

Tesis Doctoral

Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la neuritis óptica experimental

Aranda, Marcos Luis

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Aranda, Marcos Luis. (2018). Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la neuritis óptica experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6543_Aranda

Cita tipo Chicago:

Aranda, Marcos Luis. "Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la neuritis óptica experimental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6543_Aranda

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la neuritis óptica experimental

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área de Ciencias Biológicas

Lic. Marcos Luis Aranda

Directora de tesis: Prof. Dra. Ruth Estela Rosenstein

Consejera de Estudios: Prof. Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología
Experimental, Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina/CEFyBO,
Universidad de Buenos Aires, CONICET.

Buenos Aires, 2018

Fecha de defensa: 11 de Diciembre de 2018.

Desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la neuritis óptica experimental

La neuritis óptica (NO), una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del nervio óptico que puede provocar ceguera irreversible, es una de las neuropatías más frecuentes en la práctica oftalmológica. Al presente, no se dispone de estrategias terapéuticas suficientemente eficaces para el tratamiento de esta enfermedad. En este trabajo de tesis, desarrollamos un nuevo modelo de NO experimental (NOE) primaria a través de la microinyección de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el nervio óptico, que reproduce características centrales de esta enfermedad. Las consecuencias funcionales e histológicas de la NOE inducida por LPS podrían dividirse en una fase temprana caracterizada por alteraciones funcionales, reactividad de microglía/macrófagos y transporte anterógrado alterado; seguida de una fase tardía en la que se evidenció gliosis, desmielinización, pérdida de axones y de células ganglionares retinianas. Utilizando este modelo, evaluamos el potencial terapéutico de la melatonina y de un paradigma no invasivo, la exposición a ambiente enriquecido (AE) en el tratamiento de la NOE. Por primera vez, los resultados obtenidos demuestran que ambas estrategias son capaces de prevenir y reducir la progresión del daño funcional e histológico inducido por NOE. Finalmente, se analizó la contribución de la pérdida de integridad de la barrera hemato-encefálica y se demostró que el reclutamiento de monocitos desempeña un rol clave en etapas tempranas de daño de la vía visual inducida por NOE. En suma, estos resultados aportan información novedosa para la comprensión de los mecanismos involucrados en el daño inducido por NO y sugieren que tanto la melatonina, como la exposición a AE u otras estrategias destinadas a reducir el reclutamiento de monocitos en el nervio óptico podrían constituir nuevas estrategias terapéuticas para mejorar la función visual y consecuentemente la calidad de vida de pacientes con NO.

Palabras clave: neuritis óptica, nervio óptico, células ganglionares retinianas, neuroinflamación, lipopolisacárido bacteriano, melatonina, ambiente enriquecido, barrera hemato-encefálica, glía, monocitos.

Development of new therapeutic strategies for the treatment of experimental optic neuritis.

Optic neuritis (ON), an inflammatory and demyelinating disease of the optic nerve that can cause irreversible blindness, is one of the most frequent neuropathies in ophthalmological practice. At present, there are no therapeutic strategies sufficiently effective for the treatment of this disease. In this thesis, we developed a new model of primary experimental ON (EON) through the microinjection of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in the optic nerve, which reproduces central features of this disease. The functional and histological consequences of EON induced by LPS could be divided into an early phase, characterized by functional alterations, reactivity of microglia/macrophages and altered anterograde transport; followed by a late phase in which gliosis, demyelination, axons and retinal ganglion cells loss were evidenced. Using this model, we evaluated the therapeutic potential of melatonin and a non-invasive paradigm, the exposure to enriched environment (EE) in the treatment of EON. For the first time, the results obtained show that both strategies are able to prevent and reduce the progression of functional and histological damage induced by EON. Finally, the contribution of the blood-brain barrier disruption was analyzed and it was demonstrated that the recruitment of monocytes plays a key role in early stages of the visual pathway damage induced by EON. In summary, these results provide novel information for the understanding of the mechanisms involved in ON-induced damage and suggest that both melatonin, as well as exposure to AE or other strategies aimed at reducing the recruitment of monocytes in the optic nerve could be new therapeutic strategies to improve visual function and consequently the quality of life of patients with NO.

Key words: optic neuritis, optic nerve, retinal ganglion cells, neuroinflammation, bacterial lipopolysaccharide, melatonin, enriched environment, blood-brain barrier, glia, monocytes.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años muchas han sido las personas que directa o indirectamente han escrito y transitado esta tesis conmigo. Quiero dejar constancia de todas ellas y de esta manera sencilla, y quizás escasa, agradecerles haber tenido el placer de contar con su compañía.

- Al Estado Argentino por otorgarme las becas que posibilitaron la realización de este trabajo de tesis a través de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

- A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires; y al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), por brindarme un ámbito propicio para realizar esta tesis.

- A Ruth por TODO. Por su dirección, por su sabiduría, por sus valores y por su inagotable amor por la ciencia. Por hacerme mejor persona y por alentarme a sacar lo mejor de mí por dentro y fuera del laboratorio. Por su presencia incondicional en lo laboral y en lo personal. Por transmitirnos a todos/as nosotros/as la humildad de los/as grandes. Fue un placer y un orgullo enorme haber formado parte de su grupo de trabajo. GRACIAS.

- A los integrantes del NROE actual: Inés, Moni, Pablo, Damián, Flor, Hernán, Agustina, Julián, Florcita, Mariano y Luis. Por su conocimiento, experiencia, compañerismo y amistad. Por los consejos, las discusiones, las recomendaciones, sinceridad y paciencia. Gracias por acompañarme desde el principio hasta lo último y por hacer sentir el laboratorio como mi propia casa.

- A los ex integrantes del NROE: Nuria, Nico, Diego, Maga, Ezequiel, Melina y Georgie. Por su experiencia, por sus recomendaciones y aportes aún a la distancia. Por hacerme sentir como uno más del grupo desde el principio.

- A los integrantes presentes y pasados del LEM: Cora, Memi, Matías, Salva, Silvia, Martín, Lili, Carolina y Morena. Por el intercambio de ideas, yerba, herramientas y dudas. Por su amistad.
- A los integrantes del CEFyBO. Especialmente a los integrantes del Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, dirigido por la Dra. Ana María Franchi; y al Laboratorio de Inmunomoduladores y Regeneración de Órganos, dirigido por el Dr. Eduardo Chuluyán.
- Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México. Principalmente al Laboratorio de Conectividad Cerebral dirigido por el Dr. Luis Concha. Por su vasta experiencia, por recibirme y permitirme trabajar en colaboración. Por alentarme a empezar a navegar el mundo de la “Neuroimagen”. Por su hospitalidad y por todos los hermosos recuerdos y amistades que me dejó México.
- A la Cátedra de Química Biológica Patológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Especialmente a la Dra. Juana Pasquini, a la Dra. Victoria Rosato Siri, a Eugenia Guitart y a Gonzalo Piñero.
- A grandes personas que me compartieron su amistad en este camino: Flor, Memi, Vicki y Manu. Gracias por todo, es un placer tener amigos como ustedes.
- A mis amigos de Exactas, Tres Lomas y de San Andrés de Giles. Por acompañarme desde cerca o lejos todos estos años. Por sentir mis logros como si fueran suyos. Por siempre sentirlos cerca.
- Al Club Atlético River Plate por hacer que el fútbol sea, tanto como la ciencia, una de las pasiones más grandes que tengo.
- A mi nueva y hermosa familia: Rulos, Pipe y Fafi. Por su amor, incondicionalidad, respeto y confianza. Por elegir compartir esta etapa de la vida juntos y aventurarnos a vivir las que vienen. Gracias por todo.

- Por último a las personas que están desde el principio: a mis abuelos, tíos, primos y sobrinitos. Especialmente a mis padres Carlos y Adriana, y a mi hermana Ana y a Javier. Por su amor e incondicionalidad en todas las etapas de mi vida. No hubiera logrado nada sin ellos.

GRACIAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis forman parte de los siguientes artículos:

- Experimental optic neuritis induced by the microinjection of lipopolysaccharide into the optic nerve.
Aranda ML, Dorfman D, Sande PH, Rosenstein RE.
Experimental Neurology. 2015; 260: 30-41.
- Neuroprotective effect of melatonin in experimental optic neuritis in rats.
Aranda ML, González Fleitas MF, De Laurentiis A, Keller Sarmiento MI, Chianelli MS, Sande PH, Dorfman D, Rosenstein RE.
J. Pineal Res. 2016; 60:360–372.
- Therapeutic benefit of environmental enrichment on optic neuritis.
Aranda ML, González Fleitas MF, Dieguez HH, Milne GA, Devouassoux JD, Keller Sarmiento MI, Chianelli MS, Sande PH, Dorfman D, Rosenstein RE.
Neuropharmacology. 2017 Dec 9.

Y el siguiente manuscrito enviado para su consideración:

- Critical role of monocyte recruitment in optic nerve damage induced by experimental neuroinflammation.
Aranda ML, Guerrieri D, Piñero G, González Fleitas MF, Altschuler F, Dieguez HH, Keller Sarmiento MI, Chianelli MS, Sande PH, Dorfman D, Rosenstein RE.

