuno-tolerancia durante periodos más prolongados de tiempo (50). En contraposición, es más difícil inducir inmuno-tolerancia en adultos pues se requieren concentraciones más altas, mayor número de exposiciones y a menudo la tolerancia es parcial y decae en poco tiempo (50).

Hasta el momento la permanencia de la inmuno-tolerancia específica de Ag inducida mediante la inoculación de dicho Ag en la cámara anterior no ha sido evaluada, y frecuentemente se asume que es permanente. Por ello, la presente propuesta tiene como objetivo general, evaluar la permanencia de la inmuno-tolerancia específica para: 1) BSA, proteína capaz de desencadenar una respuesta antigénica y 2) para un coctel de proteínas derivadas de tejido medular de ratas de la misma cepa, durante el primer año post-inducción en ratas hembra de la cepa Wistar. Debido a que ha sido ampliamente reportado que la inducción de inmuno-tolerancia a través de la inoculación del Ag en la cámara anterior del ojo inhibe la respuesta Th1, en este trabajo evaluaremos su permanencia mediante la inflamación en oreja en pruebas de HTR. Durante la evaluación completa del experimento se tomarán medidas de condición como masa corporal y se realizarán tests de motilidad para descartar el establecimiento de patología autoinmune (51 y 52).

HIPÓTESIS

Las proteínas derivadas de médula espinal generan inmuno-tolerancia sistémica y permanente contra antígenos neurales al ser inoculadas en la cámara anterior del ojo en ratas Wistar

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la permanencia de inmuno-tolerancia sistémica inducida mediante DIACA en ratas hembra de la cepa Wistar.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la inducción de inmuno-tolerancia sistémica a BSA y su permanencia a lo largo de un año en ratas inmuno-tolerizadas en etapa juvenil
- Evaluar la inducción de inmuno-tolerancia sistémica a BSA y su permanencia a lo largo de un año en ratas inmuno-tolerizadas en etapa adulta
- Establecer la antigenicidad de proteínas neurales derivadas de la médula espinal de ratas adultas en condiciones basales
- Evaluar la inducción de inmuno-tolerancia sistémica a antígenos medulares y su permanencia a lo largo de un año

LITERATURA CITADA

1. Hori J. (2008). Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *Joculbiol dis inform*, 1:94–100.
2. Strelein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. *Journal of Leukocyte Biology Volumen 74*.
3. Forrester, J. V., Xu, H., Lambe, T., Cornall, R. (2008). Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol*, 1: 372.
4. Biros, Daniel. (2008). Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior. *Vet Clin Small Anim*, 38:309–321.
5. Cone R, Pais R. (2009). Anterior chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): An Acute Response to Ocular Insult protects from Future Immune-Mediated Damage?. *Ophthalmology and Eye Diseases*,1 33–40.
6. Argibay, P F. (2006). La regeneración del sistema nervioso central: Cambio de paradigma y medicina regenerativa. *Revista Química Viva- Numero 3, año 5*.
7. Bhowmick, S., Clark, R., Brocke, S., Cone, R. (2011). Antigen-specific splenic CD41 and CD81 regulatory T cells generated via the eye, suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase. *International Immunology*, Vol. 23, No. 2, pp. 119–128. Japanese Society for Immunology.
8. Landreth KS. (2002). Critical windows in development of the rodent immune system. *Human and Experimental Toxicology*, 21, 493-498.
9. McDonald J. (1999). Repairing the Damage Spinal Cord. The Consortium of the Christopher Reeve Paralysis Foundation. *Scientific American*, September, 1999.

10. Niederkorn, J. Y., Kaplan, H. J. (2007). Immune Response and the Eye. Chemical Immunology and Allergy. Editorial KARGER. Nueva York. Vol. 92.
11. Stuart E. Turvey. X. (2010). Innate Immunity. J Allergy Clin Immunol; 125(2 Suppl 2): S24–S32.
12. Gallin, JI; Goldstein, IM; Snyderman, R. (1988). Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Raven Press, New York.
13. Murphy, K. (2011). Janeway's Immunobiology. USA, editorial Garland Science, 8th Edition, 892 págs.
14. McDermott, A. M. (2007). Péptidos catiónicos antimicrobianos. ¿Una futura opción terapéutica? Arch Soc Esp Oftalmol vol.82 n.8.
15. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). «24. The Adaptive Immune System». Molecular Biology of the Cell (4th edición). New York: Garland Science.
16. Newton, K y Dixit, V. M. (2012). Signaling in Innate Immunity and Inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol;4:a006049.
17. LaRosa D, Orange J. (2008). Lymphocytes. J Allergy Clin Immunol; 121: 364-9.
18. Vega-Robledo, G. B. (2009). Linfocitos. Rev Fac Med UNAM Vol. 52 (6): 11-12.
19. Shevach, E. M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol. 2(6):389-400.
20. Hernández, A. S. (2009). Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. Reumatol Clin, 5 Supl 1:1-5 - Vol. 5.

21. Collison L W, Workman C J, Kuo T T, Boyd K, Wang Y, Vignali K M, Cross R, Sehy D, Blumberg R S, Vignali D A. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*; 450: 566-569.
22. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*; 21: 1105-1111.
23. O'Neill, E.J., Sundstedt, A., Mazza, G., Nicolson, K.S., Ponsford, M., Saurer, L., Streeter, H., Anderton, S. y Wraith, D.C. 2004. Natural and Induced Regulatory T Cells. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 1029, 180-192.
24. Zheng S G, Wang J H, Gray J D, Soucier H, Horwitz D A. (2004). Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol*; 172: 5213-5221.
25. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K J, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl S M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*; 198: 1875-1886.
26. Wan Y Y, Flavell R A. (2005). Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102:5126-5131.
27. Zouali M. (2001). Immunological Tolerance: Mechanisms. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group.*
28. Fujihashi, K., Dohi, T., Kweon, M.N., McGhee, J.R., Koga, T., Cooper, M.D., Tonegawa, S. y Kiyono, H. *Gammadelta.* (1999). T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int.Immunol.* 11, 1907-1916.

29. Li, W., Chou, S.T., Wang, C., Kuhr, C.S. y Perkins, J.D. (2004). Role of the liver in peripheral tolerance: induction through oral antigen feeding. *Am.J.Transplant.* 4, 1574-1582.
30. Mason, D., and F. Powrie. (1998). Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 10:6495.
31. Pabst, O., Bernhardt, G. y Forster, R. (2007). The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *Institute of Immunology, Journal of Leukocyte Biology.* 82 (10).
32. Ashour, H. M. (2015). Immune tolerance elicited via unique ocular and oral routes. *Current Mol Med.* 2015;15(1):78-81.
33. Fitzgerald, D. C., Zhang, G. X., Yu S., Cullimore, M. L., Zhao, Z., Rostami, A. (2012). Intravenous tolerance effectively overcomes enhanced pro-inflammatory responses and experimental autoimmune encephalomyelitis severity in the absence of IL-12 receptor signaling. *J Neuroimmunol.* Jun 15;247(1-2):32-7
34. Hoyne, G. F., Tan K, Corsin-Jimenez M., Wahl K, Stewart M., Howie S. E., Lamb J. R. (2000). Immunological tolerance to inhaled antigen. *Am J Respir Crit Care Med.* 11;162 (4 Pt 2):S169-74.
35. Mestecky, J., Russell, M. W. y Elson, Ch. O. (2007). Perspectives on Mucosal Vaccines: Is Mucosal Tolerance a Barrier? *The Journal of Immunology.* 179 (9): 5633-5638.
36. Miller, A., O. Lider, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and H. L. Weiner. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in

- vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:421–425.
37. Regueiro JR, López Larrea C. (1997). *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune* (2ª Ed). Madrid, Editorial Médica Panamericana.
38. Roitt I, Brostoff J, Male D. (1998). *Immunology* (5th Ed.). London, Mosby.
39. Safavi, F., Li, H., Gonnella, P., Rose Mari, E., Rasouli, J., Xian Zhang, G., Rostami, A. (2015). C-kit plays a critical role in induction of intravenous tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunologic Research*, Volume 61, Number 3, Page 294.
40. Sehrawat, S. y Rouse, B. T. 2011. Tregs and infections: on the potential value of modifying their function. *Journal of Leukocyte Biology*. 90 (6): 1079-1087.
41. Wambach CM, Patel SN, Kahn DA. (2014). Maternal and fetal factors that contribute to the localization of T regulatory cells during pregnancy. *American journal of reproductive immunology* (New York, NY : 1989). 71(5):391-400.
42. Wang Y., Goldschneider I., O'Rourke J., Cone, R. E. (2001). Blood mononuclear cells induce regulatory NK T thymocytes in anterior chamber-associated immune deviation. *J Leukoc Biol*. May;69(5):741-6.
43. Marinovic M A. (2010). *Inmunología ocular. I Rev. chil. reumatol.* 26(3):222-241.
44. D'Orazio TJ, Niederkorn JY. (1998). A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J Immunol*. 160: 2089–2098.

45. Niederkorn, J. H. (2009). Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert Rev ClinImmunol.* 2009 March; 5(2): 137–144. doi:10.1586/1744666X.5.2.137.
46. Niederkorn, J. Y., Kaplan, H. J. (2007). *Immune Response and the Eye. Chemical Immunology and Allergy. Editorial KARGER. Nueva York. Vol. 92. ISBN 978-3-8055-8187-5.*
47. Farooq S, Ashour H. (2013). Eye-Mediated Induction of Specific Immune Tolerance to Encephalitogenic Antigens. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19:503-510.
48. Farooq SM, Ashour HM. (2014). In vitro-induced cell-mediated immune deviation to encephalitogenic antigens. *Brain Behav Immun.* 1; 35:64-9.
49. Farooq SM, Kumar A, Ashour HM. (2014). Eye-mediated immune tolerance to Type II collagen in arthritis-prone strains of mice. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 18, No 12, pp. 2512-2518.
50. Siegris C-A. (2001). *Neonatal and early life vaccinology.* Elsevier Science Ltd. *Vaccine* 19:3331-3346.
51. Esposito M, Ruffini F, Bellone M, Gagliani N, Battaglia M, Martino G. (2010). Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. *J Neuroimmunol.* 220(1-2):52-63.
52. Peiris M, Monteith GR, RobertsThomson SJ, Cabot PJ. (2007). A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterization of intervention therapies. *J Neurosci Methods.* 163(2):245-54.

53. Cooper GS, Miller FW. (2007). Environmental influences on autoimmunity and autoimmune diseases. In: Luebke R, editor. Immunotoxicology and Immunopharmacology. New York: CRC Press. pp. 437–54.
54. Miller FW, Pollard KM, Parks CG, et al. (2012) Criteria for environmentally associated autoimmune diseases. *J Autoimmun* 39, 253–258.
55. Milgrom F, Wtebsky E. (1962). Autoantibodies and autoimmune diseases. *JAMA*, 181:706-716.
56. Moreno-Rodríguez J. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. México: Noriega UTEHA; 1996. p. 15-6.
57. Sánchez-Rodríguez, S., Barajas-Vásquez, G., Ramírez-Alvarado, E., Moreno-García, A., Barbosa-Cisneros, O. (2004). El fenómeno de autoinmunidad: enfermedades y antígenos relacionados. *Rev Biomed*, 15:49-55.
58. Chang C, Gershwin ME. (2011). Drug-induced lupus erythematosus. Incidence, management and prevention *Drug Safety (Drug Saf)* 5, 34 (5): 357-74.
59. Czai AJ. Autoimmune hepatitis. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ, eds. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2010:chap 88.
60. Guimarães, J., Freire, M., Lima, R., Souza-Rodrigues, R., Costa, A., dos Santos, C., Picanço-Diniz, C., Gomes-Leal, W. (2009). Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca. *Rev Neurol* 48 (06):304-310.

61. Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 810-20. 62.
62. Popovich PG, Jones TB. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 13-7. 63.
63. Kim YS, Joh TH. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med* 2006; 38: 333-47.
64. Bascom, R., Tao, K., Tollenaar, S., West, L. (2015). Imaging Tolerance Induction in the Classic Medawar Neonatal Mouse Model: Active Roles of Multiple F1-Donor Cell Types. *American Journal of Transplantation* 15: 2346–2363.
65. Scharschmidt T., Vasquez K., Truong H., Gearty S., Pauli M., Nosbaum A., Gratz I., Otto M., Moon J., Liese J., Abbas A., Fischbach M., Rosenblum M. (2015). A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. *Immunity* 17 (11); 43:1011.

CAPÍTULO II.- Evaluación de la permanencia de la inmunotolerancia a albúmina de suero bovino, inducida mediante desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del ojo en ratas Wistar

RESUMEN

El ojo es capaz de regular la respuesta inflamatoria activando una forma de tolerancia específica y sistémica para antígenos que son inoculados en su interior. Esta capacidad puede ser aprovechada para modular la respuesta inflamatoria en enfermedades degenerativas. Sin embargo, se desconoce el tiempo de permanencia de la inmunotolerancia y si ésta depende de la edad de inducción. El objetivo de este trabajo fue evaluar la permanencia de inmunotolerancia a albúmina de suero bovino (BSA) en individuos juveniles (1 mes post-natal) y adultos (2 ½ y 4 meses post-natales). Inoculamos BSA en la cámara anterior del ojo de estos dos grupos de animales y más tarde realizamos pruebas de hipersensibilidad de tipo retrasado para evaluar la inducción y permanencia de la inmunotolerancia sistémica y específica al antígeno a lo largo del tiempo. Nuestros resultados muestran: 1) que tanto ratas juveniles como adultas fueron tolerizadas a BSA con una sola inoculación del antígeno en la cámara posterior; 2) que este estado se mantuvo al menos hasta los ocho meses post-inducción en adultas ($F\alpha < 0.05$: 31.09, $p < 0.01$) y diez meses en juveniles ($F\alpha < 0.05$: 26.32, $p < 0.001$), incluso después de varias inmunizaciones. Así, es posible concluir que la inducción de inmunotolerancia mediante la inoculación de antígenos en la cámara anterior es una estrategia eficiente para atenuar la respuesta inflamatoria sistémica y específica de antígeno a largo plazo en ratas Wistar. Trabajos posteriores deberán evaluar si el estado de inmunotolerancia es permanente en ambos grupos de animales o decae con el tiempo.

Palabras clave: desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior, privilegio inmunológico, BSA.