ABREVIATURAS	1
---------------------	---

INTRODUCCIÓN

1. La vía visual	
1.1. Características generales	5
1.2. La retina	8
1.2.1. Células de Müller	11
1.3. El nervio óptico	12
1.3.1. Células microgliales	14
1.3.2. Astrocitos	15
1.3.3. Oligodendrocitos	17
1.4. Áreas cerebrales retino-receptivas	18
1.4.1. Colículo superior	18
1.4.2. Núcleo pretectal olivar	20
2. La neuritis óptica (NO)	21
2.1. Modelos experimentales de NO	22
2.2. Terapéutica de la NO	23
3. El lipopolisacárido bacteriano (LPS)	24
4. La melatonina	26
5. El ambiente enriquecido	28
6. Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)	31
7. La barrera hematoencefálica	32

OBJETIVOS	37
------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales	38
1.1. Ambiente estándar	38
1.2. Ambiente enriquecido	38
2. Microinyección en el nervio óptico	39
3. Tratamiento con melatonina	40
4. Estudio funcional de la vía visual	40
4.1. Electroretinografía escotópica	40
4.2. Potenciales visuales evocados	41
4.3. Reflejo pupilar consensual	42
4.4. Imágenes por resonancia magnética funcional	
4.4.1. Preparación de los animales	43
4.4.2. Estimulación fótica	44
4.4.3. Adquisición de las imágenes	44
4.4.4. Pre-procesamiento de datos funcionales	45
4.5. Estudio por imágenes de resonancia magnética sensibles a difusión	

4.5.1. Preparación del tejido.....	46
4.5.2. Adquisición de las imágenes.....	46
4.5.3. Análisis de las imágenes.....	46
4.6. Estudio conducutal por estimulación <i>looming</i>	47
5. Estudios de transporte de la subunidad β de la toxina colérica.....	48
6. Procesamiento histológico.....	50
6.1. Secciones semifinas.....	50
6.2. Obtención de cortes en parafina.....	50
6.3. Cortes por congelación.....	51
7. Análisis por inmunomarcación.....	
7.1. Inmunofluorescencia en secciones.....	51
7.2. Inmunofluorescencia en retinas en montaje plano.....	52
8. Procesamiento de imágenes y cuantificación.....	53
8.1. Análisis del nervio óptico.....	53
8.1.1. Evaluación morfométrica de cortes transversales de nervio óptico.....	53
8.1.2. Cuantificación de axones por Azul de Toluidina.....	53
8.1.3. Cuantificación de marcas inmunoreactivas.....	54
8.1.4. Estado de mielinización por tinción con <i>Luxol Fast Blue</i>	54
8.2. Análisis de la retina.....	
8.2.1. Evaluación morfométrica de cortes transversales de retina.....	55
8.2.2. Cuantificación de marcas inmunorreactivas en retinas.....	55
8.2.3. Cuantificación de células ganglionares en retinas en montaje plano.....	55
9. Cuantificación de leucocitos y temperatura corporal.....	56
10. <i>Western Blot</i>	56
11. Evaluación de los niveles de TNF- α en nervio óptico.....	57
12. Evaluación de los niveles de peroxidación lipídica en nervio óptico.....	58
13. Purificación de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real.....	58
14. Evaluación de los niveles de BDNF en nervio óptico.....	59
15. Tratamiento con ANA-12 (antagonista selectivo del receptor Trk-b).....	59
16. Análisis de la integridad de la barrera hematoencefálica.....	
16.1. Análisis de la permeabilidad vascular.....	59
16.2. Irradiación de animales.....	60
16.3. Quimeras WT-GFPp/WT.....	60
17. Digestión de nervio óptico y citometría de flujo.....	61
18. Tratamientos de etopósido y cloruro de gadolinio.....	62
19. Análisis estadístico.....	62

RESULTADOS

1. Desarrollo de un modelo de neuritis óptica experimental.....	63
1.1. Estudios funcionales.....	
1.1.1. Potenciales Visuales Evocados.....	63
1.1.2. Reflejo pupilar consensual.....	64
1.1.3. Transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica.....	66
1.1.4. Imágenes por resonancia magnética funcional.....	66

1.1.5.	Estudio por imágenes de resonancia magnética sensibles a difusión	68
1.1.6.	Estudio funcional por estímulo <i>looming</i>	68
1.2.	Estudios histológicos de nervio óptico	
1.2.1.	Estudio morfométrico (Hematoxilina / Eosina).....	69
1.2.2.	Estudios inmunohistoquímicos (Iba-1, ED1 y GFAP).....	70
1.2.3.	Densidad axonal y número de axones.....	71
1.2.4.	Mielinización	73
1.2.5.	Estudio de la ultraestructura (MET).....	74
1.3.	Estudios de la retina	
1.3.1.	Electrorretinogramas.....	75
1.3.2.	Estudio morfométrico (Hematoxilina / Eosina).....	75
1.3.3.	Estudios inmunohistoquímicos (Iba-1, ED1 y GFAP).....	76
1.3.4.	Cuantificación de número de células ganglionares (en montaje plano).....	77
2.	Efecto de la melatonina sobre la NEO	78
2.1.	Estudios funcionales	
2.1.1.	Potenciales Visuales Evocados	78
2.1.2.	Reflejo pupilar consensual	79
2.1.3.	Transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica	80
2.2.	Estudios histológicos de nervio óptico	
2.2.1.	Estudios inmunohistoquímicos (Iba-1, ED1 y GFAP).....	80
2.2.2.	Número de axones.....	81
2.2.3.	Mielinización	82
2.3.	Estudios histológicos de la retina.....	83
2.4.	Estudio del mecanismo de acción de la melatonina en la protección de la vía visual frente a NOE	84
2.5.	Post-tratamiento con melatonina.....	86
3.	Efecto de la exposición al ambiente enriquecido.....	87
3.1.	Estudios funcionales	
3.1.1.	Potenciales Visuales Evocados	87
3.1.2.	Reflejo pupilar consensual.....	88
3.1.3.	Transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica	89
3.2.	Estudios histológicos de nervio óptico	
3.2.1.	Estudios inmunohistoquímicos (pNFH, Iba-1, ED1 y GFAP).....	89
3.2.2.	Estado de mielinización y número de axones.....	91
3.3.	Estudios histológicos de la retina.....	93
3.4.	Estudios moleculares y de peroxidación lipídica	93
3.5.	Efecto de la exposición retrasada a AE	96
3.6.	Tratamiento con ANA-12	97
3.7.	Contribución del componente visual del AE en el tratamiento de la NEO	98
4.	Estudio de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE).....	99
4.1.	Análisis de la permeabilidad de la BHE.....	99

4.2. Análisis del infiltrado leucocitario en la NOE.....	100
4.3. Efecto de la microinyección de activador tisular del plasminógeno recombinante (rtPA) en el nervio óptico.....	102
4.4. Estudio de la participación de la quimiocina CCL2.....	103
4.5. Efecto de la depleción de monocitos de sangre periférica sobre la NOE.....	105
DISCUSIÓN	109
1. Desarrollo de un modelo de neuritis óptica experimental primaria.....	109
2. Efecto de la melatonina sobre la NOE.....	118
3. Efecto de la exposición al ambiente enriquecido sobre la NEO.....	122
4. Estudio de la integridad de la barrera hematoencefálica y el reclutamiento de células periféricas en la NEO.....	129
5. Reveses y victorias de esta tesis.....	134
6. Epílogo.....	135
REFERENCIAS	136

ABREVIATURAS

5-HT: serotonina

5-hidroxi-Trp: 5 - hidroxitriptofano

AA-NAT: arilalquilamina N-acetil transferasa.

AE: ambiente enriquecido.

AQP-4: acuaporina 4.

AS: ambiente estándar.

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.

BHE: barrera hematoencefálica.

BOLD: señal dependiente del nivel de oxígeno en la sangre.

Bm3a: proteína *homeobox* dominio POU 3A específica del cerebro.

CCG: capa de células ganglionares.

CCL-2: quimiocina con motivo C-C 2.

CEs: células endoteliales.

CGRs: células ganglionares retinianas.

CNE: capa nuclear externa.

CNI: capa nuclear interna.

CNO: cabeza del nervio óptico.

COX-2: ciclo-oxigenasa-2.

CPE: capa plexiforme externa.

CPI: capa plexiforme interna.

CS: colículo superior.

CTB: subunidad β de la toxina colérica.

DAPI: dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol.

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental.

ED1: glicoproteína de cadena corta lisosomal.

^{eGFP}*Wistar*: ratas *Wistar* homocigota para la proteína verde fluorescente.

EM: esclerosis múltiple.

ERG: electroretinograma de flash.

FA: fracción de anisotropía.

FR: fotorreceptores.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GDNF: factor de crecimiento derivado de células gliales.

GFAP: proteína glial fibrilar ácida.

GFP: proteína verde fluorescente.

H&E: hematoxilina-eosina.

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa.

Iba-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1.

IR: irradiación gamma.

IRMf: imágenes de resonancia magnética funcional.

LPS: lipopolisacárido bacteriano.

MB: membrana basal.

MBP: proteína básica de mielina.

MDA: malondialdehído bis-dimetilacetal.

MET: microscopía electrónica de transmisión.

MOG: glicoproteína de oligodendrocitos de mielina.

MT1: receptor para melatonina de tipo 1.

MT2: receptor para melatonina de tipo 2.

NEO: neuritis óptica experimental.

NF: neurofilamentos.

NFH: subunidad pesada de los neurofilamentos.

NFL: subunidad liviana de los neurofilamentos.

NFM: subunidad media de los neurofilamentos.

NGF: factor de crecimiento nervioso.

NGLd: núcleo geniculado lateral dorsal.

NGLv: núcleo geniculado lateral ventral.

NO: neuritis óptica.

NOp: nervio óptico

NOS-2: óxido nítrico sintasa 2.

NPO: núcleo pretectal olivar.

NSQ: núcleo supraquiasmático.

Opn 4: opsina 4.

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.

PCs: pericitos.

PLP: proteína proteolipídica.

PRRs: receptores de reconocimiento de patrones.

RP: reflejo pupilar.

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa.

rtPA: activador tisular del plasminógeno recombinante.

SAI: *stratum album intermediale*.

SAP *stratum album profundum*.

SE: segmentos externos de los receptores.

SEM: error estándar.

SGI: *stratum griseum intermediale*.

SGP: *stratum griseum profundum*.

SGS: *stratum griseum superficiale*.

SNC: sistema nervioso central.

SO: *stratum opticum*.

SZ: *stratum zonale*.

TJ: uniones estrechas.

TLRs: receptores de tipo *toll*.

TrkB: quinasa B relacionada con la tropomiosina.

Trp: triptófano.

Trp-hidroxilasa: triptófano hidroxilasa.

VEPs: potenciales visuales evocados.

INTRODUCCIÓN

1. La vía visual

La visión es el sentido en el que más confiamos los seres humanos para navegar por el mundo, tomar decisiones y realizar tareas complejas. Entender cómo vemos, por lo tanto, representa uno de los objetivos fundamentales de las Neurociencias.

1.1. Características generales

La luz llega al ojo, el órgano especializado en el procesamiento de la información visual, y en su componente fotosensible, la retina, es codificada en impulsos nerviosos. Esta información se transmite por fibras nerviosas que abandonan el ojo formando el nervio óptico (NOp). En la cavidad intracraneal, los NOps decusan en diferente proporción según la especie (Jeffery, 2001) a nivel del quiasma óptico. A partir del quiasma, los axones continúan por el tracto óptico hacia núcleos cerebrales visuales donde, en diferentes etapas, se procesa la información dando origen a la formación de imágenes visuales conscientes. También se ha demostrado la participación de la retina en procesos visuales no conscientes (denominado “sistema visual no formador de imagen”), a través de la transmisión de información fótica a otros centros del encéfalo que permiten la realización de tareas complejas, como la regulación de procesos ligados a los ritmos circadianos, los ciclos de sueño-vigilia, el aprendizaje, la adaptación del tamaño pupilar a la intensidad de luz ambiental (reflejo pupilar (RP)), y el estado de ánimo, entre otras (Berson y col., 2002; Fernandez y col., 2018; Hattar y col., 2002; 2006; Schmidt y col., 2011).

La pared del globo ocular está constituida por tres capas o túnica (Figura 1):

1. *Túnica externa-fibrosa o esclero-corneal*: formada por la esclera, el limbo esclerocorneal y la córnea.

2. *Túnica media-vascular, úvea o tracto uveal*: formada por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris.

3. *Túnica interna-nerviosa o retina*: formada por la porción de la retina fotosensible y el epitelio pigmentario, la porción de la retina no fotosensible, el epitelio del cuerpo ciliar y el epitelio del iris.

La túnica externa es una capa fibrosa y gruesa que provee protección a las estructuras internas del ojo y junto con la presión del humor acuoso (presión intraocular), le confieren forma y turgencia al globo ocular; es opaca en la mayor parte del globo ocular y se denomina esclera. Allí se insertan los músculos extrínsecos del ojo.

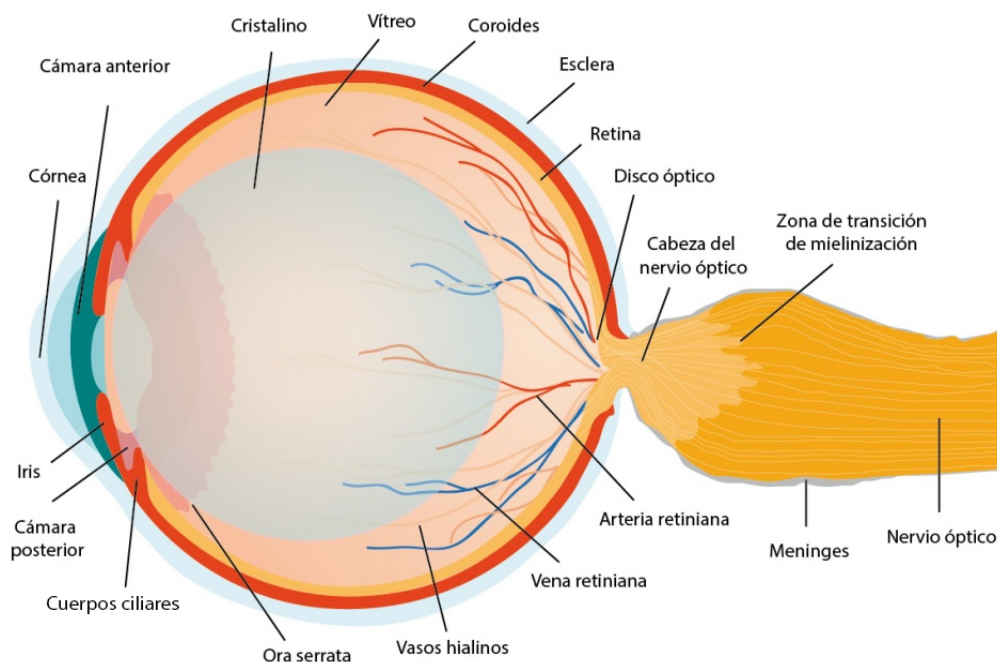


Figura 1. Esquema representativo de las distintas estructuras del ojo

En la salida del NOp en primates, la esclera se reduce a una membrana fenestrada, denominada lámina cribosa. Hacia la porción anterior, la túnica externa se diferencia en la córnea, una estructura transparente constituida por cinco capas. Las fibras colágenas del estroma (principalmente de tipo I) se disponen en forma hexagonal, lo que permite reducir la

distorsión en la entrada de luz al ojo y hace que la córnea sea la lente de mayor poder dióptrico. Una línea imaginaria entre la córnea y la esclera se denomina limbo esclerocorneal. La túnica media vascular aporta la nutrición, el mantenimiento de la retina externa y la esclera y la producción de humor acuoso, que nutre la porción interna de la córnea y el cristalino, ambos avasculares. Posee tres regiones diferentes: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. En el centro, el iris define un espacio circular, la pupila. Las células de la porción externa se diferencian en elementos contráctiles que se disponen radialmente formando el mioepitelio del músculo dilatador de la pupila. El otro músculo del iris es el esfínter de la pupila, de disposición circular. Ambos regulan el diámetro pupilar.

La retina es la capa más interna y es la porción del ojo sensible a la luz (Figura 2). Se extiende superficialmente sobre la coroides hasta la *ora serrata*, donde presenta un borde festoneado. Se encuentra firmemente unida en los bordes de la papila óptica, donde se continúa con el NOp y en los procesos de la *ora serrata*, donde se une a la coroides. Las complejas redes nerviosas que codifican la información visual envían impulsos a través de las fibras que se reúnen en el disco óptico y continúan hacia el cerebro a través del NOp.

Luego de atravesar la córnea, la luz pasa a través de dos cámaras antes de alcanzar la retina. La cámara anterior que contiene el humor acuoso, es una cavidad pequeña rodeada por la córnea, el iris y la porción central del cristalino. El humor acuoso es producido en las crestas del cuerpo ciliar (procesos ciliares) en la cámara posterior (región comprendida entre el iris y el cristalino).

El cristalino es un cuerpo biconvexo y elástico, rodeado por una cápsula y suspendido de la superficie interna del cuerpo ciliar por un ligamento circular, la zónula ciliar, que junto con el músculo ciliar, en determinadas situaciones, modifican la esfericidad del cristalino (fenómeno conocido como acomodación). El espacio entre la pared posterior del cristalino y la retina, denominado cuerpo vítreo, está formado por una matriz extracelular rica en agua,

ácido hialurónico, fibras colágenas, proteínas, glicoproteínas, y escasas células denominadas hialinocitos (Fawcett, 1995; Krstić, 1997; Williams y Warwick, 1992).