ABSTRACT

The eye is capable of regulating the inflammatory response by activating a specific and systemic tolerance to antigens that are inoculated within it. This ability can be exploited to regulate the inflammatory response in degenerative diseases. However, the amount of time this state of immune-tolerance persists and whether its permanence depends on the age of induction is unknown to this date. Our aim was to evaluate the persistence of immune-tolerance to bovine serum albumin (BSA) in juvenile (1 post-natal month) and adult (2 1/2 or 4 post-natal months) individuals. BSA was inoculated in the anterior chamber of the eye in juvenile and adult animals. The animals were subsequently immunized with BSA to assess specific immune-tolerance to the antigen throughout time. Our results show that immune tolerance for BSA remained for at least eight months post-induction in adult rats ($F\alpha < 0.05$: 31.09, $p < 0.01$) and ten months in juvenile animals ($F\alpha < 0.05$: 26.32, $p < 0.001$), even after several challenges. Thus, the induction of tolerance by antigen inoculation into the anterior chamber of the eye is an efficient strategy to attenuate the systemic immune response specific to the antigen. Furthermore, this tolerance is maintained for a long period of time.

Key words: ACAID, BSA, immune-tolerance, BSA.

INTRODUCCIÓN

Existen tejidos immuno-privilegiados como el ojo, el útero y los testículos, los cuales son capaces de autorregular la respuesta inflamatoria a fin de preservar sus funciones (1). La ventaja evidente del privilegio inmunológico al organismo es que la respuesta inmunológica "normal" ante un patógeno esté tan atenuada, que los tejidos que no tienen capacidad para regenerar (i.e. la retina, el cerebro) estén protegidos del daño colateral (2-4).

El ojo es capaz de generar un estado de immuno-tolerancia específica y sistémica que comprende fases secuenciales en el timo y el bazo. Esta respuesta inicia cuando el antígeno (Ag; antígenos, Ags) soluble es captado por macrófagos que actúan como células presentadoras de Ag y lo llevan a través de la malla trabecular hacia el torrente sanguíneo, y después de un desvío hacia el timo terminan su viaje en el bazo (5). Dentro del bazo, los macrófagos interactúan con linfocitos T provenientes del timo, así como con linfocitos B de la zona marginal para inducir células T reguladoras específicas de Ag, las cuales limitan la respuesta inmunológica Th1 y Th2 tanto local como sistémica (1). Los macrófagos liberan citocinas como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β al bazo y al timo para favorecer el desarrollo de células T reguladoras aferentes CD4+ y eferentes CD8+. Las células aferentes inhiben la respuesta inmunológica en la etapa de sensibilización, mientras que las eferentes requieren de una exposición previa al Ag para inhibir la respuesta inflamatoria característica de la hipersensibilidad de tipo retrasado (HTR) (3). Las citocinas como TGF- β también contribuyen al mantenimiento de privilegio inmunológico debido a que inhiben directamente la producción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina (IL)-12, además de que inducen la producción preferente de IL-10. A su vez, IL-10 regula a

la baja la producción de un gran número de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , 6, 12, 18, interferón γ (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral α (FNT- α) (10). Al final, el humor acuoso, bazo, timo y las células del sistema inmunológico que de estas estructuras derivan favorecen la supresión de la respuesta tipo Th1 y Th2 y son absolutamente necesarias para la inducción de inmuno-tolerancia asociada al ojo (1-2, 6-9).

Un gran espectro de enfermedades degenerativas está asociado con inflamación crónica. Tal es el caso de patologías neurodegenerativas como la esclerosis amiotrófica lateral y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, así como de algunas otras patologías periféricas como osteoartritis y artritis reumatoide (9-12). En principio, la inflamación es un mecanismo homeostático que se dispara para 1) eliminar los patógenos invasores o restos celulares provenientes de muerte celular y 2) promover la reparación tisular y la angiogénesis. Sin embargo, una inflamación crónica no resuelta puede evitar la reparación del tejido y extender la lesión hacia zonas aledañas sanas. La inflamación crónica puede ser el resultado de mecanismos inadecuados de regulación y de la persistencia de proteínas antigénicas derivadas del tejido lesionado. En conjunto, estos mecanismos conducen al establecimiento de una respuesta autoinmune contra los propios constituyentes celulares que ahora son reconocidos como Ags. Esta respuesta de autoinmunidad es mediada por células del sistema inmunológico adaptativo (9, 15).

Tomando en consideración que la respuesta inflamatoria asociada a cualquier patología es bifuncional (genera efectos positivos que favorecen la homeostasis y la reparación tisular, pero también efectos negativos si no se resuelve adecuadamente), es nuestro principal interés desarrollar una estrategia de inmuno-modulación que instruya al sistema

inmunológico de ratas a tolerar a autoantígenos evitando las fases de inflamación descontrolada y el establecimiento de una patología autoinmune secundaria a la enfermedad neurodegenerativa. Un elemento fundamental para garantizar la posible eficacia de este tratamiento es el mantenimiento de la inmuno-tolerancia a lo largo de la vida del animal. Múltiples estudios en los que se genera una inmuno-tolerancia específica y sistémica a diversos Ags han sido desarrollados en roedores (10-12). Algunos de estos estudios han destacado la relevancia de la inducción en etapas tempranas de la vida, en tanto que los animales con un sistema inmunológico inmaduro parecen requerir concentraciones menores de Ag y un menor número de aplicaciones para mantener el estado de inmuno-tolerancia durante periodos más prolongados de tiempo (13). En contraposición, es más difícil inducir inmuno-tolerancia en adultos pues se requieren concentraciones más altas, mayor número de exposiciones y a menudo la tolerancia es parcial y decae en poco tiempo (14).

Hasta el momento la permanencia de la inmuno-tolerancia específica de Ag inducida mediante la inoculación de dicho Ag en la cámara anterior no ha sido evaluada, y frecuentemente se asume que es permanente. Por ello, la presente propuesta tiene como objetivo general evaluar la permanencia de la inmuno-tolerancia específica para BSA (proteína capaz de desencadenar una respuesta antigénica), durante el primer año post-inducción en ratas hembra juveniles y adultas de la cepa Wistar. Debido a que ha sido ampliamente reportado que la inducción de inmuno-tolerancia a través de la inoculación del Ag en la cámara anterior del ojo inhibe la respuesta Th1, en este trabajo inocularemos BSA en la cámara anterior del ojo de ratas juveniles y adultas con el fin de comparar el tiempo que permanece la inmuno-tolerancia inducida en diferentes etapas de la ontogenia en ratas

de la cepa Wistar. Posteriormente evaluaremos la inducción y permanencia de la inmunotolerancia específica para BSA mediante pruebas de HTR en ambos grupos.

METODOLOGÍA

ANIMALES

Se trabajó con ratas hembra de la cepa Wistar juveniles (30 días postnatales) y adultas (2 ½ y 4 meses de edad) mantenidas en alimentación *ad libitum* y condiciones de temperatura y ciclos de luz/obscuridad 12/12 controlados. El cuidado de los animales lo realizó personal especializado del bioterio del IIQB, UMSNH, considerando los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (16).

INOCULACIÓN DEL ANTÍGENO EN LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO

Un volumen de 10 µL de la proteína BSA (75 µg/ µL) fue inoculado en ambos ojos de ratas juveniles o adultas. El grupo control fue inoculado en ambos ojos con vehículo (buffer salino de fosfatos, PBS 0.1M). Para llevar a cabo la inyección, las ratas fueron anestesiadas con un coctel de ketamina/xilacina (70 y 7.5 µg/kg de peso corporal, respectivamente) vía intraperitoneal (i.p). La inyección en la cámara anterior se realizó con una jeringa Hamilton liberando el volumen total de la solución en 2 minutos, bajo microscopio estereoscópico (7). Durante todo el procedimiento los ojos de las ratas fueron mantenidos hidratados con solución salina al 0.9%.

PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETRASADO

Consiste en una fase de sensibilización y una de reto. La sensibilización se llevó a cabo siete días después de la inoculación en la cámara anterior del ojo. Para este procedimiento las ratas fueron nuevamente anestesiadas tal como se describe previamente. Bajo anestesia profunda las ratas se rasuraron en la región interescapular y se inyectaron con un volumen de 200 µL de BSA con adyuvante completo de Freund (1:1. BSA: 250 µg/100 µl de

vehículo; adyuvante 100 μ l) vía intradérmica (i.d.) con jeringa de tuberculina. El reto se realizó siete días después de la sensibilización. Nuevamente, las ratas fueron anestesiadas y el grosor de sus orejas se midió con un micrómetro para establecer la línea base. Todos los animales recibieron una inyección i.d. de 10 μ L de BSA (50 μ g/ μ L) en el pabellón de la oreja izquierda y 10 μ L de vehículo en la derecha. Veinticuatro y 48 horas más tarde, el grosor de las orejas fue medido nuevamente y a estos últimos valores le fueron restados los de la línea base para obtener un índice de inflamación por oreja (delta de inflamación, Δ).

EVALUACIÓN DE LA PERMANENCIA DE LA INMUNO-TOLERANCIA

Para la evaluación de la permanencia de la inmuno-tolerancia a lo largo del tiempo, se repitieron los procedimientos de sensibilización y reto. Es importante destacar que las evaluaciones de permanencia se llevaron a cabo mensualmente en diferentes grupos de animales, comenzando a los dos meses post-inoculación. En algunos grupos de animales se llevaron a cabo más de dos evaluaciones de permanencia separadas al menos dos meses en el tiempo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usaron los valores delta de inflamación (48 horas-línea base), los cuales fueron promediados y comparados mediante el paquete estadístico Graphpad Prism 6. Los datos primero se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk y la de homocedasticidad (homogeneidad de varianzas) de Levene. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para comparar las diferencias de inflamación entre grupos. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa.

RESULTADOS

El grosor de las orejas (Δ de inflamación) en animales inmuno-tolerizados en la etapa adulta mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control (inoculado en CA con PBS) y el grupo experimental (inoculado con BSA) en la evaluación de inducción de DIACA a los 15 días post-inoculación (Figura 1 1, A; ANOVA $p < 0,001$). Una serie de evaluaciones mensuales en diferentes grupos de animales a partir de los dos meses post-inoculación permitió determinar que las ratas de la cepa Wistar inoculadas en la edad adulta pueden mantener la inmuno-tolerancia a la proteína BSA durante al menos ocho meses post-inducción (resultados no mostrados). Debido a que estos grupos de animales fueron sometidos al menos a dos retos post-inoculación en diferentes tiempos, se quiso evaluar si la inmuno-tolerancia a BSA permanecía el mismo tiempo en animales con un único reto. En este grupo de animales evaluados cerca de los once meses de edad fue posible observar una Δ de inflamación muy cercana a cero en el grupo BSA en comparación con el grupo control (Figura 1 1, B; ANOVA $p < 0,001$). El análisis estadístico de la respuesta de los mismos animales en el tiempo nos muestra diferencias en los índices de inflamación entre la fase de inducción y la permanencia (FIGURA 1 1; $F_{\alpha < 0,05}$: 34.82, $p < 0.01$).

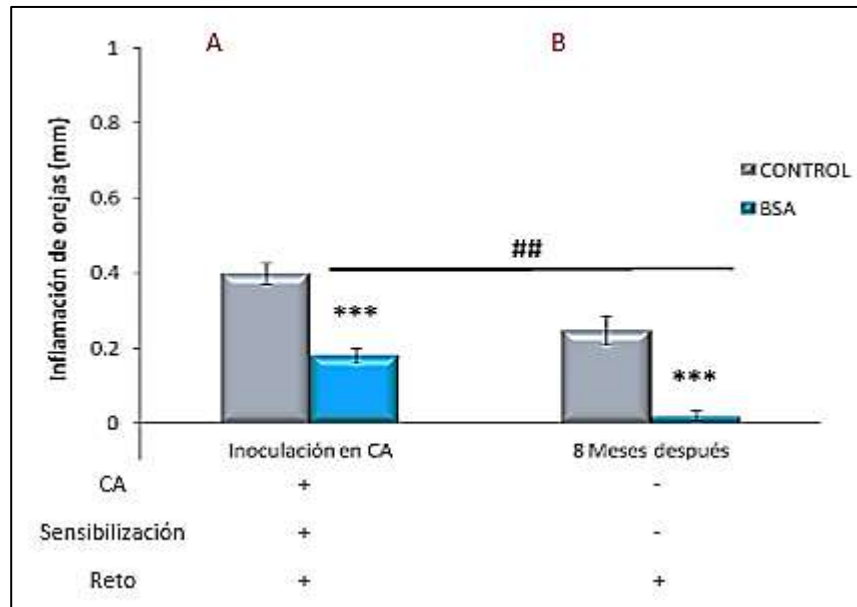


Figura 2 1 La immuno-tolerancia a BSA permanece al menos hasta los ocho meses de vida en ratas inoculadas en la cámara anterior (CA) en la etapa adulta. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (A) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base (prueba de hipersensibilidad retrasada), 15 días después de la inoculación en CA (A) y ocho meses después (B) en los mismos animales. Nótese que la Δ de inflamación en estos animales disminuyó con el tiempo. Los signos + en la tabla inferior indican las fases realizadas para cada experimento. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, n=9 por grupo. Los valores de ##p <0,01 se consideraron significativos y los valores de ***p <0,001 se consideraron altamente significativos.

Este mismo diseño experimental fue repetido en animales juveniles con el fin de comparar el tiempo que permanece la immuno-tolerancia inducida en diferentes etapas de la ontogenia en ratas de la cepa Wistar. Los índices de inflamación entre el grupo inoculado con BSA en etapa juvenil mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control tanto en la fase de inducción como en la evaluación de permanencia ocho meses después (Figura 1 2; $F_{\alpha<0.05}$: 31.09, $p<0.001$). Nuestros resultados muestran que efectivamente, las ratas juveniles conservan el estado de immuno-tolerancia a BSA a los ocho meses post-inducción. Sin embargo, los valores de inflamación mostrados para la permanencia están

por encima de los observados en la fase de inducción. Estos índices de inflamación podrían ser resultado de una evaluación de permanencia a los seis meses postinducción (resultados no mostrados).