1.2. La retina

Como se mencionó anteriormente, la retina es el tejido fotosensible del ojo, donde se transforman las ondas electromagnéticas en estímulos nerviosos. La retina es una capa delgada constituida por más de 60 subtipos celulares (revisado por Masland, 2012), agrupados en los siguientes tipos: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amácrinas, células ganglionares retinianas (CGRs) y células gliales. En un corte transversal de retina se observan capas paralelas (Figura 2), que comenzando desde la más externa a la más interna son: 1. Epitelio pigmentario; 2. Segmentos externos e internos de los fotorreceptores (SE); 3. Membrana limitante externa; 4. Capa nuclear externa (CNE); 5. Capa plexiforme externa (CPE); 6. Capa nuclear interna (CNI); 7. Capa plexiforme interna (CPI); 8. Capa de células ganglionares (CCG); 9. Capa de fibras nerviosas y 10. Membrana limitante interna. Dispuesta en montaje plano, el área de la retina de la rata varía entre 55 y 60 mm² (Danias y col., 2002; Salinas-Navarro y col., 2009).

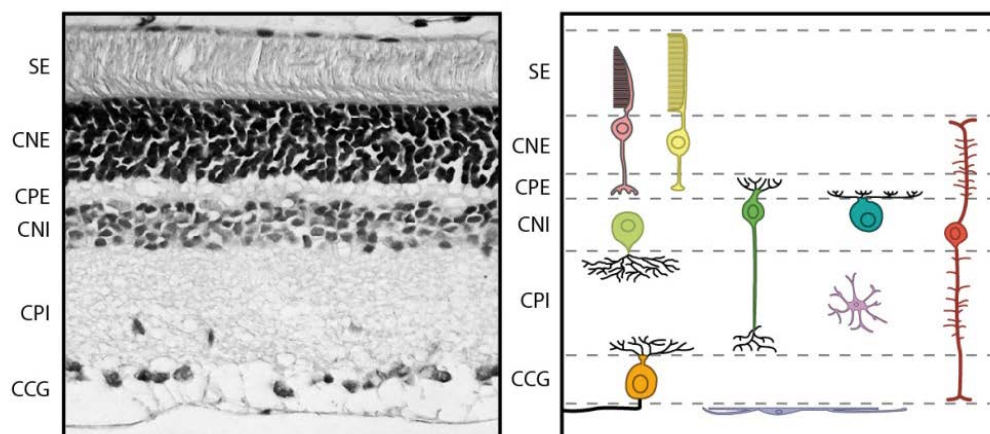


Figura 2. Esquema de las distintas células y capas de la retina. SE: Segmentos externos e internos de los fotorreceptores; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares.

El epitelio pigmentario está constituido por células que se originan en la capa externa de la copa óptica durante el desarrollo embrionario. Entre alguna de sus funciones, las células del epitelio pigmentario fagocitan los discos membranosos más distales de los segmentos externos de los fotorreceptores.

Los fotorreceptores de los vertebrados son células únicas en forma y función. Existen dos tipos de fotorreceptores clásicos: los conos y los bastones. Sus segmentos externos son la porción sensible a la luz y su morfología le da nombre a cada uno de ellos. Contienen el pigmento visual, así como los demás componentes de la cascada de fototransducción en la que participan diversos mensajeros, enzimas y canales iónicos. El segmento externo de los bastones está formado por discos membranosos apilados y rodeados por una membrana celular. En los conos, el segmento externo está constituido por numerosos pliegues de membrana apilados, que se abren al medio extracelular. En los discos de membrana se encuentra el pigmento visual: rodopsina en los bastones y conopsinas en los conos. En los conos de ratas, como en la mayoría de los mamíferos a excepción del humano, existen dos tipos de pigmentos: la opsina M que posee un máximo de absorción a 480 - 530 nm y la opsina S que es sensible a la luz azul y parte del espectro de radiación UV (máx 355 - 445 nm) (Hunt y col., 2009). En la mayoría de las especies de mamíferos, los bastones son aproximadamente 20 veces más numerosos que los conos, aunque la cantidad relativa de ambos tipos celulares varía marcadamente sobre la superficie de la retina (Masland, 2001). En el centro de la retina de primates (denominada mácula), se encuentra una región especializada, la fovea, donde la agudeza visual es máxima y se observan sólo conos.

Los fotorreceptores sinaptan a través de *synaptic ribbons* (también presentes en el sistema auditivo y vestibular) con células bipolares y horizontales en la CPE. Las células horizontales conectan los fotorreceptores con las células bipolares, estableciendo una vía indirecta en el flujo de información. Existen distintos tipos de células bipolares que pueden estar conectadas

exclusivamente a bastones o a conos. La CNI está constituida por los somas de células horizontales, bipolares y amácrinas. Estas últimas tienen numerosas dendritas y carecen de axón. Además de conectarse unas con otras, también sinaptan con terminales axónicas de células bipolares y dendritas de las CGRs. Esta región de contactos sinápticos se denomina CPI. La CCG está constituida por los somas de las CGRs cuyos axones convergen radialmente hacia el disco óptico, por donde las fibras abandonan el globo ocular. En la CCG se localizan también una cantidad variable según la especie de células amácrinas desplazadas, que en la rata, es cercana al 50% (Dantias y col., 2002).

Las células gliales de la retina se clasifican en células macrogliales y células microgliales. Entre las células macrogliales retinianas se encuentran los astrocitos, localizados en la porción más interna de la retina (capa de fibras, CCG y parte de la CPI) y las células de Müller, que se disponen transversalmente a través de todas las capas de la retina (desde los SE a la capa de fibras). La microglía se localiza principalmente en la CPI y se considera parte del sistema fagocítico mononuclear residente en la retina, así como en el resto del sistema nervioso central (SNC).

Al presente, se han descrito al menos 33 tipos diferentes de CGRs, cada uno de los cuales responde mejor a un aspecto particular de la escena visual (Baden y col., 2016). Según el tamaño del soma, las CGRs pueden clasificarse en: grandes ($>14\text{ }\mu\text{m}$, con ocasionales ganglionares gigantes $>17\text{ }\mu\text{m}$), medianas ($11 - 14\text{ }\mu\text{m}$) y pequeñas ($5 - 11\text{ }\mu\text{m}$). El número de CGRs en la rata varía entre 100.000 y 110.000 con un gradiente que disminuye radialmente desde el NOp hacia la periferia (Dantias y col., 2002; Salinas-Navarro y col., 2009).

En base a las conexiones anatómicas y funcionales entre los distintos tipos celulares retinianos, se considera que la información fluye a través de la retina siguiendo dos vías: una vía directa, desde los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las CGRs; y una indirecta, en el que las células horizontales se interponen entre los fotorreceptores y las

células bipolares y las amácrinas entre las bipolares y las CGRs. La vía directa de transmisión de información es altamente específica, en cambio, la vía indirecta es más difusa.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio de la vía directa del procesamiento de la información visual retiniana. El glutamato es liberado desde los FR a células bipolares y horizontales y desde las células bipolares a las CGRs y amácrinas. En oscuridad, el glutamato es liberado en forma tónica por los FR a la brecha sináptica y su liberación se interrumpe por la exposición a luz. Un conjunto variado de señales liberadas por células horizontales y amácrinas, que incluyen al ácido γ -aminobutírico (GABA), la glicina y la dopamina modulan la vía directa.

1.2.1. Células de Müller

Las células de Müller son las principales células gliales de la retina de vertebrados. Embriológicamente derivan de la glía radial y se extienden a través de todo el espesor de la retina, contactando con todos los somas y procesos de células retinianas. Entre las numerosas funciones de las células de Müller, se destacan: 1) su participación en el metabolismo de la glucosa y en el aporte de nutrientes a las neuronas, 2) la regulación del flujo sanguíneo y la participación en la formación y mantenimiento de la barrera hemato-retiniana interna, 3) la participación en procesos de comunicación neuronal, particularmente a través de la captación rápida del exceso de neurotransmisores y la liberación de precursores de neurotransmisores; 4) el control de la homeostasis de iones y agua y la regulación del pH extracelular, 5) la liberación de diversos factores que regulan la función retiniana y 6) la participación en procesos de reparación frente al daño retiniano (Bringmann y col., 2006). Además de estas múltiples funciones, las células de Müller son un sitio de producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), que es clave para la supervivencia de las CGRs (como se detallará más adelante). Frente a una alteración en la

homeostasis retiniana, las células gliales sufren un proceso de hipertrofia celular, denominado “gliosis”. Las células de Müller en la retina adulta no expresan la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) en condiciones normales, pero en un contexto de daño inducido por una amplia variedad de noxas (isquémica, inflamatoria u otras), se hace evidente la expresión de esta proteína en este tipo celular (Osborne y col., 1991; Wu y col., 2003).