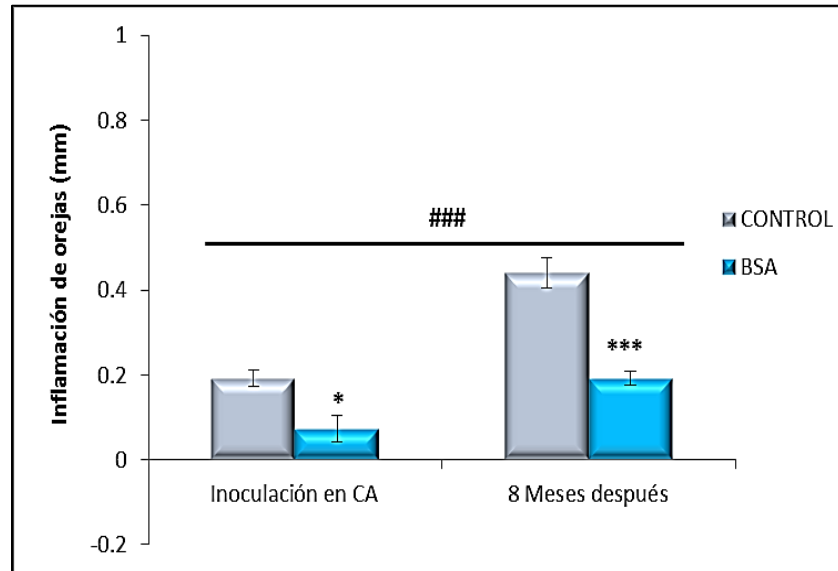


Figura 2 2 La inmuno-tolerancia a BSA permanece al menos hasta los ocho meses de vida en ratas inoculadas en la cámara anterior (CA) en la etapa juvenil. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base (prueba de hipersensibilidad retrasada), 15 días después de la inoculación en CA (A) y ocho meses después (B) en los mismos animales. Nótese que la Δ de inflamación en estos grupos incrementó entre la primera evaluación y la segunda. Sin embargo, el grupo experimental (BSA) presenta significativamente menor inflamación que el control. Los signos + en la tabla inferior indican las fases realizadas para cada experimento. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, $n=5$ por grupo. Los valores de * $p < 0,05$ se consideraron significativos y los valores de ###, *** $p < 0,001$ se consideraron altamente significativos.

En otro grupo de animales inoculados en etapa juvenil se obtuvieron resultados muy similares extendiendo el tiempo de permanencia de la inmuno-tolerancia a BSA hasta los 10 meses post-inoculación, con un reto intermedio a los 5 meses (Resultados no mostrados; $F_{\alpha < 0.05}: 26.32$, $p < 0.001$, ver anexo 1).

DISCUSIÓN

Nuestro principal interés es desarrollar una estrategia de modulación que instruya al sistema inmunológico de ratas a tolerar a autoantígenos evitando el establecimiento de inflamación crónica y la patología autoinmune secundaria. De ser eficiente, esta estrategia podrá ser empleada para modular procesos inflamatorios crónicos en un gran número de enfermedades degenerativas. Un elemento fundamental para garantizar la eficacia de este tratamiento es el mantenimiento de la inmuno-tolerancia a lo largo de la vida del individuo. Previo a este trabajo se desconocía el tiempo de permanencia del estado de inmuno-tolerancia inducida mediante DIACA y si el tiempo de permanencia estaba asociado a la edad de inducción. Nuestros resultados muestran que es posible inducir inmuno-tolerancia a largo plazo mediante DIACA en animales juveniles y adultos con una sola exposición al Ag. Estos resultados son novedosos en tanto estudios previos destacan la dificultad para inducir inmuno-tolerancia en animales adultos no inmuno-deprimidos (9-12).

Numerosos estudios sugieren que entre más temprana sea la inducción de inmuno-tolerancia, más larga es su permanencia (17-19). Sin embargo, algunos estudios también destacan que la inducción en etapas tempranas de la ontogenia, previas a la madurez de los órganos linfoides timo y bazo, resulta en una tolerancia parcial (20, 22). En este último caso, esta respuesta conlleva a la delección clonal o a la inmuno-supresión, por lo que puede perderse una vez que el sistema inmunológico madure y tenga un segundo contacto con el Ag (20, 21). Los resultados del presente estudio muestran que es posible mantener un estado de inmuno-tolerancia a largo plazo tanto en animales inoculados a los 30 días de vida (una semana después del destete, cuyo timo recién ha madurado) como en organismos

adultos. Por limitaciones de tiempo en este estudio las evaluaciones de la permanencia de inmuno-tolerancia únicamente se realizaron hasta los ocho meses post-inoculación en animales adultos y a los 10 meses después de la inducción en animales juveniles. Así, será necesario evaluar el mantenimiento de la inmuno-tolerancia en animales de ambos grupos por un periodo de tiempo mayor para determinar si este estado es de por vida o se pierde en algún momento de la ontogenia.

La literatura señala que la vía de inducción de la inmuno-tolerancia es importante para garantizar su permanencia en el tiempo. Numerosos trabajos muestran que la forma más eficiente de inducir un estado de tolerancia es a través de las mucosas oral, nasal y ocular (9-12, 14, 23-25). Sin embargo, la inducción por las vía nasal y oral requiere la continua exposición al Ag y a menudo es transitoria, con probables recaídas a lo largo del tiempo (14, 26, 27). Aunque trabajos previos han demostrado que es posible inducir inmuno-tolerancia sistémica y específica de Ag en animales adultos mediante DIACA (9-12), ningún trabajo ha evaluado si este estado permanece a largo plazo. Así, los resultados del presente trabajo complementan y amplían los datos de trabajos previos al mostrar que la inmuno-tolerancia inducida mediante DIACA es una de las estrategias más eficientes para tolerizar a largo plazo a animales, con una sola exposición al antígeno. Debido a que este estado de tolerancia permanece incluso después de varias inmunizaciones (retos antigénicos) a lo largo de la vida del animal, es posible garantizar su mantenimiento en enfermedades degenerativas que contiendan con múltiples eventos antigénicos (i.e., esclerosis múltiple y artritis reumatoide, 9,12).

Adicionalmente, la inducción de inmuno-tolerancia depende de la naturaleza del Ag y la dosis. La BSA, al ser una proteína especie-específica siempre moviliza una respuesta inmunológica en el hospedero. Por ello, se ha utilizado ampliamente para inducir inmuno-tolerancia en diferentes modelos experimentales (14, 28-29). Hasta el momento no se sabe si la inducción y permanencia de la inmuno-tolerancia a una proteína extraña como BSA difiere del estado de tolerancia inducida a autoantígenos presentes en las enfermedades degenerativas. Trabajos posteriores deberán explorar si es posible inducir un estado de inmuno-tolerancia a uno o varios autoantígenos y si este estado permanece el mismo tiempo que la tolerancia a una proteína como BSA.

CONCLUSIONES

- Es posible inducir inmuno-tolerancia sistémica y específica para BSA con una sola exposición al Ag.

Es igual de eficiente inducir inmuno-tolerancia específica de BSA tanto en individuos adultos como en juveniles, en tanto permanece a largo plazo en ambos grupos de animales aún después de varios retos antigénicos

LITERATURA CITADA

1. Hori, J. (2008). Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *Ocul Biol Dis Inform* 1:94–100.
2. Biros, D. (2008). Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior. *Vet Clin Small Anim*, 38: 309–321.
3. Forrester, J. V., Xu, H., Lambe, T., Cornall, R. (2008). Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol*, 1: 372.
4. D'Orazio, T. J., Niederkorn, J. Y. (1998). A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J Immunol*, 160: 2089–2098.
5. Marinovic, M. A. (2010). Inmunología ocular. *I Rev. chil. Reumatol*, 26(3): 222-241.
6. Niederkorn, J. H. (2009). Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert Rev Clin Immunol*. 5(2): 137–144.
7. Niederkorn, J. Y., Kaplan, H. J. (2007). *Immune Response and the Eye. Chemical Immunology and Allergy*. New York. Editorial: Basel, Karger.
8. Cone R, Pais R. (2009). Anterior chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): An Acute Response to Ocular Insult protects from Future Immune-Mediated Damage?. *Ophthalmology and Eye Diseases*, 1: 33–40.
9. Bhowmick, S., Clark, R., Brocke, S., Cone, R. (2011). Antigen-specific splenic CD41 and CD81 regulatory T cells generated via the eye, suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase. *International Immunology*, Japanese Society for Immunology 23(2): 119–128.

10. Farooq S, Ashour H. (2013). Eye-Mediated Induction of Specific Immune Tolerance to Encephalitogenic Antigens. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19: 503-510.
11. Farooq, S. M., Ashour, H. M. (2014). In vitro-induced cell-mediated immune deviation to encephalitogenic antigens. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35: 64–69.
12. 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.
13. Siegris C-A. 2001. Neonatal and early life vaccinology. Elsevier Science, Ltd. *Vaccine* 19: 3331–3346.
14. Zouali M. 2001. Immunological Tolerance: Mechanisms. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & 2001 Nature Publishing Group* 1-9.
15. Harrison L C, Hafler D. 2000. Antigen-specific therapy for autoimmune disease. Elsevier Science *Current Opinion in Immunology*, 12:704–71.
16. Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. (1987). De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. *Porrua, Leyes y Códigos de México, México*, 423-4.
17. Bascom, R., Tao, K., Tollenaar, S., West, L. (2015). Imaging Tolerance Induction in the Classic Medawar Neonatal Mouse Model: Active Roles of Multiple F1-Donor Cell Types. *American Journal of Transplantation* 15: 2346–2363.
18. Scharschmidt T., Vasquez K., Truong H., Gearty S., Pauli M., Nosbaum A., Gratz I., Otto M., Moon J., Liese J., Abbas A., Fischbach M., Rosenblum M. (2015). A

- wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. *Immunity* 17 (11); 43:1011.
19. Siegris C-A. (2001). Neonatal and early life vaccinology. 2001 Elsevier Science Ltd. *Vaccine*, 19: 3331–3346.
 20. Inoue, O., Konieczny, B., Wagener, M., McKenzie, A y Lakkis, F. (2001). Failure to Induce Neonatal Tolerance in Mice That Lack BothIL-4 and IL-13 but Not in Those That Lack IL-4 Alone. *The Journal of Immunology*, 167: 1125–1128.
 21. Forsthuber, T., H. C. Yip, and P. V. Lehmann. (1996). Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science* 271:1728.
 22. Merino, J., S. Schurmans, M. A. Duchosal, S. Izui, P. H. Lambert. 1989. Autoimmune syndrome after induction of neonatal tolerance to alloantigens. CD4+ T cells from the tolerant host activate autoreactive F1 B cells. *J. Immunol.* 143: 2202.
 23. Fujihashi, K., Dohi, T., Kweon, M.N., McGhee, J.R., Koga, T., Cooper, M.D., Tonegawa, S. y Kiyono, H. Gammadelta. (1999). T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int.Immunol.* 11, 1907-1916.
 24. Pabst, O., Bernhardt, G. y Forster, R. (2007). The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *Institute of Immunology, Journal of Leukocyte Biology.* 82 (10).
 25. Li, W., Chou, S.T., Wang, C., Kuhr, C.S. y Perkins, J.D. (2004). Role of the liver in peripheral tolerance: induction through oral antigen feeding. *Am.J.Transplant.* 4, 1574-1582.

26. Li, W., Chou, S.T., Wang, C., Kuhr, C.S. y Perkins, J.D. (2004). Role of the liver in peripheral tolerance: induction through oral antigen feeding. *Am.J.Transplant.* 4, 1574-1582.
27. Holt, P G. (1998). Regulation of immune responses at mucosal surfaces: Allergic respiratory disease as a paradigm. *Immunology and Cell Biology*, 76, 119–124
28. Stark, J. y Spitznagel, J. (1972). Immunogenicity of Bovine Serum Albumin and Its Oligopolymers in CBA Mice. *J Immunol*, 108:800-806.
29. Ameiss, K., Danforth H., McElroy A., Barri A., Berghman L., Caldwell D. (2004). Immunogenicity of ad libitum drinking water administration of bovine serum albumin in Leghorn chickens. *Poult Sci.* 83(9):1535-8.

**CAPÍTULO III.- Evaluación de la permanencia de inmuno-
tolerancia a antígenos medulares inducida mediante
desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior del
ojo en ratas Wistar**

RESUMEN

Un gran espectro de enfermedades degenerativas y traumáticas cursan con inflamación crónica. Tal es el caso de patologías como las enfermedades de Alzheimer, la esclerosis múltiple y los eventos secundarios a lesiones traumáticas. Aún cuando estas patologías tienen diferentes etiologías, pronóstico y curso de la enfermedad, en todas ellas ocurren eventos inflamatorios constantes que impiden la reparación tisular y conducen a la extensión de la lesión. En estos casos el establecimiento de la respuesta inflamatoria está asociado con la exposición de proteínas constitutivas que el sistema inmunológico reconoce como antígenos (Ags) desencadenando una patología autoinmune. Una alternativa terapéutica para estas enfermedades es la modulación de la respuesta inflamatoria.

El ojo como órgano inmuno-privilegiado es capaz de modular la respuesta inflamatoria para generar tolerancia específica y sistémica para los Ags que son inoculados en su interior. Trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que la inmuno-tolerancia inducida a la albúmina de suero bovino (BSA) mediante la cámara anterior del ojo (CA) permanece al menos ocho meses en ratas. Sin embargo, se desconoce si el organismo es capaz de generar inmuno-tolerancia a varios determinantes autoantigénicos ni si esta tolerancia también se mantiene a largo plazo en ratas. En este contexto, el presente trabajo evaluó la permanencia de la tolerancia a un coctel de Ags derivados de tejido medular (antígenos neurales, AgN) durante ocho meses en ratas Wistar. Los AgN fueron inoculados en la CA de ratas juveniles para inducir tolerancia. La inducción y permanencia de la inmuno-tolerancia fue evaluada mediante pruebas de hipersensibilidad de tipo retrasado. También se evaluó el estado de salud de los animales a través de registros de peso corporal, biometrías hemáticas y pruebas de comportamiento para descartar encefalomiелitis experimental autoinmune. Nuestros resultados muestran: 1) que es posible inducir inmuno-tolerancia a los AgN; 2) que esta inmuno-tolerancia permanece al menos ocho meses incluso después de varios retos; 3) que la inmuno-tolerancia no genera cambios patológicos en la respuesta inmunológica a largo plazo. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la inmuno-tolerancia inducida mediante la CA puede ser empleada como una estrategia eficiente para modular la respuesta inmunológica en enfermedades que cursen con inflamación crónica.

Palabras clave: privilegio inmunológico, permanencia de inmuno-tolerancia, antígenos neurales.