1.3. El nervio óptico

El NOP es el II par craneal y está formado por los axones de las CGRs, células gliales (astrocitos, microglía y oligodendrocitos), la vasculatura, la barrera hematoencefálica (BHE) y las meninges. Los axones amielínicos de las CGRs proyectan al disco óptico por donde salen del ojo y forman el NOP a través de una apertura en la esclera, que en primates presenta una red de fibras de colágeno que constituye la lámina cribosa. Diversos estudios descartan la existencia de una lámina cribosa similar a la humana en ratones y ratas; en cambio, se observa una red compleja de procesos gliales orientados en forma transversal a los axones, estructura que recibe el nombre de lámina glial (Howell y col., 2007; Sun y col., 2009). En esta región, los núcleos gliales presentan una morfología en bastón en plano transversal y forman columnas perpendiculares al eje mayor del NOP. Los procesos primarios de los astrocitos organizan los axones en fascículos. Estos procesos son mayores en la región del NOP próxima a la retina y se vuelven más delgados y menos numerosos hacia la zona mielinizada. En ratas, la lámina glial se extiende aproximadamente entre 80 - 85 μm (en el eje longitudinal) hasta la zona de transición, donde se inicia la mielinización. A partir de esta región, se pierde la organización de los axones en fascículos y disminuye el número de astrocitos que presentan una morfología heterogénea. Las fibras de las CGRs se clasifican en tres tipos según su tamaño, siguiendo la clasificación de los somas (grandes, medianas y pequeñas) (Boycott y Wassle, 1974). En la retina de roedores no se ha observado ningún

patrón evidente en cuanto a la distribución de las CGRs, y consistentemente, no se ha observado retinotopía en las fibras del NOp (Baker, 1990). Se ha sugerido que la ausencia de retinotopía en el NOp podría deberse al cambio en la organización glial embrionaria (Guillery y Walsh, 1987). En los tractos ópticos, las fibras se organizan según el diámetro de los axones siendo las de mayor calibre de localización superficial, las medianas de posición más profunda y las pequeñas, en general, localizadas en posición próxima a la piamadre (capa de meninges más interna) (Reese, 1987). La mayoría de los axones de los NOps de rata son de calibre fino (cercano a $0,75\ \mu\text{m}$). Los axones de calibre superior a $2\ \mu\text{m}$ son infrecuentes y no se observan axones de diámetro superior a $5\ \mu\text{m}$ (Reese, 1987).

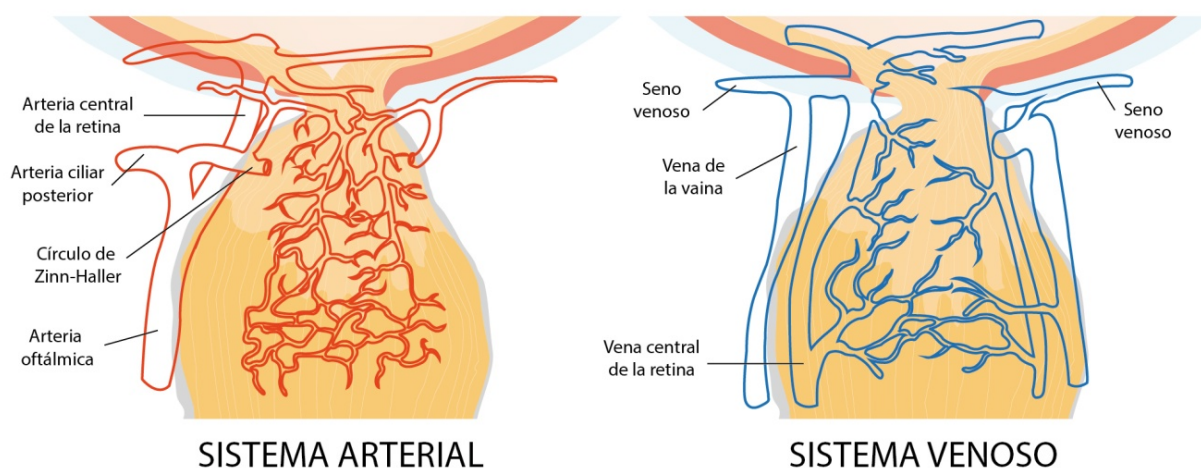


Figura 3. Representación esquemática del sistema vascular en la cabeza del NOp. Adaptado de Morrison y col. (1999).

El transporte anterógrado mediado por la proteína motora quinesina, es responsable del transporte de proteínas que son sintetizadas en el cuerpo de las CGRs y están asociadas a la estructura axonal y la transmisión sináptica. Existe un componente rápido ($50 - 400\ \text{mm/día}$) y uno lento ($0,3 - 8\ \text{mm/día}$). El transporte retrógrado mediado por la proteína dineína, participa en el transporte de factores que afectan el estado metabólico de las CGRs y es rápido ($200 - 400\ \text{mm/día}$) (Morgan, 2004). Los niveles de ATP y calcio juegan un rol clave en el transporte axonal. Los neurofilamentos (NF) constituyen otro componente fundamental

en la maquinaria del sistema de transporte axonal. Dependiendo de su peso molecular, se han descrito tres subunidades que conforman los NF: NFH (del inglés, NF-*heavy*), NFM (del inglés NF-*medium*), y NFL (del inglés NF-*light*). La fosforilación de la porción C-terminal, en especial de la cadena pesada del NF (pNFH), constituye un mecanismo de preservación de la estructura del axón maduro y de la regulación del transporte axonal (Shea y Chan, 2008).

1.3.1. Células microgliales. La microglía está presente en el sistema nervioso de organismos “primitivos” como sanguijuelas, caracoles, mejillones, insectos y crustáceos. Al presente, el origen evolutivo de la microglía es elusivo, pero los resultados obtenidos sobre la filogenia y la ontogenia de la microglía sugieren que su presencia es un beneficio evolutivo (Le Marrec-Croq y col., 2013; Sonetti y col., 1994). Las células microgliales derivan de células precursoras del saco vitelino y aparecen tan temprano como en el día embrionario 8 en el ratón (Ginhoux y col., 2010; Kierdorf y col., 2013; Schulz y col., 2012). Son células pequeñas, con núcleo denso, escaso citoplasma y prolongaciones finas con pequeñas espinas. Expresan la proteína de unión al calcio 1 (Iba-1) cuyos niveles aumentan en respuesta a ciertos estímulos. Forman parte del sistema de defensa innato del SNC (Kettenmann y col., 2013) y constituyen el 10% del total de células en el cerebro adulto (Aguzzi y col., 2013; Tremblay y col., 2011).

Mientras que la microglía a menudo se asocia a procesos neuroinflamatorios, a diferencia de los macrófagos derivados de médula ósea, el estado basal de la microglía es “tolerante” y pro-homeostático (Graeber y Streit, 2010). Frente a una perturbación de la homeostasis, la microglía ramificada retrae sus procesos finos y adquiere una morfología que se asemeja a la de macrófagos fagocíticos. Se asumió por mucho tiempo que esta transición morfológica en respuesta a la lesión pone a estas células “en acción”, por lo que este proceso se describió como “activación microglial”. En función de nuevas evidencias experimentales, este

concepto general y simple de “activación” de la microglía ha perdido validez. Actualmente, no sólo está claro que la microglía ramificada no es una célula en reposo, sino que también es evidente si la microglía responde a una variedad de estímulos, integrando múltiples señales en este estado (Aguzzi y col., 2013; Hanisch, 2013; Hellwig y col., 2013; Kettenmann y col., 2011; 2013; London y col., 2013; Prinz y Mildner, 2011). Además, las células microgliales pueden proliferar y migrar rápidamente hacia los sitios de daño (Karlstetter y col., 2010).

Teniendo en cuenta los diferentes fenotipos posibles, la microglía puede clasificarse en varios sub-estadios según su transcriptoma. Esta clasificación se rige por un rango jerarquizado según la expresión diferencial de genes, cuyos extremos son el fenotipo M1 (expresión de genes asociados a un estado pro-inflamatorio) y el fenotipo M2 (expresión de genes asociados a un estado anti-inflamatorio). Se han descrito varios fenotipos intermedios entre M1 y M2 (Cherry y col., 2014; Ransohoff, 2016; Tang y Le, 2016).

1.3.2. Astrocitos. Friedrich Merkel y Jacob Henle describieron redes de células estrelladas (probablemente astrocitos) en la materia gris y blanca de la médula espinal (Henle y Merkel, 1869). En 1893, el anatomista húngaro Mihály von Lenhossék las denominó “astrocitos” por su característica forma estrellada (Lenhossék, 1893). Inicialmente, la citoarquitectura de los astrocitos fue estudiada con técnicas de tinción de Golgi y posteriormente, mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión (MET), inmunomarcación e inyección de colorantes a nivel de célula única. Son células grandes y se caracterizan por tener en su citoplasma gran cantidad de haces de filamentos intermedios. En el siglo XIX, se describieron por primera vez dos clases de astrocitos, usando una nomenclatura que persiste en la actualidad: astrocitos fibrosos de la sustancia blanca y astrocitos protoplásmicos de la materia gris (Andriezen, 1893; Kölliker, 1889).

Los astrocitos protoplásmicos son células complejas con numerosos procesos finos, mientras que los astrocitos fibrosos son menos complejos, con menos ramificaciones (Oberheim y col., 2012). Los astrocitos participan en la regulación de las uniones estrechas de las células endoteliales de los capilares y vénulas que conforman la BHE y la barrera hemato-retiniana interna. Los astrocitos más superficiales emiten prolongaciones con pedicelos hasta contactar con la piamadre, lo que origina la membrana pial-glial.

Los astrocitos protoplásmicos están distribuidos de manera relativamente uniforme dentro de la materia gris cortical, mientras que los astrocitos fibrosos se organizan a lo largo de los tractos de materia blanca, dentro de los cuales se orientan longitudinalmente en el plano de los haces de fibras (Oberheim y col., 2012). Estos últimos emiten prolongaciones que contactan la membrana axonal en los nodos de Ranvier y suelen encapsular las sinapsis. De esta manera, la red compleja de procesos celulares permite un contacto directo de la astroglia con el soma, axones, dendritas y sinapsis neuronales, vasos sanguíneos y meninges. Entre sus múltiples funciones se encuentran: el sostén estructural y nutricional, la conformación de la BHE, la regulación del flujo sanguíneo, la modulación de la función sináptica, la participación en procesos de plasticidad, la captación de neurotransmisores, la homeostasis neuronal, el almacenamiento de glucógeno y la participación en procesos de reparación y cicatrización, entre otros (Allaman y col., 2011; Haydon, 2001; Iadecola y Nedergaard, 2007; Magistretti, 2006; Nedergaard y col., 2003; Newman, 2003; Rossi y col., 2007; Takano y col., 2006; Ullian y col., 2001; Yi y col., 2011).

A nivel de la lámina glial, los astrocitos tienen una orientación transversal, con procesos primarios gruesos que provienen de una expansión citoplásmica del soma. Los espacios entre los procesos de los astrocitos vecinos se alinean espacialmente y forman las aberturas a través de las cuales pasan los haces de axones. Los astrocitos en la lámina glial no forman mosaicos,

como en el resto del NOP: cada astrocito está en contacto con aproximadamente una cuarta parte de todos los haces de axones (Sun y col., 2009).

1.3.3. Oligodendrocitos. El desarrollo del linaje oligodendrocítico ha sido ampliamente estudiado (Miron y col., 2011; Volpe y col., 2011). Estos estudios demuestran la presencia de un patrón claramente establecido en la maduración de estas células, que puede ser determinado mediante el uso de marcadores de superficie celular específicos para cada estadio celular. Los oligodendrocitos inmaduros son células multipolares complejas en estado post-mitótico. En cambio, los oligodendrocitos maduros poseen un cuerpo celular pequeño con un citoplasma muy denso, y son uno de los tipos celulares más electrón-densos del SNC. Presentan un retículo endoplasmático rugoso abundante, frecuentes polirribosomas libres, complejo de Golgi desarrollado y numerosas mitocondrias. El núcleo es esférico y contiene gran cantidad de heterocromatina, pero es más pequeño que el de los astrocitos. A su vez, presentan menor cantidad de prolongaciones y son menos ramificados que los astrocitos. Se disponen en columnas entre los axones y son las células responsables de la producción y mantenimiento de la mielina en el SNC. Se pueden identificar mediante la detección de distintos componentes principales de la mielina, como la proteína básica de mielina (MBP) y la proteína proteolipídica (PLP). Los oligodendrocitos generan grandes cantidades de membrana que forman segmentos inter-nodales de mielina que rodean a varios axones. La mielina actúa como aislante de alta resistencia y baja capacitancia, de manera que la corriente iónica que se transmite a través del axón se transmite de nodo a nodo (conducción saltatoria), aumentando considerablemente la velocidad de conducción y disminuyendo el gasto de energía. La mielina cumple además una función protectora, ya que asegura la continuidad de la conducción del impulso nervioso. La estructura de la vaina de mielina consiste en una sucesión de capas alternantes de lípidos mixtos y proteínas. En el SNC, los nervios contienen

mielina en cantidades variables relacionadas con el diámetro axonal. Un axón puede estar envuelto por vainas de mielina provenientes de diferentes oligodendrocitos y cada oligodendrocito puede formar la vaina de mielina para una cantidad variable (entre 10 y 60) de axones.

1.4. Áreas cerebrales retino-receptivas

La base principal para la segregación entre las vías visuales formadoras de imágenes frente a las que no forman imágenes es la división de las proyecciones axonales que surgen de diferentes subtipos de CGRs a diferentes blancos subcorticales (Figura 4). Los diferentes tipos de CGRs proyectan a más de 40 núcleos cerebrales retino-receptivos subcorticales (Morin y Studholme, 2014), cada uno de los cuales participa en distintas funciones. El reciente descubrimiento y caracterización de herramientas genéticas para marcar tipos específicos de CGRs en el ratón ha posibilitado una mayor comprensión de estas vías de salida de la retina (Dhande y col., 2015). En ratones se demostró que algunas de esas estructuras, como el núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd), transmiten información retiniana directamente a la corteza visual, el sitio de la percepción consciente, mientras que otras, como el colículo superior (CS) del cerebro medio, recibe entrada directa de la retina, y se conecta con la corteza sólo a través de estaciones intermedias, como el núcleo posterior lateral o mediante conexiones de alimentación hacia adelante con el NGLd (revisado por Seabrook y col., 2017).

1.4.1. Colículo superior. El CS es un centro integrador del cerebro medio que controla el movimiento reflejo de la cabeza y los ojos. Se localiza en el techo del mesencéfalo y es una estructura organizada en capas (Figura 4). La capa superior es delgada, prácticamente libre de células y se denomina *stratum zonale* (SZ). Por debajo de ella, se encuentra la capa gris

superficial, *stratum griseum superficiale* (SGS), que contiene numerosas neuronas pequeñas. Esta capa suele subdividirse en superior e inferior. Luego sigue el *stratum opticum* (SO) que contiene predominantemente fibras. Estas tres capas constituyen la porción superficial del CS que participa en el procesamiento de la información visual. El CS recibe entrada directa de la retina y de la corteza visual. En los roedores, aproximadamente el 90% de las CGRs proyectan al CS (Ellis y col., 2016), en contraste con el ~ 10% de CGRs que proyectan al CS en primates (Perry y Cowey, 1984). La principal capa retino-receptiva del CS es el SGS, que contiene una representación de la retina contralateral completa (Dräger y Hubel, 1976; Koch y Hess, 2011).

En animales con una escasa región de binocularidad, como en el caso de los roedores, la gran mayoría de las terminales retinianas proyectan del ojo contralateral. Se estima que en la rata, aproximadamente el 98% de las CGRs proyectan al CS contralateral (Lund y col., 1980). Las fibras de proyección ipsilateral de las CGRs de la retina temporal proyectan al SO y al SGS inferior. El orden retinotópico en el CS surge de un mapeo directo, de dos dimensiones a dos dimensiones, con una rotación de 90° de los axones aferentes de las CGRs. La capa retino-receptiva más profunda en el CS, el SO, contiene un mapa de la porción ventro-temporal de la retina ipsilateral (Dräger y Hubel, 1976).

Las capas profundas del CS procesan estímulos auditivos y somatosensoriales. Además, en estas capas se encuentran neuronas de procesamiento multisensorial (*cross-modal*). Se ha observado que la frecuencia de disparos de potenciales de acción aumenta cuando se presentan estímulos de diferente modalidad provenientes de la misma localización espacial y en una ventana temporal estrecha (Alvarado y col., 2009). El CS profundo contiene neuronas motoras de proyección. Próximo al SO, se encuentra una capa delgada con una gran variedad de neuronas multipolares, denominado *stratum griseum intermediale* (SGI). Esta capa suele dividirse, a su vez, en superior e inferior según la densidad neuronal. La capa siguiente se

denomina *stratum album intermediale* (SAI) y contiene numerosas fibras. Por debajo, se encuentra una capa celular denominada *stratum griseum profundum* (SGP). Finalmente, la capa más profunda está formada por fibras adyacentes a la sustancia gris periacueductal y se denomina *stratum album profundum* (SAP).