ABSTRACT

A wide spectrum of degenerative diseases present chronic inflammation. Such is the case of neurodegenerative diseases, constant inflammatory events increase the lesion and avoid tissue repair. So our main interest is to modulate the inflammatory response to protect the central nervous system tissue (CNS) from damage. The eye is able to modulate the inflammatory response to generate specific and systemic tolerance to antigens inoculated within it. This ability can be used for neuroprotection in neurodegenerative diseases . Nevertheless, it is unknown if the immune-tolerance induced by this route it is related to the number of antigenic determinants and their complexity and the time that lasts to such antigens. In this context, this study evaluated the permanence of immune-tolerance to a cocktail of antigens derived from spinal cord tissue (neural antigens, NAg) and a bovine serum albumin (BSA) throughout eight months in Wistar rats. NAg and BSA were inoculated in the anterior chamber of juvenile (30 days old) and adult animals (2.5 months old) to induce tolerance. The induction and persistence of the immune-tolerance was evaluated by the delayed-type hypersensitivity (DTH) test. The health status of animals was monitored through behavioral tests to discard experimental autoimmune encephalomyelitis, body weight and hematic biometry assays. Our results show that: 1) it is possible to induce immune-tolerance to BSA and NAg in juvenile and adult rats with one inoculation; 2) this immuno-tolerance remains for at least eight months when induced in juvenile and adult animals even after several challenges; 3) this immuno-tolerance generates no pathological changes in the immune response over time. The immune-tolerance induced by antigen inoculation into the anterior chamber of the eye is an efficient strategy to modulate the immune response in diseases associated with chronic inflammation. Since it is equally efficient if induced in juvenile and adult animals, it could be used both a preventive or therapeutic strategy.

Key words: immune privilege, permanence of immune-tolerance, neural antigens.

INTRODUCCIÓN

Un gran espectro de enfermedades degenerativas están asociadas con inflamación crónica. Tal es el caso de las enfermedades neurodegenerativas, así como de algunas otras patologías periféricas como la osteoartritis y la artritis reumatoide (1-5). En principio, la inflamación es un mecanismo homeostático que favorece la reparación tisular. Sin embargo, en las enfermedades neurodegenerativas esto no ocurre, ya que esta puede ser la responsable de aumentar la muerte celular y la necrosis tisular (6-13 y 19). La respuesta inflamatoria se inicia con señales de daño que promueven la infiltración de células de la periferia (macrófagos, neutrófilos, linfocitos circulantes, etc) y éstas a su vez liberan mediadores químicos (citocinas y quimiocinas), lo que conlleva a la activación de células propias del SNC (astrocitos y microglía) que actúan como un sistema inmunológico local (14-17). La microglía y los astrocitos una vez que han sido activados permanecen así durante largos periodos de tiempo, favoreciendo procesos inflamatorios crónicos mediante la constante liberación de citocinas pro-inflamatorias, las cuales promueven a su vez la entrada libre de células del sistema inmunológico sistémico (16, 17, 19-21). Estos eventos, aunados a mecanismos inadecuados de resolución de la inflamación y a la continua exposición de determinantes antigénicos en el sitio de la lesión, contribuyen a extender el daño espacial y temporalmente (14, 21-25). En conjunto, estos mecanismos conducen al establecimiento de una respuesta autoinmune contra los propios constituyentes celulares que ahora son reconocidos como auto-Ags (23-27). Así, parece obvio que la modulación de la respuesta inmunológica podría ser una estrategia eficiente para favorecer la protección del tejido nervioso y evitar la extensión de la lesión.

Una forma de modular la respuesta del sistema inmunológico contra constituyentes neurales y evitar la inflamación del tejido nervioso en una enfermedad degenerativa podría ser instruir previamente al sistema inmunológico en el reconocimiento de los AgN (29-32). Para que esta modulación sea eficiente como estrategia preventiva a un trauma, debe ser específica para los AgN, sistémica y permanente a lo largo del tiempo (33-39). Esta tolerancia puede ser favorecida mediante la inoculación de auto-Ags en un tejido u órgano inmuno-privilegiado que tiene la capacidad de generar tolerancia a los Ags presentes (40-42). Uno de los órganos inmuno-privilegiados que cumplen con las características de poseer un sistema capaz de inducir tolerancia específica de Ag a nivel sistémico es el ojo (42, 45 y 47). En este órgano el sistema inmunológico desvía la respuesta de inflamación a una respuesta anti-inflamatoria donde están involucrados los linfocitos de tipo CD8+ y CD4+CD25+ que expresan FoxP3, una proteína de transcripción que regula a la baja la respuesta inflamatoria. Este mecanismo ha recibido el nombre de desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior (DIACA) (42-44, 46-49). Así, tomando ventaja de la capacidad del ojo para generar DIACA, en este proyecto se busca inducir inmuno-tolerancia para AgN derivados de tejido medular inoculados en la cámara anterior en ratas durante el primer mes de vida y evaluar su permanencia en el tiempo.

Ha sido reportado que se puede generar tolerancia a proteínas altamente antigénicas como ovoalbúmina (1, 2 y 28), por lo que comenzamos a evaluar la inmuno-tolerancia inducida mediante DIACA a la proteína antigénica albúmina de suero bovino (BSA, también conocida por ser altamente antigénica) con una sola exposición, en ratas Wistar juveniles y adultas, y probar el tiempo que permanece dicha tolerancia (Capítulo II). Sin embargo,

nuestro principal interés es inducir DIACA a un coctel derivado de tejido medular sano y evaluar su permanencia en el tiempo. Este objetivo posee varias implicaciones de relevancia. Primero, podremos demostrar que el sistema nervioso posee determinantes antigénicos capaces de ser reconocidos por el sistema inmunológico y montar una respuesta inflamatoria. En segundo lugar, podremos evaluar si el sistema inmunológico es capaz de montar una respuesta de inmuno-tolerancia a auto-Ags tan eficaz (en atenuación de inflamación y en permanencia en el tiempo) como aquella inducida a una proteína extraña (BSA). Además, de lograr la inmuno-tolerancia específica y permanente contra AgN, esta podría ser una estrategia preventiva útil para favorecer la protección del tejido en cualquier patología que curse con inflamación crónica, y que tenga más de un determinante antigénico.

METODOLOGÍA

ANIMALES

Se trabajó con ratas hembra de la cepa Wistar juveniles (30 días postnatales) mantenidas en alimentación *ad libitum* y condiciones de temperatura y ciclos de luz/obscuridad 12/12 controlados. El cuidado de los animales lo realizó personal especializado del bioterio del IIQB, UMSNH, considerando los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (58).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la inducción y evaluación de la inmuno-tolerancia se emplearon los siguientes grupos experimentales:

1. PBS-AgN (n=8) Los animales de este grupo experimental fueron inoculados en la cámara anterior del ojo (CA) con PBS, sensibilizados y retados con proteínas neurales.
2. AgN (n=8) Los animales de este grupo experimental fueron inoculados en la CA, sensibilizados y retados con proteínas neurales.
3. PBS-BSA (n=8) Los animales de este grupo experimental fueron inoculados en la CA con PBS, sensibilizados y retados con BSA.
4. BSA (n=8) Los animales de este grupo experimental fueron inoculados en la CA con BSA, sensibilizados y retados con BSA.
5. PBS-AgN (n=8) Los animales de este grupo experimental fueron únicamente sensibilizados y retados con PBS.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Para lograr el objetivo 1, 6 ratas adultas (≥ 300 g) fueron anestesiadas profundamente por vía intraperitoneal con 100 mg/kg de pentobarbital sódico. Fue expuesta la columna vertebral desde la región dorsal y posteriormente fueron decapitadas. La médula espinal fue disecada rápidamente desde las regiones cervicales hasta la cauda equina. La médula espinal se lavó con solución salina (0.9%). Una vez libre de impurezas el tejido fue congelado con nitrógeno líquido y posteriormente pulverizado en un mortero. Más tarde fue resuspendido en 300 μ l de buffer de extracción (10 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 1% β -mercaptoetanol). El homogenado fue sonicado 5 min y centrifugado a 19 000 rpm por 15 minutos a 4°C. La proteína fue fraccionada e incubada en buffer de lisis (7 M urea, 2M tiourea, 5% CHAPS). La concentración de proteína fue cuantificada mediante el método de Lowry.

INOCULACIÓN DEL ANTÍGENO EN LA CÁMARA ANTERIOR DEL OJO

Para la inoculación de los AgN en la CA, un volumen de 10 μ L de proteínas derivadas de médula espinal (50-60 μ g según se indique) fue inoculado en ambos ojos de ratas al mes de vida (para BSA se realizó como se describe en el capítulo anterior). Para cada una de estas condiciones experimentales se utilizó un grupo control, el cual fue inoculado en ambos ojos con buffer salino de fosfatos (PBS, 0.1M). Adicionalmente, un grupo control para AgN fue inoculado con el mismo volumen de buffer de extracción. Para llevar a cabo la inyección, las ratas fueron anestesiadas profundamente con un coctel de ketamina/xilacina (75 μ g/kg y 7.5 μ g/kg de peso corporal, respectivamente) vía intraperitoneal. La inyección en la cámara anterior se realizó bajo un microscopio estereoscópico mediante una jeringa Hamilton liberando el volumen total de solución en 2 minutos (10). Durante todo el procedimiento los ojos de las ratas fueron mantenidos hidratados con solución salina al 0.9%.

PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO RETRASADO

La prueba de hipersensibilidad de tipo retrasado (HTR) consiste en una fase de sensibilización y una de reto. Siete días después de la inoculación en la cámara anterior del ojo, las ratas fueron anestesiadas tal como se describe previamente, se rasuraron en la región interescapular y se sensibilizaron con un volumen de 200 μ L de AgN y adyuvante completo de Freund (1:1; 250 μ g AgN/100 μ l de vehículo:100 μ l de adyuvante) vía intradérmica (i.d.) con jeringa de tuberculina. Los animales fueron retados siete días después bajo anestesia profunda. Antes de realizar el procedimiento, las orejas de los animales fueron medidas con un micrómetro Mitutoyo (Quick-mini 700 119 20) cinco veces para establecer la línea base. Todos los animales recibieron una i.d. de 10 μ L de BSA (500 μ g) en el pabellón de la oreja

izquierda y 10 μL de vehículo en la derecha. Veinticuatro horas más tarde, las orejas fueron medidas (siguiendo el procedimiento de la línea base) y a estos últimos valores le fueron restados los de la línea base para obtener un índice delta (Δ) de inflamación por oreja.

EVALUACIÓN DE LA PERMANENCIA DE LA INMUNO-TOLERANCIA

Se repitieron los procedimientos de reto antigénico en pabellones auriculares y posteriormente se midió la inflamación por oreja como se describió anteriormente. Las ratas se sacrificaron a los 4, 6, 8, 10 y 12 meses después de medir las 48 horas de inflamación. Se obtuvo bazo para realizar RT-PCR en tiempo real y sangre para evaluar el estado de salud de las ratas.

EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD DE LAS RATAS

Medidas de masa corporal y evaluación de motilidad

Se tomaron medidas de masa corporal en gramos, de las cuales se graficaron los promedios por grupo. Además, medimos la motilidad de las patas delanteras, traseras y la cola para constatar que no se desarrolló alguna respuesta de autoinmunidad (como EAE) a los AgN que inoculamos en la CA y en las pruebas de HTR. El cuadro clínico de la enfermedad en los grupos experimentales de AgN y su control, se monitoreó mediante observaciones realizadas siempre a la misma hora, comenzando desde la semana 1 post-inoculación en la cámara anterior hasta los 7 meses. Se tuvo cuidado de evitar el estrés de los animales durante la manipulación tanto como fue posible, minimizando los factores ambientales tales como el ruido, el dolor y el calor (24 y 25). Para evaluar la motilidad tomamos videos en los cuales se asignó un puntaje de acuerdo a la escala preparada para medir recaídas y remisiones de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE-RR) por Esposito (24): 0, no

hay signos clínicos aparentes; 0.5, la postura torcida o movimientos para caminar ligeramente irregulares; 1, la pérdida leve de tono de la cola o paraplejia leve (debilidad) de una extremidad posterior; 1,5, la pérdida parcial de tono de la cola y paraparesia suave (debilidad) de ambas extremidades posteriores; 2, la parálisis completa de la cola; 2.5, la parálisis de la cola completa con debilidad marcada de ambos miembros posteriores y el fracaso ocasional de los cuartos traseros; 3, parálisis parcial (hemiparálisis) de las extremidades traseras, el animal es forzado a arrastrarse; 3.5, parálisis completa de las extremidades traseras sin movimiento muñón; 4, parálisis completa de las extremidades traseras con debilidad de las extremidades anteriores; 4.5, moribundo y 5, Muerto.

Biometrías hemáticas

Para este análisis se obtuvieron muestras de sangre de ratas sin ningún tratamiento y de cada grupo experimental (2 ml) para tomar las siguientes medidas:

- Velocidad de sedimentación globular VSG
- Número de glóbulos rojos (eritrocitos). Se miden en células por microlitro (células/ml) de sangre, considerando los índices eritrocíticos:
 - i. Volumen corpuscular medio (VCM). Indica el tamaño promedio de los glóbulos rojos, expresado en femtolitros (fl).
 - ii. Hemoglobina corpuscular media (HCM). Es la cantidad de hemoglobina por glóbulo rojo, y se da en picogramos por célula (pg/cel).
 - iii. Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Revela la cantidad de hemoglobina relativa al tamaño de la célula (concentración de hemoglobina), en gramos por decilitro (g/dl).
- Número de glóbulos blancos (leucocitos). Porcentaje de linfocitos, monocitos y granulocitos. Su unidad también son las células/ml.

- Conteo de plaquetas. Se registra en unidades por microlitro de sangre (u/mcl), resultando ideales 150,000 a 400,000 u/mcl.
- Valor de hemoglobina (Hb). Se valora en gramos por decilitro (g/dl).
- Valor de hematocrito (Htc). Su conteo es en porcentajes (%).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se usaron los valores delta de inflamación (48 horas-línea base), los cuales fueron promediados y comparados mediante el paquete estadístico Graphpad Prism 6. Los datos primero se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk y la de homocedasticidad (homogeneidad de varianzas) de Levene. Se utilizó una prueba T de Student para comparar 2 grupos y análisis de varianza (ANOVA) para grupos más de dos grupos. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa. Si las diferencias entre los grupos resultaron significativas se empleó una prueba post-hoc de Tukey. Si los datos no pasaron los criterios de normalidad, los estadísticos no paramétricos que se usaron fueron la prueba U de Mann-Whitney o Kruskal Wallis.