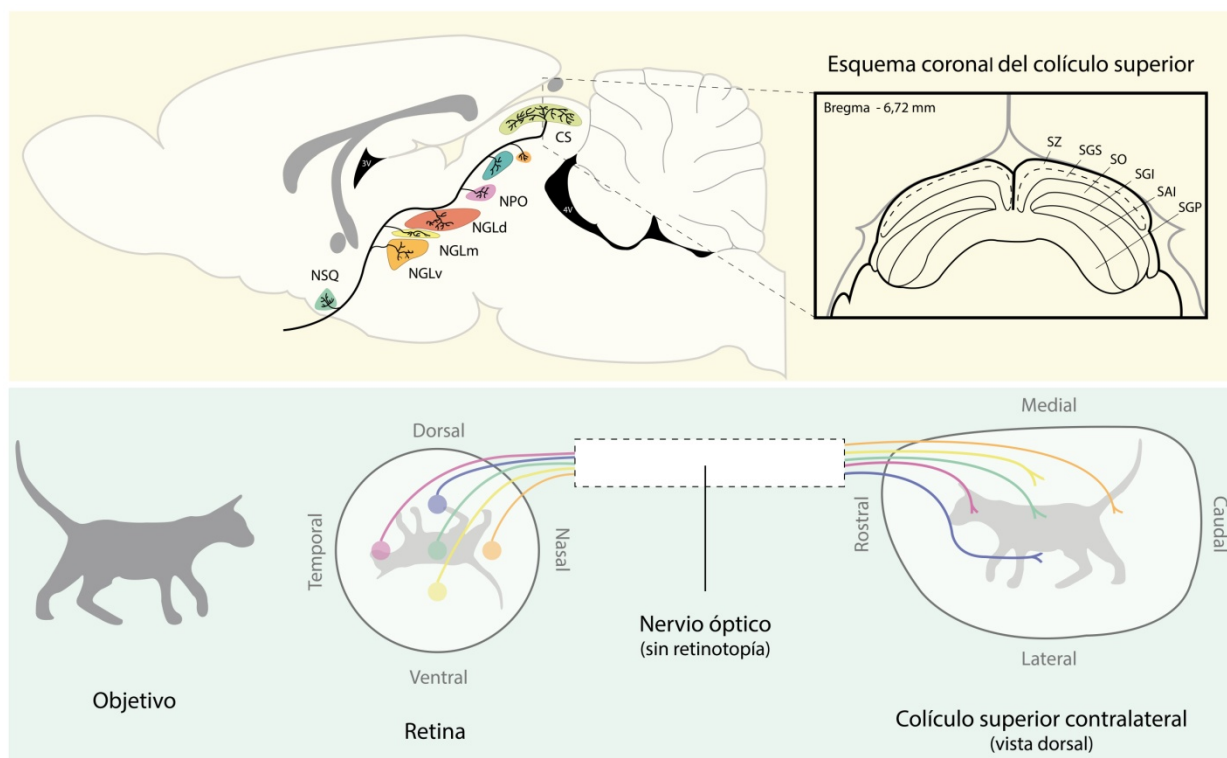


Figura 4. Representación esquemática de las principales áreas visuales centrales y su retinotopía. Panel superior: esquema de corte sagital de cerebro de roedores y esquema de corte coronal de colículo superior. Panel inferior: los puntos vecinos en una escena visual (objetivo) se mapean en neuronas vecinas en la retina. El orden espacial de estos mapas retinotópicos se conserva en el colículo. NSQ: núcleo supraquiasmático; NGL: núcleo geniculado lateral ventral (v), medial (m) y dorsal (d). NPO: núcleo pretectal olivar, CS: colículo superior. Adaptado de Paxinos y Watson, 1997 y de Seabrook y col., 2017.

1.4.2. Núcleo pretectal olivar. El núcleo pretectal olivar (NPO) es un núcleo de la región pretectal, cuya función principal es el control de la respuesta pupilar ante un estímulo lumínico (reflejo pupilar), regulando de esta forma la cantidad de luz que impacta en la retina. En roedores, el NPO recibe aferencias retinianas contralaterales (Scalia, 1972). Además de las aferencias retinianas, el NPO recibe fibras provenientes de la corteza estriada y extraestriada ipsilateral (Benevento y col., 1977), el NGLv, el fascículo intergeniculado

bilateral, y las capas superficiales del CS ipsilateral. Las principales eferencias se dirigen a la médula espinal, la protuberancia y el cerebro medio. Otras proyecciones se dirigen hacia el núcleo facial y participan en la respuesta de parpadeo evocada por un estímulo lumínico, el NGL y el núcleo supraquiasmático (NSQ) ipsilateral (Gamlin, 2006). En ratas, también se han descrito proyecciones hacia el NPO contralateral (Klooster y col., 1995).

2. La neuritis óptica

La neuritis óptica (NO) es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del NOp, que puede desencadenar atrofia del NOp y muerte de CGRs, con un consecuente déficit visual irreversible. En la clínica oftalmológica, la NO es la neuropatía óptica más frecuente después del glaucoma (Kale, 2012; Khaleeli y col., 2018; Toosy y col., 2014). La prevalencia de NO en EE.UU. es de aproximadamente 115 cada 100.000 de habitantes, afecta generalmente a adultos jóvenes (18 - 45 años) y niños mayores de 4 años y se manifiesta como una enfermedad aguda, que consiste en un episodio auto-limitado de inflamación del NOp, con una disminución de la agudeza visual que puede progresar entre el segundo y séptimo día y al cabo de una semana puede comenzar la recuperación, que se extiende durante las siguientes semanas o meses. Sin embargo, en el 40 - 60% de los casos, los síntomas visuales pueden persistir (Kale, 2012; Khaleeli y col., 2018; Toosy y col., 2014; Wilhelm y col., 2015). La situación más frecuente es en un adolescente o adulto joven con una disminución súbita de la visión de un ojo (*“como si un velo le cubriera el ojo”*) con dolor peri- o retro-ocular acentuado por movimiento ocular, agudeza visual y campo visual anormal, visión de color distorsionada (discromatopsia), un defecto pupilar aferente en el ojo afectado y potenciales visuales evocados (VEPs) anormales (Hickman y col., 2002; Khaleeli y col. 2018; Toosy y col., 2014). La NO es un signo inicial que precede a otros déficits neurológicos en pacientes con esclerosis múltiple (EM) (Horwitz y col., 2014; Kezuka y Ishikawa, 2018; Marques y

col., 2014; Prasad, 2018), una enfermedad autoinmune, desmielinizante, inflamatoria y neurodegenerativa del SNC, que afecta predominantemente a neuronas mielinizadas del cerebro, la médula espinal y el NOp, y causa una discapacidad neurológica progresiva. La etiología de la EM es multifactorial, con predominio de mecanismos autoinmunes contra la mielina. Estudios de seguimiento a largo plazo indican que entre 25% a 50% de pacientes con NO presentan un cuadro clínicamente definido de EM (Horwitz y col., 2014; Kezuka y Ishikawa, 2018; Marques y col., 2014; Prasad, 2018; Wilhelm y col., 2015). La NO debe diferenciarse de la neuromielitis óptica (o enfermedad de Devic), una enfermedad gravemente incapacitante del SNC, que comparte algunas características con la NO, pero es una entidad nosológica diferente de la NO primaria y la EM, y se caracteriza por NO junto con mielitis longitudinalmente extensa, y mayoritariamente es causada por auto-anticuerpos contra la proteína astrocítica acuaporina-4 (AQP-4), el canal de agua más abundante del SNC (Jarius y col., 2014; Patterson y Goglin, 2017; Verkman y col., 2017). Por otra parte, un alto porcentaje de casos de NO se presentan como un episodio aislado, sin una causa identificable, y generalmente se clasifica como idiopática o primaria.

2.1. Modelos experimentales de NO

Basado en la asociación clínica entre la EM y la NO, el modelo experimental más comúnmente utilizado para los estudios de NO es la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo establecido de EM humana, que implica un proceso de desmielinización mediada por el sistema inmune. La EAE puede ser inducida por inmunización con diferentes antígenos de oligodendrocitos, como MBP, PLP y la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (Furlan y col., 2009; Rangachari y Kuchroo, 2013; Simmons y col., 2013). Sin embargo, dado que las lesiones del NOp en la EAE siempre se asocian con inflamación y desmielinización del cerebro y la médula espinal,

este modelo no imita la forma primaria de NO. Además, el daño del NOp en la EAE es relativamente impredecible dado que se alcanzan grados variables de severidad de la lesión dependiendo de las condiciones experimentales (Betelli y col., 2003; Shindler y col., 2006). La NO experimental (NEO) también se puede inducir mediante la inyección de lisolecitina, un componente principal de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas, que tiene un efecto detergente sobre la mielina y las células mielinizantes. La lisolecitina se ha utilizado con éxito para inducir desmielinización del NOp en primates y ratas (Lachapelle y col., 2005; You y col., 2011). Sin embargo, aunque el modelo de lisolecitina reproduce la desmielinización focal en el NOp, este modelo de NEO carece del componente inflamatorio primario, que es una característica central de la NO.

La concepción fisiopatológica actual de la NO proviene, en gran medida, de estudios basados en modelos de EAE, sobre la base de la mencionada asociación entre NO y EM. En este marco, se ha prestado particular atención a la patología de la sustancia blanca, porque la enfermedad se consideró esencialmente un trastorno desmielinizante inmune-mediado. Sin embargo, nuevas evidencias desafían esta presunción. Si bien la degeneración axonal se encuentra principalmente en las lesiones desmielinizantes (Trapp y col., 1998) y se correlaciona con el grado de inflamación (Peterson y col., 2001; Trapp y col., 1998), datos convincentes señalan la participación de un daño axonal inmune-mediado en ausencia de procesos desmielinizantes activos co-localizados directamente (Peterson y col., 2001).