RESULTADOS

LAS PROTEÍNAS DERIVADAS DE TEJIDO MEDULAR SANO PRESENTAN ANTIGENICIDAD

Para cumplir con el objetivo de establecer la antigenicidad de proteínas neurales derivadas de la médula espinal de ratas adultas en condiciones basales, primero obtuvimos un extracto de proteínas medulares de acuerdo al método reportado por Gil-Dones (54). Con este método logramos recuperar aproximadamente 230 mg de proteína por médula espinal de rata en condiciones basales. Así, una vez seleccionado el método para recuperar proteínas de tejido medular sano, decidimos evaluar su capacidad antigénica mediante pruebas de HTR para determinar si realmente podrían ser utilizadas para inducir inmuno-tolerancia a través de DIACA. Presentamos los índices de inflamación después del reto en la prueba de HTR (Figura 3 1; $T_{(12)}$: 8.646, $p < 0.001$). Estos resultados muestran que las proteínas derivadas de médula espinal sana pueden actuar como Ags, ya que son comparables con los índices reportados para otras proteínas inmunogénicas como ovoalbúmina (1, 2 y 50) y BSA (28). En conjunto, estos resultados justifican el uso de proteínas medulares para producir inmuno-tolerancia en esta fase del proyecto.

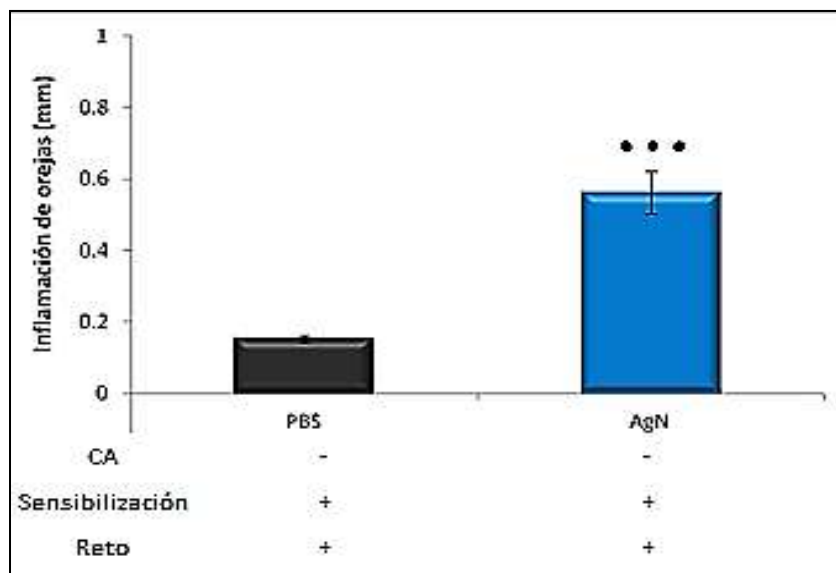


Figura 3 1 Prueba de antigenicidad de las proteínas medulares en ratas juveniles, medida mediante las pruebas de HTR. Los signos de + indican las fases realizadas para cada experimento. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, n=8 por grupo. Los valores de ***p <0,001 se consideraron significativos.

INDUCCIÓN DE INMUNO-TOLERANCIA A AgN DERIVADOS DE TEJIDO SANO

Generamos inmuno-tolerancia a AgN derivados de médula espinal utilizando concentraciones de 50 y 60 μ g de proteína (extracto total) en ambos ojos (resultados no mostrados). Posteriormente se inoculó otro grupo con controles adicionales para tener controles más estrictos de las medidas de inflamación asociadas a DIACA. En estos experimentos utilizamos cuatro grupos control para garantizar la eficacia del procedimiento. Los controles que presentamos son: control de inoculación con PBS en la CA, dos grupos únicamente sensibilizados y retados (uno con AgN otro con PBS) y el tercer grupo solo se retó con AgN como un control de inflamación asociada a edema. Los resultados obtenidos muestran que se generó inmuno-tolerancia para AgN, evidenciada por la atenuación de la inflamación de los grupos inoculados en CA con AgN en comparación con los controles de

sensibilización y reto con AgNs y el inoculado en CA con PBS. Las medidas de inflamación del grupo inoculado en CA con AgN (immuno-tolerizado) son similares a las medidas de los grupos control que presentan mínima inflamación asociada a edema (en figura 3.2 PBS: color verde y AgN: color amarillo). (Figura 3.1; $F_{<0.05}: 21.63, p < 0.0001$).

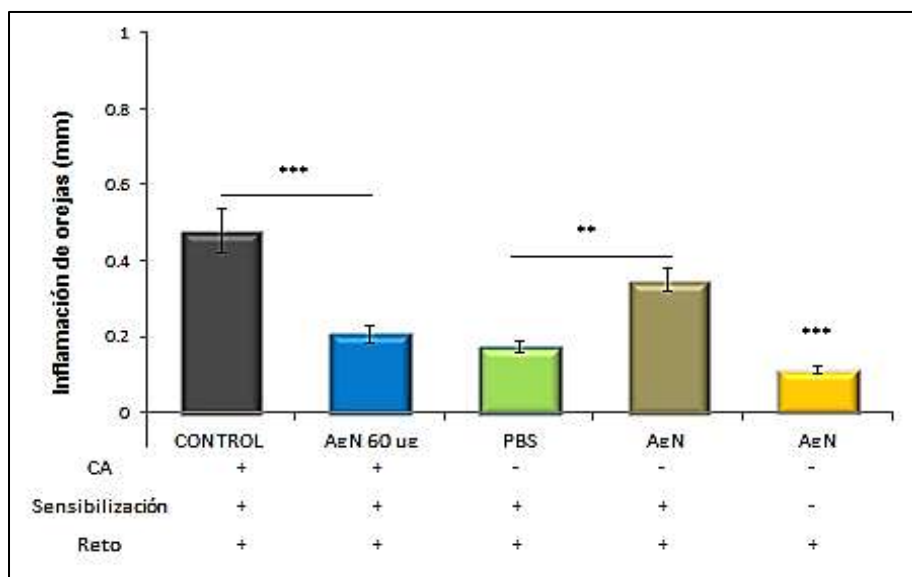


Figura 3 2. Immuno-tolerancia inducida por AgN inoculados en la CA de ratas juveniles medida mediante las pruebas de HTR. Los signos de + indican las fases realizadas para cada experimento. Las barras muestran la diferencia de inflamación por grupo experimental en orejas (Δ) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, N=9 por grupo. Los valores de ** $p < 0,01$ se consideraron significativos y *** $p < 0,001$ se consideraron altamente significativos.

PERMANENCIA DE INMUNO-TOLERANCIA A AgN A TRAVÉS DEL TIEMPO

El tiempo que permanece la tolerancia para Ags en ratas juveniles y adultas fue medido a través de pruebas de HTR. Los resultados para AgN muestran diferencias de inflamación con respecto al grupo control, tanto en la fase de inducción como en la de permanencia a los 8 meses post-inducción (Figura 3 3; $F_{\alpha < 0.05}: 43.16, p < 0.0001$) y 1 año post-inducción (Figura 3 4; $F_{\alpha < 0.05}: 43.16, p < 0.0001$).

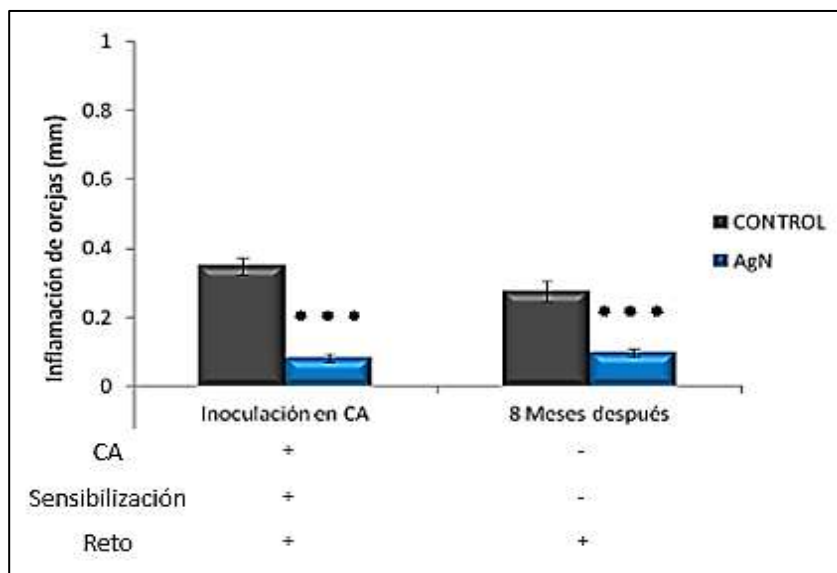


Figura 3 3. Permanencia de inmuno-tolerancia inducida a AgN inoculada en la CA de ratas juveniles (1 mes postnatal), medida mediante las pruebas de HTR. Los signos de + indican las fases realizadas para cada experimento. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base en ambos grupos. Evaluación de inducción de DIACA y ocho meses post-inducción. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, N=9 por grupo. Los valores de **p < 0,01 y ***p < 0,0001 se consideraron altamente significativos.

Los resultados para AgN medidos al año post-inducción muestran diferencias de inflamación con respecto al grupo control ($F_{\alpha < 0.05}$: 43.16, $p < 0.0001$, fig. 4). Las medidas de inflamación tuvieron un aumento significativo, que es explicado por que hubo una manipulación previa (a los 6 meses post-inducción).

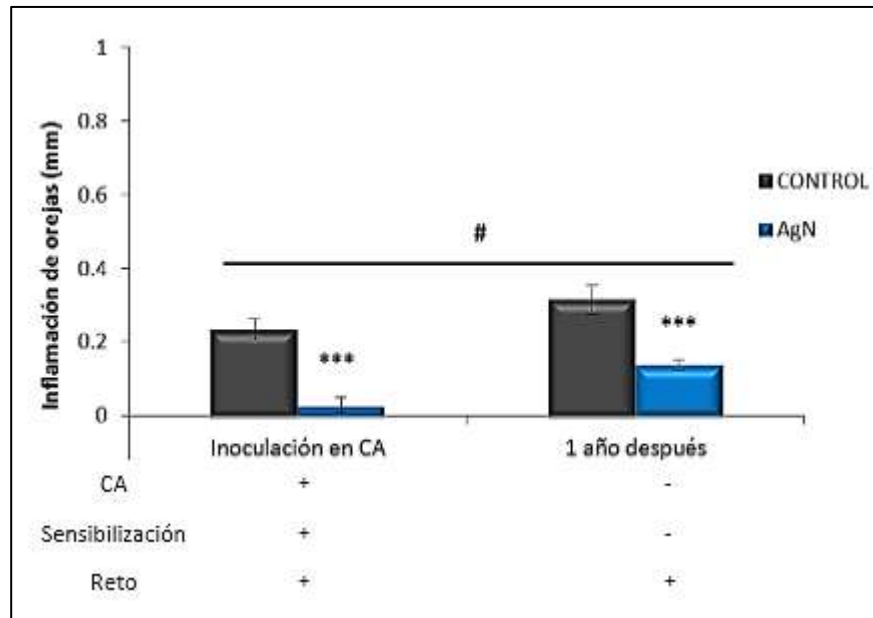


Figura 3 4. Permanencia de immuno-tolerancia inducida a AgN inoculada en la CA de ratas juveniles (1 mes postnatal), medida mediante las pruebas de HTR. Los signos de + indican las fases realizadas para cada experimento. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en las orejas (Δ) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base en ambos grupos. Evaluación de inducción de DIACA y 1 año post-inducción. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, N=9 por grupo. Los valores de **p<0,01 y ***p<0,0001 se consideraron altamente significativos.

Los resultados de los grupos PBS y AgN fueron replicados en un experimento independiente que presenta índices de inflamación comparables ($t_{(15)}$: 6.022, $p < 0.001$). El estado de immuno-tolerancia también fue medido a los 4, 5, 6 y 10 meses post-inoculación y permaneció en las diferentes evaluaciones. En los grupos que tuvieron varios retos la inflamación fue incrementando pero se mantuvieron las diferencias de inflamación con respecto al grupo control (resultados no mostrados).

ÍNDICES DEL ESTADO DE SALUD EN ANIMALES IMMUNO-TOLERANTES

La biometría hemática es una prueba de sangre que permite evaluar el estado general de salud, nos permite detectar una amplia gama de enfermedades, incluyendo anemia, infecciones, leucemia, alergias, problemas de coagulación o trastornos de la sangre, así

como neoplasias. Las biometrías se realizaron con el fin de conocer el estado de salud en el que se encuentran las ratas y si la tolerancia les genera cambios en el SI (ver anexos del 2-10). Los resultados muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas en leucocitos. Únicamente se encontraron diferencias significativas en el recuento de plaquetas (PLT); los grupos inoculados en CA y el inmunizado con AgN presentan valores más elevados de plaquetas.

Tabla 1

Biométrías hemáticas de ratas Wistar juveniles, medidas de inoculación en CA, tomadas a las 48 hrs. después del reto.

<i>Grupo</i>	<i>LEU</i> x 10 ³	<i>ERI</i> x 10 ⁶	<i>Hb</i> g/dl	<i>Htc</i> %	<i>PLT</i> x 10 ³	<i>PCT</i> %	<i>VCM</i> m 3	<i>HCM</i> pg	<i>CHCM</i> g/dl	<i>IDE</i> %	<i>MPV</i> m 3	<i>IDP</i> %	<i>LIN</i> %	<i>MON</i> %	<i>GRA</i> %
Basales	5.53	7.32	15.78	47.0	466.3	0.357	64.2	21.5	33.5	14.2	7.6	9.9	61.1	17.02	21.9
Control CA	10.4	6.35	14.03	42.28	578.5***	0.55	66.7	22.15	33.20	14.6	9.43	11.98	73.4	15.0	11.7
AgN CA	11.47	6.50	14.4	44.8	572***	0.573	69	22.2	32.2	14.0	10.1	13.5	65.5	18.5	15.9
Control I	11.2	6.49	14.5	43.875	525.25	0.495	67.5	22.3	33.0	14.2	9.3	12.97	65.4	15.1	19.4
AgN I	12.3	6.6	14.62	45.85	593.7***	0.556	69.5	22.3	32.0	14.3	9.375	12	69.9	14.225	15.9
Reto AgN	5.13	7.32	16.0	47.875	423.25	0.332	65.75	21.9	33.4	13.6	7.9	10.15	60.3	17.9	21.8

ANOVA 2 vías, $F_{\alpha < 0.05} = 0.3101$, los valores de $P < 0.001$ *** se consideraron significativos. I: Inmunizadas

También se añadieron los valores de las biometrías hemáticas para conocer el estado de salud de las ratas adultas en las medidas de permanencia, donde solo se encontraron diferencias en el conteo de plaquetas con respecto al grupo sin ningún tratamiento (basales), muy similar a los resultados de inducción en juveniles.

Tabla 2

Biométrías hemáticas de ratas Wistar, permanencia de AgN a los 8 meses.

<i>Grupo</i>	<i>LEU</i> x 10 ³	<i>ERI</i> x 10 ⁶	<i>Hb</i> g/dl	<i>Htc</i> %	<i>PLT</i> x 10 ³	<i>PCT</i> %	<i>VCM</i> m ³	<i>HCM</i> pg	<i>CHCM</i> g/dl	<i>IDE</i> %	<i>MPV</i> m ³	<i>IDP</i> %	<i>LIN</i> %	<i>MON</i> %	<i>GRA</i> %
Basales	2.6	7.3	14.9	45.8	540.3	0.4	59.8	20.4	34.3	13.5	7.4	7.5	59.2	13.8	27.0
Control	3.4	7.4	14.6	43.7	583**	0.4	59.5	19.9	33.5	14.1	7.2	10.7	62.8	16.0	21.2
AgN	3.2	7.5	14.7	44.3	609***	0.4	58.8	19.6	33.3	14.2	7.3	10.2	62.1	17.2	20.7

ANOVA 2 vías, $F_{\alpha < 0.05} = 0.9746$. Los valores de $p < 0,01$ ** y $p < 0,0001$ *** se consideraron significativos.

Tabla 3

Biometrías hemáticas de ratas Wistar adultas, medidas de permanencia 1 año AgN

Grupo	LEU x 10 ³	ERI x 10 ⁶	Hb g/dl	Htc %	PLT x 10 ³	PCT %	VCM m ³	HCM pg	CHCM g/dl	IDE %	MPV m ³	IDP %	LIN %	MON %	GRA %
Basales	2.6	7.3	14.9	45.8	540.3	0.4	59.8	20.4	34.3	13.5	7.4	7.5	59.2	13.8	27.0
Control	3.23	5.64	10.95	31.53	502.7 **	0.38	56.3	19.8	35.1	16.18	7.5	10.9	44.17	16.03	29.8
AgN	2.5	6.7	13.5	38.8	550.3	0.413	57.8	20.2	34.9	15.5	7.6	12.8	63.9	16.8	19.3

ANOVA 2 vías, $F_{\alpha < 0.05} = 0.1628$, los valores de $P < 0.01$ ** se consideraron significativos.

El peso de las ratas indica la nutrición de estas, por lo que se encuentra está directamente relacionado con su estado de salud. Se graficaron los pesos de las ratas, como se muestra en la siguiente grafica (Figura 3 5), tanto las ratas controles como las experimentales mantuvieron pesos muy similares.

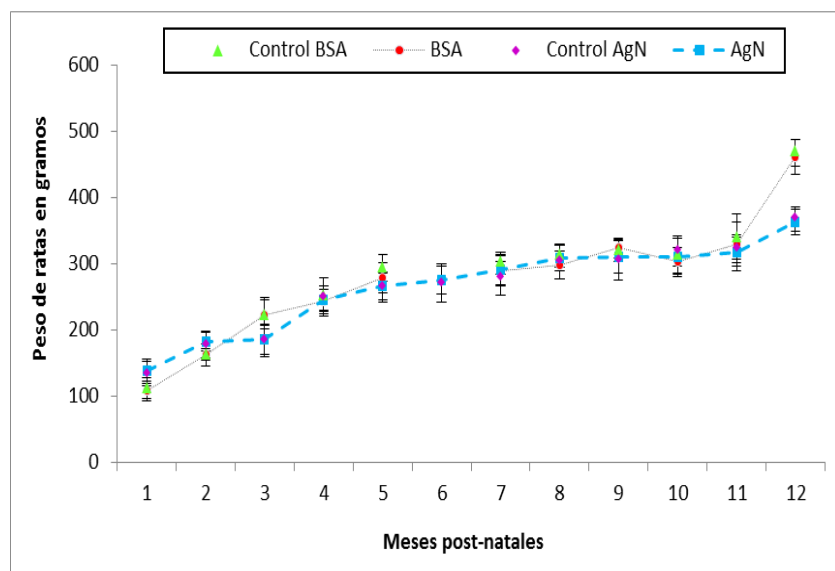


Figura 3 5. Evaluación post-inducción del estado de salud de las ratas Wistar. Se grafican promedios de pesos en gramos \pm DESVEST en el eje de las ordenadas y en el eje de las abscisas indica los meses de edad.

En la siguiente gráfica mostramos los resultados de las evaluaciones conductuales de motilidad observados mediante grabaciones semanales. Los valores son bajos, ya que no se

presentaron casos de respuesta de autoinmunidad a los AgN inoculados en la cámara anterior, ni en las pruebas posteriores de HTR.

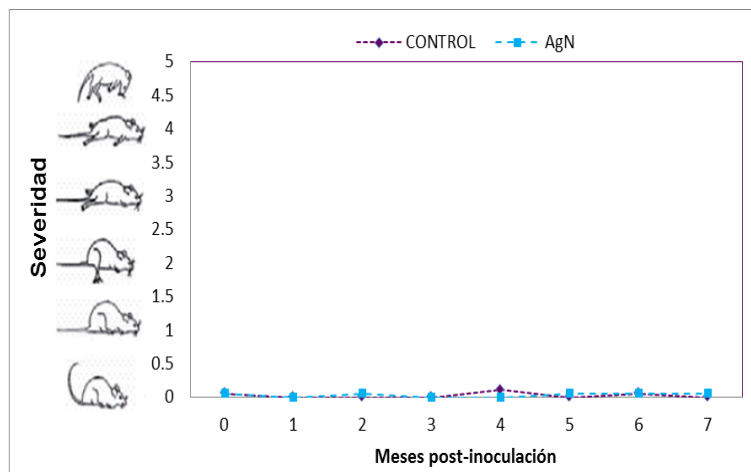


Figura 3 6. Evaluación de una enfermedad autoinmune por medio de evaluaciones motoras. La figura muestra las puntuaciones clínicas promedio por grupo. El cuadrado con la línea punteada pertenece a los AgN y el rombo con la línea punteada purpura pertenece a los controles utilizando una escala de puntuación publicado previamente reportado (79, 80).

DISCUSIÓN

Nuestro principal interés es desarrollar una estrategia de inmuno-modulación que instruya al sistema inmunológico de animales jóvenes a tolerar a AgN, evitando la patología autoinmune secundaria o una enfermedad neurodegenerativa. Un elemento fundamental para garantizar la eficacia de este tratamiento neuroprotector es el mantenimiento de la inmuno-tolerancia a lo largo de la vida del animal. Nuestros resultados indican que es posible inducir inmuno-tolerancia sistémica a AgN con una sola inoculación del homogenado total en la CA en animales juveniles como ha sido descrito previamente en un modelo murino (5, 18, 30, 57) y adultos en no inmuno-deprimidos (28 y 56). Bascom y colaboradores (2015) encontraron que la tolerancia solo se puede generar durante una pequeña ventana de tiempo (animales neonatos en los primeros 4 días post-natales) donde el sistema inmunológico tiene una respuesta reguladora ante los Ags con los que se enfrenta. Nuestros resultados muestran que la inducción de tolerancia por medio de DIACA es un mecanismo más eficiente en tanto incorpora varias formas de inducir tolerancia inmunológica como: la anergia clonal, la delección clonal, aborto clonal e ignorancia clonal, las cuales regulan la respuesta inflamatoria que en conjunto conlleva a un edo. de tolerancia completa tanto en individuos juveniles como en adultos. Adicionalmente, encontramos que es posible inducir un estado de inmuno-tolerancia a un coctel de Ags medulares mediante DIACA. Trabajos previos han mostrado la inducción de DIACA únicamente para uno o dos Ags (5, 18, 28, 30). Sin embargo, en el contexto en el que se plantea el presente trabajo, resulta mucho más ventajoso inducir inmuno-tolerancia sistémica para el mayor número posible de auto-Ags presentes en el tejido nervioso con el fin de evitar la inflamación y la autoinmunidad

destruictiva después de una enfermedad neurodegenerativa. La permanencia de inmunotolerancia a AgN hasta el momento no había sido evaluada a través del tiempo, en el trabajo anteriormente reportado se midió la permanencia de inmunotolerancia hasta los 10 meses post-inducción para una sola proteína (BSA) (28). Los resultados del presente trabajo amplian nuestro reporte previo y muestran que en ratas Wistar el estado de inmunotolerancia a un coctel de auto-Ags complejo permanece al menos 1 año post-inducción. Estas evaluaciones son mucho más robustas e indican la inmunotolerancia por medio de DIACA podría durar toda la vida adulta sin requerir un refuerzo, por lo que este trabajo enriquecerá mucho a las investigaciones que se están realizando sobre enfermedades autoinmunes y/o neurodegenerativas donde utilizan tratamientos de inmunomodulación. Los resultados favorables de las medidas de salud mediante las biometrías hemáticas, las medidas de masa corporal y las evaluaciones de motilidad (observaciones video-grabadas) nos permiten proponer a DIACA como modelo de inducción de tolerancia a cualquier Ag o auto-Ag sin que desencadene una respuesta autoinmune, inflamatoria, inmunosupresora o de una neoplasia (las medidas de VSG son un útiles para medir neoplasias), ya que trabajos previos reportados (1-2, 24-25, 51-52), soportan la idea de que se puede inducir una EAE en ratones sanos con simples inmunizaciones, mientras que nuestro modelo de inducción de tolerancia no solo permanece en el tiempo, también evita que se desencadene una respuesta autoinmune.

CONCLUSIONES

- Las pruebas de HTR demostraron que las proteínas medulares en condiciones basales presentan antigenicidad (4, 21-25, 53).
- Se puede generar tolerancia por medio de DIACA tanto para proteínas únicas, como ya ha sido reportado (28), como para un coctel de proteínas.
- Los resultados de inducción de tolerancia en ratas adultas fueron muy similares a los obtenidos en juveniles, por lo que esta estrategia puede ser utilizada en cualquier etapa de la vida del individuo.
- La inmuno-tolerancia a AgN permanece hasta un año después de la inducción mediante DIACA.

En conjunto, nuestros resultados nos permiten ser optimistas y proponer la inducción de inmuno-tolerancia como un mecanismo potencial para evitar la extensión de la patología y favorecer la reparación tisular en enfermedades degenerativas que cursen con inflamación crónica. Actualmente estamos induciendo inmuno-tolerancia específica de AgN como estrategia preventiva y terapéutica en el establecimiento de la enfermedad degenerativa secundaria a la lesión traumática espinal y la lesión del nervio óptico.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES INTEGRADAS

En conjunto en nuestros resultados encontramos los siguientes hallazgos:

- Confirmamos que es posible inducir immuno-tolerancia por medio de DIACA con una sola exposición al Ag (1-2, 24-25, 51-52).
- Las pruebas de HTR demuestran que las proteínas medulares en condiciones basales presentan antigénicidad (4, 21-25, 53).
- Se puede generar tolerancia por medio de DIACA tanto para proteínas únicas, como ya ha sido reportado por Farooq y col. (2013 y 2014), como para un coctel de proteínas; lo cual, es más favorable para el tratamiento de las patologías autoinmunes con varios determinantes antigénicos
- Los resultados de inducción de tolerancia en ratas adultas fueron muy similares a los obtenidos en juveniles, por lo que esta es una estrategia que puede ser utilizada en cualquier etapa de la vida del individuo.
- La permanencia de tolerancia tanto en animales juveniles como en adultos se probó hasta los 8 meses post-inducción y encontramos que se mantuvo la tolerancia.
- En los grupos immuno-tolerizados que se les midió la tolerancia hasta los 8 meses sin retos intermedios presentaron medidas de inflamación menores debido a la memoria inmunológica que generaron las céls Tregs, lo cual generó una respuesta más rápida de tolerancia y reconocimiento de los Ags.
- También se midió la permanencia a AgN al año post-inducción, y se mantuvo dicha permanencia. Este es un resultado muy importante en el caso de usar DIACA como

un tratamiento preventivo para enfermedades autoinmunes en humanos, ya que un año de vida en ratas es equivalente a 30 años en humanos (55).

- Se midió el estado de salud de las ratas para evaluar si se desencadena una enfermedad autoinmune a AgN, neoplasias (por medio de la VSG) o un estado de inmunodepresión, nuestros resultados muestran que no hay riesgo de desencadenar algún tipo de patología asociada a la tolerancia por medio de DIACA.

LITERATURA CITADA

1. Farooq SM, Kumar A, Ashour HM. (2014). Eye-mediated immune tolerance to Type II collagen in arthritis-prone strains of mice. *J. Cell. Mol. Med.* 18 (12), pp. 2512-2518.
2. Farooq SM, Ashour HM. (2014). In vitro-induced cell-mediated immune deviation to encephalitogenic antigens. *Brain Behav Immun.* 1; 35:64-9.
3. Reynolds, A. D., R. Banerjee, J. Liu, H. E. Gendelman, and R. L. Mosley. (2007). Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease. *J. Leukoc. Biol.* 82: 1083–1094.
4. Peiris M, Monteith GR, RobertsThomson SJ, Cabot PJ. (2007). A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterization of intervention therapies. *J NeurosciMethods* 163 (2):245-54.
5. Hernández, A. S. (2009). Helper (TH1, TH2, TH17) and regulatory cells (Treg, TH3, NKT) in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin.* 5 Supl 1:1-5 - Vol. 5.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002). «24. The Adaptive Immune System». *Molecular Biology of the Cell* (4th edición). New York: Garland Science.
7. Regueiro JR, López Larrea C. (1997). *Inmunología. Biología y Patología del Sistema Inmune* (2ª Ed). Madrid, Editorial Médica Panamericana.
8. Roitt I, Brostoff J, Male D. (1998). *Immunology* (5th Ed.). London, Mosby.
9. Zouali M. (2001). *Immunological Tolerance: Mechanisms.* *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES / & Nature Publishing Group.*
10. Newton, K y Dixit, V. M. (2012). *Signaling in Innate Immunity and Inflammation.* *Cold Spring Harb Perspect Biol;* 4:a006049.

11. Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology*. USA, editorial Garland Science, 8th Edition, 892 págs.
12. Gallin, JI; Goldstein, IM; Snyderman, R. (1988). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, New York.
13. Stuart E. Turvey. X. (2010). Innate Immunity. *J Allergy Clin Immunol*; 125(2 Suppl 2): S24–S32.
14. Popovich PG, Yu JY, Whitacre CC. (1997). Spinal cord neuropathology in rat experimental autoimmune encephalomyelitis: modulation by oral administration of myelin basic protein. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:1323-1338.
15. Ransohoff, R. M. (2009). Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 31: 711–721.
16. Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J. V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D. R. Littman, M. L. Dustin, and W. B. Gan. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8: 752–758.
17. David, S., and A. Kroner. (2011). Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 12: 388–399.
18. Fleming J., Norenberg M., Ramsay D., Dekaban G., Marcillo A., Saenz A., Pasquale-Styles M, Dietrich W., Weaver L. (2006). The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129:3249-3269.
19. Zhang Z, Krebs CJ, Guth L (1997) Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Exp Neurol* 143:141-152.

20. Yoshimura A, Naka T, Kubo M (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 7:454-465.
21. Donnelly DJ, Popovich PG. (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 209:378-388.
22. Jones TB, Ankeny DP, Guan Z, McGaughy V, Fisher LC, Basso DM, Popovich PG. (2004). Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* 24:3752-3761.
23. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC. (1996a). Concept of autoimmunity following spinal cord injury: possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 45:349-363.
24. Esposito M, Ruffini F, Bellone M, Gagliani N, Battaglia M, Martino G. (2010). Rapamycin inhibits relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by both effector and regulatory T cells modulation. *J Neuroimmunol.* 220(1-2):52-63.
25. Peiris M, Monteith GR, RobertsThomson SJ, Cabot PJ. (2007). A model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice for the characterization of intervention therapies. *J NeurosciMethods.* 163(2):245-54.
26. McDonald J. (1999). Repairing the Damage Spinal Cord. The Consortium of the Christopher Reeve Paralysis Foundation. *Scientific American*, September, 1999.
27. Profyris C, Cheema S, Zang D, Azari M, Boyle K, Petratos S. (2004). Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* 15 (2004) 415–436.

28. Pelayo-Gómez, A. L., Talavera C, D. K., Martínez A, L., Secundino, J. M., Pineda S, J. U., Fuentes-Farías, A. L. & Meléndez Herrera, E. (2015). Inducción de inmuno-tolerancia sistémica como estrategia preventiva o terapéutica para trastornos degenerativos que cursan con inflamación crónica. *Acta Universitaria*, 25(NE-1), 39-43.
29. Cone RE, Chattopadhyay S, O'Rourke J. (2008). Control of delayed-type hypersensitivity by ocular-induced CD8+ regulatory T cells. *Chem Immunol Allergy* 94:138–149.
30. Xu Q, Lee J, Jankowska-Gan E, Schultz J, Roenneburg DA, Haynes LD, Kusaka S, Sollinger HW, Knechtle SJ, VanBuskirk AM, Tottealba JR, Burlingham WJ. (2007). Human CD4+ CD25 low adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance. *J Immunol* 178:3983–3995.
31. Chen, N., and E. H. Field. (1995). Enhanced type 2 and diminished type 1 cytokines in neonatal tolerance. *Transplantation* 59:933
32. Berrueta L y Salmen S. (2010). La tolerancia inmunológica a 50 años del Premio Nobel en Medicina y Fisiología: Una perspectiva como mecanismo de respuesta inmune frente a patógenos. Instituto de Inmunología Clínica, Venezuela. *Invest Clin* 51(2): 159 – 192.
33. Forrester JV, Xu H, Lambe T, Cornall R. (2008). Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol* 1:372.
34. Medawar, P. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29, 58–69
35. Sarzotti, M., D. S. Robbins, and P. M. Hoffman. (1996). Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science* 271:1726.

36. Siegris C-A. 2001. Neonatal and early life vaccinology. (2001). Elsevier Science Ltd. Vaccine 19:3331–3346.
37. Weisser S. , Van Rooijen N, Sly L. (2012). Depletion and Reconstitution of Macrophages in Mice. J. Vis. Exp. (66), e4105.
38. O’Neill, E.J., Sundstedt, A., Mazza, G., Nicolson, K.S., Ponsford, M., Saurer, L., Streeter, H., Anderton, S. y Wraith, D.C. (2004). Natural and Induced Regulatory T Cells. Ann. N.Y. Acad.Sci. 1029, 180-192.
39. Mestecky, J., Russell, M. W. y Elson, Ch. O. (2007). Perspectives on Mucosal Vaccines: Is Mucosal Tolerance a Barrier? The Journal of Immunology, vol. 179 no. 9 5633-5638.
40. Benhar I, London A, Schwartz M. (2012). The privileged immunity of immune privileged organs the case of the eye. Frontiers in Immunology 3:296.
41. Strelein, J. W. (2003). Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. Journal of Leukocyte Biology Volumen 74.
42. Hori J. (2008). Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. j oculbiol dis inform 1:94–100.
43. Bhowmick, S., Clark, R., Brocke, S., Cone, R. (2011). Antigen-specific splenic CD41 and CD81 regulatory T cells generated via the eye, suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase. Japanese Society for Immunology. International Immunology, 23 (2): 119–128.
44. Biro, Daniel. (2008). Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior. Vet Clin Small Anim 38: 309–321.

45. Cone R, Pais R. (2009). Anterior chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): An Acute Response to Ocular Insult protects from Future Immune-Mediated Damage?. *Ophthalmology and Eye Diseases* 2009:1 33–40.
46. Niederkorn, J. H. (2009). Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert Rev Clin Immunol.* 3; 5(2): 137–144.
47. Niederkorn, J. Y., Kaplan, H. J. (2007). *Immune Response and the Eye. Chemical Immunology and Allergy. Editorial KARGER. Nueva York. Vol. 92. ISBN 978-3-8055-8187-5.*
48. Powell, T. J., and J. W. Streilein. (1990). Neonatal tolerance induction by class II alloantigens activates IL-4-secreting, tolerogen-responsive T cells. *J. Immunol.* 144:854.
49. Marinovic M A. (2010). *Inmunología ocular. I Rev. chil. Reumatol.* 26(3):222-241.
50. Ayer, R. E., Jafarian, N., Chen, W., Applegate, R. L., Colohan, A. R. T., & Zhang, J. H. (2012). Preoperative mucosal tolerance to brain antigens and a neuroprotective immune response following surgical brain injury: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery*, 116(1), 246–253. <http://doi.org/10.3171/2011.8.JNS11883>.
51. Farooq S, Ashour H. (2013). Eye-Mediated Induction of Specific Immune Tolerance to Encephalitogenic Antigens. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19: 503-510.
52. Safavi, F., Li, H., Gonnella, P., Rose Mari, E., Rasouli, J., Xian Zhang, G., Rostami, A. (2015). C-kit plays a critical role in induction of intravenous tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunologic Research* 61(3): 294.

53. Anderson, K., Olson, K., Estes, K., Flanagan, K., Gendelman, H., Mosley R. 2014. Dual destructive and protective roles of adaptive immunity in neurodegenerative disorders. *Transl Neurodegener*, 3(1):25.
54. Gil-Dones F, Alonso-Orgaz S, Avila G, Martin-Rojas T, Moral-Darde V, Barroso G, Vivanco F., Scott-Taylor J, Barderas M. 2009. An Optimal Protocol to Analyze the Rat Spinal Cord Proteome. *Biomark Insights*. 2009; 4: 135–164. Published online Oct 28.
55. Adami, N., Freitas E., Araújo, M., M., Lopes, L. 2012. Rat's age versus human's age: what is the relationship?. *ABCD, arq. bras. cir. dig.* vol.25 no.1 São Paulo Jan./Mar.
56. Scharschmidt T., Vasquez K., Truong H., Gearty S., Pauli M., Nosbaum A., Gratz I., Otto M., Moon J., Liese J., Abbas A., Fischbach M., Rosenblum M. (2015). A wave of regulatory T cells into neonatal skin mediates tolerance to commensal microbes. *Immunity* 17 (11); 43:1011.
57. Bascom, R., Tao, K., Tollenaar, S., West, L. (2015). Imaging Tolerance Induction in the Classic Medawar Neonatal Mouse Model: Active Roles of Multiple F1-Donor Cell Types. *American Journal of Transplantation* 15: 2346–2363.
58. Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. (1987). De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. *Porrua, Leyes y Códigos de México, México*, 423-4.

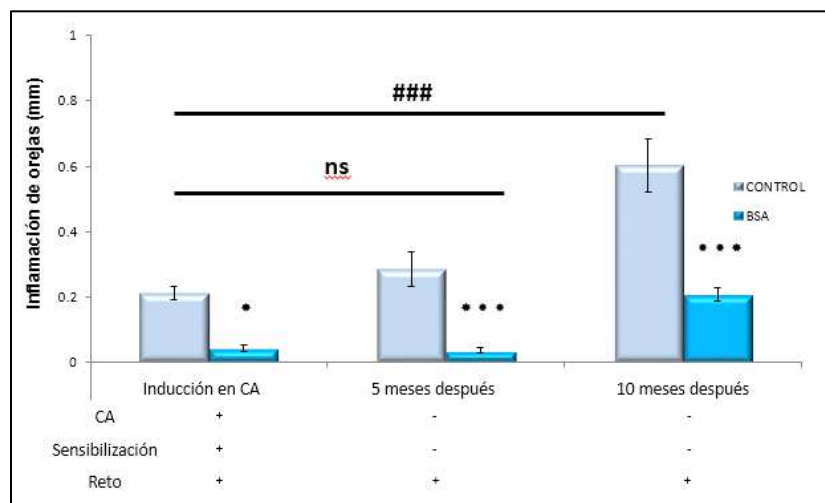
PAGINAS WEB CONSULTADAS

Salud Visual. 2007. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA: medios refringentes.

<http://saludvisual.info/anatomia-y-fisiologia/medios-refringentes/> (Accesada en enero 2015).

ANEXOS

Anexo 1.



La inmuno-tolerancia a BSA permanece al menos hasta los diez meses de vida en ratas inoculadas en la cámara anterior (CA) en la etapa juvenil aún después de varios retos. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 48 horas después del reto con respecto a la línea base (prueba de hipersensibilidad retrasada), quince días después de la inoculación en CA (A), y cinco (B) y diez meses después (C) en los mismos animales. Nótese que aún cuando la Δ de inflamación va incrementando en los diferentes retos, la atenuación de la inflamación se mantiene en el grupo BSA con respecto al grupo control. Los signos + en la tabla inferior indican las fases realizadas para cada experimento. Se grafican promedios de inflamación \pm ES, $n=9$ por grupo. Los valores de $**p < 0,01$ se consideraron significativos y los valores de $***p < 0,001$ se consideraron altamente significativos.

Anexo 2.

Tablas de las biometrías hemáticas completas, incluyen valores de VSG (velocidad de sedimentación globular).

Tabla 1. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas Wistar juveniles sin ningún tratamiento, incluye valores de VSG

BASALES 2 MESES					
# DE RATA	1	2	3	5	Promedio
LEU x 10 ³	3.8	6	4.7	7.6	5.525
ERI x 10 ⁶	7.11	7.13	7.09	7.94	7.3175
HB g/dl	15	14.7	15.8	17.6	15.775
HTC %	45.3	44.4	47.8	50.4	46.975
PLT x 10 ³	418	394	507	546	466.25
PTC %	0.316	0.292	0.397	0.422	0.357
VCM m ³	64	62	67	64	64.25
HCM pg	21	20.6	22.3	22.1	21.5
CCMH g/dl	33	33	33.1	34.8	33.475
IDE %	13.9	14.7	14.9	13.3	14.2
VPM m ³	7.5	7.4	7.8	7.7	7.6
IDP %	9.6	8.4	10.8	10.8	9.9
DIF					
LIN x10 ³ /mm ³	2	3.6	2.8	5.2	3.4
MON x10 ³ /mm ³	0.6	1	0.8	1	0.85
GRA x10 ³ /mm ³	1.2	1.4	1.1	1.4	1.275
LIN %	54.1	60.4	59.9	70	61.1
MON %	17.6	17.1	18	15.4	17.025
GRA %	28.3	22.5	22.1	14.6	21.875
VSG 1hr (mm)	1.5	1	1	1	
VSG 2hr (mm)	2	2	1	1.5	

Tabla 2. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas Wistar juveniles inoculadas en CA, incluye valores de VSG									
AgN 2 MESES									
	Ratas control (PBS)					Ratas experimentales (AgN 60 ug)			
Rata	2	3	4	5	Promedio	6.8	16.3	11.3	Promedio
LEU x 10 ³	8.8	10.5	10.5	11.9	10.425	6.15	6.97	6.37	11.47
ERI x 10 ⁶	6.61	6.62	6.2	5.96	6.3475	14	15.2	14	6.50
HB g/dl	14	14.4	14.5	13.2	14.025	42.3	48.6	43.4	14.40
HTC %	43	43.4	43.3	39.4	42.275	567	471	678	44.77
PLT x 10 ³	409	695	511	699	578.5	0.523	0.517	0.679	572.00
PTC %	0.384	0.611	0.485	0.7	0.545	69	70	68	0.57
VCM m ³	65	66	70	66	66.75	22.7	21.8	22.1	69.00
HCM pg	21.2	21.7	23.5	22.2	22.15	33	31.3	32.4	22.20
CCMH g/dl	32.7	33.1	33.5	33.5	33.2	13.8	13.7	14.4	32.23
IDE %	15.7	14.6	13.6	14.5	14.6	9.2	11	10	13.97
VPM m ³	9.4	8.8	9.5	10	9.425	12.6	15.3	12.5	10.07
IDP %	10.5	11.6	13.1	12.7	11.975				13.47
DIF						4.7	10.5	6.9	
LIN x10 ³ /mm ³	6.9	7.6	7.8	8	7.575	1.3	2.6	2.2	7.37
MON x10 ³ /mm ³	1.1	1.4	1.8	1.9	1.55	0.8	3.2	2.2	2.03
GRA x10 ³ /mm ³	0.8	1.5	0.9	2	1.3	69.8	64.8	62.1	2.07
LIN %	78.3	72.5	74.8	67.8	73.35	19.6	16	19.9	65.57
MON %	12.6	13.4	17.8	16.1	14.975	10.6	19.2	18	18.50
GRA %	9.1	14.1	7.4	16.1	11.675	0.5	0.5	0.5	15.93
VSG 1hr (mm)	0.5	0.5	2	0.5		1	1	1	
VSG 2hr (mm)	0.6	1	2.5	1		6.8	16.3	11.3	

Tabla 3. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas Wistar juveniles inmunizadas, incluye valores de VSG										
INMUNIZADAS con AgN y PBS 2 MESES										
	Ratas control (PBS)					Ratas experimentales (AgN)				
Rata	1	2	4	5	Promedio	1	3	4	5	Promedio
LEU x 10 ³	10.7	11.1	13.9	9.2	11.23	11.5	8.9	12.8	16.3	12.37
ERI x 10 ⁶	6.28	6.33	6.5	6.88	6.498	6.6	6.53	6.6	6.59	6.58
HB g/dl	14.3	14.5	14.1	15	14.47	14.7	14.6	15.2	14	14.6
HTC %	41.8	45.2	42.4	46.1	43.8	46.5	45.1	46	45.8	45.8
PLT x 10 ³	310	603	536	652	525.25	652	567	604	552	593.7
PTC %	0.265	0.539	0.547	0.63	0.495	0.55	0.532	0.601	0.542	0.556
VCM m ³	67	71	65	67	67.5	70	69	70	69	69.5
HCM pg	22.8	22.9	21.7	21.7	22.28	22.3	22.4	23.1	21.3	22.2
CCMH g/dl	34.2	32.1	33.2	32.5	33	31.7	32.5	33.1	30.7	32
IDE %	14.2	14	15.4	13.2	14.2	14.3	14.2	14.2	14.4	14.28
VPM m ³	8.5	8.9	10.2	9.7	9.325	8.4	9.4	9.9	9.8	9.38
IDP %	14.4	12	12.2	13.3	12.98	11.5	12.1	12	12.4	12
DIF										
LIN x10 ³ /mm ³	5.8	7.6	9.7	6.2	7.325	8.2	6.5	9.6	9.6	8.475
MON x10 ³ /mm ³	1.4	1.7	2.1	1.4	1.65	1.5	1.1	1.6	2.8	1.75
GRA x10 ³ /mm ³	3.5	1.8	2.1	1.6	2.25	1.8	1.3	1.6	3.9	2.15
LIN %	54.8	68.6	70.6	67.7	65.42	71.5	73.8	74.9	59.3	69.88
MON %	13.6	15.9	15.8	15.2	15.12	13.5	12.8	13.1	17.5	14.23
GRA %	31.6	15.5	13.6	17.1	19.45	15	13.4	12	23.2	15.9
VSG 1hr (mm)	0.5	1	0.5	1		1	0.5	2	1	
VSG 2hr (mm)	1	4	1	2		2	1.5	2.5	2	

Tabla 4. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas Wistar juveniles retadas con AgN, incluye valores de VSG

RETO AgN 2 MESES					
# DE RATA	1	2	3	4	Promedio
LEU x 10 ³	6.3	4.4	4.5	5.3	5.13
ERI x 10 ⁶	7.1	7.44	7.87	6.85	7.32
HB g/dl	15.6	16.6	16.6	15.1	15.98
HTC %	47.4	47.2	51.6	45.3	47.88
PLT x 10 ³	445	462	452	334	423.3
PTC %	0.362	0.36	0.34	0.266	0.332
VCM m ³	67	64	66	66	65.75
HCM pg	21.9	22.3	21.1	22.1	21.85
CCMH g/dl	32.8	35.1	32.3	33.4	33.4
IDE %	13.7	13.4	13.6	13.7	13.6
VPM m ³	8.1	7.8	7.5	8	7.85
IDP %	10.8	11.7	9.3	8.8	10.15
DIF					
LIN x10 ³ /mm ³	3.9	2.6	2.3	3.4	3.05
MON x10 ³ /mm ³	1.1	0.6	1.1	0.6	0.85
GRA x10 ³ /mm ³	1.3	1.2	1.1	1.3	1.23
LIN %	62.6	61.4	52.3	65.1	60.35
MON %	17.7	16.4	25.4	11.9	17.85
GRA %	19.7	22.2	22.3	23	21.8
VSG 1hr (mm)	0.5	1	1	1.5	
VSG 2hr (mm)	1	1	1.5	2	

Tabla 5. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas Wistar adultas sin ningún tratamiento, incluye valores de VSG

BASALES 9 MESES					
# DE RATA	Heparina		EDTA		Promedio
	1	2	1	2	
LEU x 10 ³	3.1	2.7	2.6	2	2.6
ERI x 10 ⁶	6.73	7.88	6.81	7.8	7.305
HB g/dl	14.1	15.6	14.5	15.3	14.875
HTC %	41	54.7	41.3	46.1	45.775
PLT x 10 ³	449	433	624	655	540.25
PTC %	0.315	0.352	0.458	0.48	0.40125
VCM m ³	61	58	61	59	59.75
HCM pg	20.9	19.8	21.3	19.5	20.375
CCMH g/dl	34.4	34.2	35.1	33.3	34.25
IDE %	13.3	13.3	13.4	13.9	13.475
VPM m ³	7	8.1	7.3	7.3	7.425
IDP %	6.9	6.8	8.1	8.2	7.5
DIF					
LIN x10 ³ /mm ³	2.1	1.3	1.7	0.9	1.5
MON x10 ³ /mm ³	0.2	0.4	0.2	0.3	0.275
GRA x10 ³ /mm ³	0.8	1	0.7	0.8	0.825
LIN %	70.4	51.7	67.2	47.6	59.225
MON %	7.9	18.2	8.7	20.4	13.8
GRA %	21.7	30.1	24.1	32	26.975
VSG 1hr (mm)	1.5	2			
VSG 2hr (mm)	2	3			

Tabla 6. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas de permanencia de tolerancia a AgN, incluye valores de VSG										
AgN 50 ug 8 MESES										
Ratas control (PBS)						Ratas experimentales				
Rata	1	3	4	7	Promedio	3	7	8	9	Promedio
LEU x 10 ³	3.6	3.1	4.8	2.2	3.425	2.8	2.6	3.3	4.2	3.225
ERI x 10 ⁶	8.48	7.15	7.14	6.65	7.355	8.23	7.02	7.3	7.61	7.54
HB g/dl	16.2	14.1	14.6	13.6	14.625	15.4	13.8	14.6	15.1	14.725
HTC %	50	42.1	42.2	40.4	43.675	47	40.4	43.9	45.7	44.25
PLT x 10 ³	647	568	547	570	583	700	697	515	525	609.25
PTC %	0.525	0.377	0.372	0.414	0.422	0.516	0.516	0.367	0.379	0.4445
VCM m ³	59	59	59	61	59.5	57	58	60	60	58.75
HCM pg	19.1	19.8	20.4	20.4	19.925	18.7	19.6	20	19.9	19.55
CCMH g/dl	32.3	33.5	34.6	33.6	33.5	32.7	34.1	33.2	33.1	33.275
IDE %	13.9	14.1	14.5	13.8	14.075	13.7	14.4	14.1	14.6	14.2
VPM m ³	8.1	6.6	6.8	7.3	7.2	7.4	7.4	7.1	7.2	7.275
IDP %	12.5	8.6	10.3	11.5	10.725	11.5	9.4	9.6	10.3	10.2
DIF										
LIN x10 ³ /mm ³	2.5	1.8	2.9	1.2	2.1	2	1.5	1.9	2.3	1.925
MON x10 ³ /mm ³	0.4	0.5	0.6	0.4	0.475	0.4	0.4	0.5	0.7	0.5
GRA x10 ³ /mm ³	0.7	0.8	1.3	0.6	0.85	0.4	0.7	0.9	1.2	0.8
LIN %	70.1	59.5	62.3	59.4	62.825	72.3	60.2	60.2	55.6	62.075
MON %	13.3	18.7	13.1	18.9	16	15.7	17.3	16.9	19	17.225
GRA %	16.6	21.8	24.6	21.7	21.175	12	22.5	22.9	25.4	20.7
VSG 1hr (mm)	0.5	1	1	1		1	1.5	0.5	0.5	
VSG 2hr (mm)	0.5	2	2	2		1.5	2	1	1	

Tabla 7. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas de permanencia de tolerancia a AgN										
AgN 1 año										
Ratas control (PBS)						Ratas experimentales				
Rata	2	3	4	5	Promedio	1	2	3	5	Promedio
LEU x 10 ³	3.6	3.1	1.9	4.3	3.225	1.9	2.2	3.6	2.2	2.475
ERI x 10 ⁶	6.45	3.2	5.97	6.93	5.6375	6.47	6.5	7.17	6.66	6.7
HB g/dl	10.4	7.1	12.2	14.1	10.95	13.4	13.3	14.1	13.2	13.5
HTC %	31.6	19	34.5	41	31.525	37.7	38.5	40.6	38.2	38.75
PLT x 10 ³	1015	240	463	293	502.75	658	604	504	435	550.25
PTC %	0.815	0.161	0.31	0.253	0.38475	0.497	0.434	0.386	0.334	0.4128
VCM m ³	49	59	58	59	56.25	58	59	57	57	57.75
HCM pg	16.2	22.3	20.4	20.4	19.825	20.6	20.4	19.7	19.9	20.15
CCMH g/dl	33	37.5	35.3	34.5	35.075	35.4	34.5	34.8	34.7	34.85
IDE %	19.7	15	14.8	15.2	16.175	15.4	14.8	16.1	15.7	15.5
VPM m ³	8	6.7	6.7	8.6	7.5	7.6	7.2	7.7	7.7	7.55
IDP %	10.1	9.6	11.6	12.3	10.9	13	11.5	13.6	13.1	12.8
DIF										
LIN x10 ³ /mm ³	1.3	-	1.1	2.6	1.667	1.1	1.4	2.1	1.5	1.525
MON x10 ³ /mm ³	0.7	-	0.2	0.7	0.533	0.3	0.3	0.6	0.2	0.35
GRA x10 ³ /mm ³	1.6	-	0.6	1	1.067	0.5	0.5	0.9	0.5	0.6
LIN %	38.3	-	31.6	62.6	44.167	61.3	64.7	59.6	70	63.9
MON %	20.4	-	11.4	16.3	16.033	19.2	16.8	19.1	12.1	16.8
GRA %	41.3	-	27	21.1	29.8	19.5	18.5	21.3	17.9	19.3

Tabla 8. Datos de las biometrías hemáticas tomadas en ratas permanencia de tolerancia a BSA, incluye valores de VSG										
BSA 8 MESES										
Ratas control (PBS)						Ratas experimentales				
Rata	1	3	5	6	Promedio	1	2	3	4	Promedio
LEU x 10 ³	2	4.1	5	3	3.525	3.4	4.6	1.8	5.9	3.925
ERI x 10 ⁶	6.17	6.81	6.64	6.18	6.45	7.71	6.33	5.8	6.8	6.66
HB g/dl	12.8	13.3	13	12.7	12.95	14.9	13.2	12	13.4	13.375
HTC %	35.3	38.1	36.8	34.8	36.25	43	36.9	32.5	38.9	37.825
PLT x 10 ³	346	482	323	356	376.75	637	504	345	230	429
PTC %	0.255	0.372	0.242	0.267	0.284	0.484	0.395	0.247	0.215	0.33525
VCM m ³	57	56	55	56	56	56	58	56	57	56.75
HCM pg	20.8	19.5	19.6	20.5	20.1	19.4	20.9	20.7	19.8	20.2
CCMH g/dl	36.3	34.9	35.4	36.5	35.775	34.7	35.9	36.8	34.5	35.475
IDE %	15.3	14.5	15.7	14.4	14.975	16.1	15	15	14.8	15.225
VPM m ³	7.4	7.7	7.5	7.5	7.525	7.6	7.8	7.2	9.3	7.975
IDP %	10.9	13.2	11.3	10.8	11.55	12.2	13.3	10.7	11.4	11.9
DIF										
LIN x10 ³ /mm ³	1.4	2.3	3.1	2.1	2.225	2.2	3.1	1.4	3.1	2.45
MON x10 ³ /mm ³	0.2	0.6	0.7	0.4	0.475	0.5	0.7	0.1	0.8	0.525
GRA x10 ³ /mm ³	0.4	1.2	1.2	0.5	0.825	0.7	0.8	0.3	2	0.95
LIN %	72.4	57.2	62.8	72.6	66.25	67.1	67.8	78.5	52.6	66.5
MON %	14.8	16.6	14.8	15.3	15.375	15.8	16.9	10.3	14.6	14.4
GRA %	12.8	26.2	22.4	12.1	18.375	17.1	15.3	11.2	32.8	19.1
VSG 1hr (mm)	1	1.5	1	2		2	1	1	1.2	
VSG 2hr (mm)	1.5	1.5	1.5	2		2	1	1.2	1.2	

Anexo 3.

Tabla de los promedios de los pesos de las ratas Wistar a lo largo de 1 año

Pesos de las ratas hembra cepa Wistar a lo largo de 1 año									
Meses de vida	Control BSA		BSA		Control AgN		AgN		
	Media	Desv Est	Media	Desv Est	Media	Desv Est	Media	Desv Est	
1	111.6	17.6	109.3	12.9	134.1	18.7	138.0	18.1	
2	161.9	16.9	163.3	9.4	177.6	20.1	182.5	14.6	
3	221.3	28.2	223.6	22.1	183.7	23.3	76.5	23.0	
4	250.5	29.5	244.7	17.1	248.8	18.7	245.3	21.0	
5	293.5	20.2	278.8	22.5	265.0	21.8	266.4	21.2	
6	-	-	-	-	271.1	28.4	275.4	21.5	
7	301.3	16.1	290.3	23.8	279.0	25.3	291.3	22.0	
8	312.6	17.9	298.1	21.2	303.1	25.3	308.6	19.2	
9	320.0	16.3	324.0	15.2	305.2	29.3	310.3	24.3	
10	312.7	26.3	304.5	20.1	320.3	22.8	310.6	29.0	
11	338.7	36.4	329.9	32.6	323.2	16.7	317.0	26.6	
12	468.0	20.1	462.0	26.3	368.0	18.1	362.7	19.1	