2.2. Terapéutica de la NO

Al presente, el tratamiento de la NO consiste en la administración de altas dosis de corticoides, que pueden acortar el período de recuperación visual, pero carecen de efectos beneficiosos a largo plazo sobre la función visual y pueden provocar efectos adversos (Beck y col., 1992; Kaufman y col., 2000). En un grupo de pacientes con NO que recibieron una

dosificación estándar de prednisona oral, los resultados no difirieron de los obtenidos en pacientes tratados con placebo, pero se observó un mayor riesgo de recurrencia inesperada de NO, por razones aún elusivas (Beck y col., 1992; Kaufman y col., 2000). El estudio clínico más importante de NO (*Optic Neuritis Treatment Trial*) patrocinado por el *National Eye Institute* indica que 1 mg/kg/día de prednisona oral no tiene eficacia demostrada en la recuperación visual y sugiere que dosis más altas de metilprednisona por vía oral o parenteral podrían acelerar la velocidad y el grado de recuperación, pero no hay ninguna evidencia de beneficio visual a largo plazo (Kaufman y col., 2000). El tratamiento con metilprednisona, la terapia estándar para las recaídas de EM, provoca efectos negativos sobre la supervivencia neuronal retiniana en un modelo de EAE (Diem y col., 2003). Un ensayo aleatorizado sobre la eficacia de inmunoglobulinas intravenosas en la NO asociada a EM tampoco demostró mejoría a largo plazo. Aunque en algunos casos de NO autoinmune resistentes a esteroides se apreció mejoría funcional tras plasmaféresis, aún resulta necesaria la realización de ensayos randomizados para confirmar su valor terapéutico (Ayuso y col., 2009). De hecho, la Academia Americana de Neurología considera que aún no existe un tratamiento para la NO que altere el resultado visual a largo plazo en comparación con el placebo (Kaufman y col., 2000). Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la NO primaria es un objetivo de indudable relevancia clínica.

3. El lipopolisacárido bacteriano (LPS)

El sistema inmune puede dividirse en dos ramas interactivas: el sistema inmune innato (celular) y el sistema inmune adaptativo (humoral). En términos generales, la inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los patógenos y no requiere la exposición previa a antígenos extraños para ser activados (memoria inmunológica). Los tipos de células que componen el sistema inmune innato incluyen macrófagos, neutrófilos, células

dendríticas, células *natural killers* y particularmente en el SNC, la microglía, los astrocitos y los macrófagos perivasculares (revisado por Kielian, 2006). Las células del sistema inmune innato no reconocen todos los antígenos sino unas pocas estructuras altamente conservadas y expresadas por grandes grupos de microorganismos. Estos motivos estructurales conservados se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores del sistema inmune innato que reconocen estas estructuras se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (revisado por Kielian, 2006). Un PAMP muy utilizado para inducir inflamación experimental en sistemas biológicos es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), un componente de la pared celular de bacterias *Gram*-negativas, capaz de inducir inflamación en distintos tejidos a través de su administración local o sistémica. Una vez reconocido por los PRRs del sistema inmune, el LPS desencadena una respuesta inflamatoria que ha sido bien caracterizada (Breder y col., 1994; Gatti y Bartfai, 1993; Layé y col., 1994; Quan y col., 1999; Van Dam y col., 1992; Zhang y Ghosh, 2000). En particular, es un hecho bien establecido que se puede inducir inflamación en el SNC (neuroinflamación), a través de la administración central o periférica de LPS (revisado por Rivest, 2003). Se ha demostrado que el LPS es reconocido por un grupo particular de PRRs, los receptores TLRs (del inglés *Toll-like Receptors*), que se encuentran ampliamente distribuidos en varios de los tipos celulares de la respuesta inmune innata. El receptor mejor descrito y con mayor afinidad por el LPS, es el TLR4, y en menor medida el TLR2 (revisado por Kielian, 2006). Ambos tipos de receptores se expresan constitutivamente en la microglía (Kielian y col., 2002; 2005; Olson y Miller, 2004; Rasley y col., 2002; Tapping y col., 2000; Zekki y col., 2002). Se ha demostrado que los astrocitos también expresan TLR2 (Bowman y col., 2003; Carpentier y col., 2005; Esen y col., 2004). Algunos autores descartan la expresión de TLR4 en astrocitos (Laflamme y Rivest, 2001; Lehnardt y col., 2002; 2003); en tanto que otros grupos demostraron una baja expresión constitutiva de este receptor en astrocitos, que

aumenta con la activación celular (Carpentier y col., 2005; Bowman y col., 2003; Bsibsi y col., 2002; Ko y col., 2015). También se describió la expresión de TLR2 en oligodendrocitos (Bsibsi y col., 2002); sin embargo la relevancia funcional de este receptor en este tipo celular es aún elusiva. El LPS afecta a la microglía y a los astrocitos (Cunningham, 2013) y produce la activación de células gliales *in vivo* (Biesmans y col., 2013; Bourdiol y col., 1991; Herrera y col., 2000; Qin y col., 2007).

4. La melatonina

La melatonina, originalmente descrita por Lerner en 1959, fue considerada durante mucho tiempo de origen exclusivamente pineal (Axelrod, 1974; Lerner y col., 1959). Sin embargo, múltiples evidencias experimentales demuestran que la melatonina también es sintetizada en la retina de diversas especies (Cardinali y Rosner, 1971; Faillace y col., 1995; Gern y Ralph, 1979; Pang y col., 1993; Quay, 1965). Por su alta lipofilicidad, la melatonina es capaz de atravesar la BHE y la barrera hemato-ocular (Bubenik y col., 1978; Cassone y col., 1993). La melatonina retiniana fue localizada mediante el desarrollo de anticuerpos anti-melatonina y anti-N-acetilserotonina en la CNE de la retina de rata donde se localizan los somas de los fotorreceptores (Bubenik y col., 1974). Asimismo, en cultivos retinianos de pollo se demostró una alta correlación entre el número de fotorreceptores y la actividad de la arilalquilamina N-acetil transferasa (AA-NAT), enzima limitante en la síntesis de melatonina (Iuvone y col., 1990). Si bien este conjunto de evidencias indican que la melatonina en la retina es principalmente sintetizada en los fotorreceptores, trabajos de nuestro laboratorio indican que el metoxiindol puede ser sintetizado también en CGRs de pollo (Garbarino-Pico y col., 2004).

La biosíntesis de melatonina tanto en la glándula pineal como en la retina, comienza con la captación del triptofano (Trp) circulante que luego se convierte en 5-hidroxi-Trp, en una

reacción catalizada por la enzima Trp-hidroxilasa. El 5-hidroxi-Trp a su vez, es transformado en serotonina (5-HT) por acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. La 5-HT es convertida en melatonina, a través de dos reacciones catalizadas enzimáticamente. En una primera etapa, la serotonina es acetilada a *N*-acetilserotonina por la acción de la AA-NAT. Subsecuentemente, la hidroxiindol-*O*-metiltransferasa (HIOMT) cataliza la transferencia del grupo metilo de la *S*-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxi de la *N*-acetilserotonina, dando melatonina como producto final (Ebadi y Govitrapong, 1986). Una característica central de la biosíntesis de melatonina, tanto en la pineal como en la retina de diversas especies, es su variación dependiente del ciclo de luz/oscuridad, con valores máximos en la fase nocturna. En trabajos de nuestro laboratorio se demostró que la retina de hámster es un sitio de síntesis activa de melatonina, independiente de la glándula pineal, y regulada por la luz (Faillace y col., 1994) y más tarde, otros autores, demostraron que la biosíntesis de melatonina en la retina de esta especie es también regulada por un reloj circadiano local (Tosini y Menaker, 1996).

La variedad de funciones de la melatonina puede ser atribuida a la existencia de subtipos de receptores (Dubocovich y col., 1999). Estudios inmunohistoquímicos en ojos de distintas especies demostraron la presencia de receptores para melatonina de tipo 1 y 2 (MT1, MT2) en la córnea, la coroides, la esclera, los fotorreceptores, las CGRs y los vasos retinianos (Fujieda y col., 1999; Rada y Wiechmann, 2006; Savaskan y col., 2002; Scher y col., 2002; 2003; Wiechmann, 2003; Wiechmann y Smith, 2001). Asimismo, múltiples evidencias demuestran que la melatonina podría participar en funciones pleiotrópicas no mediadas por receptor, protegiendo del daño celular causado por radicales libres (Reiter, 1995; Reiter y col., 1997; Siu y col., 2006). En nuestro laboratorio, se ha demostrado por métodos computacionales, la factibilidad termodinámica de la reacción de melatonina con el radical $\text{OH}\cdot$ (Turjanski y col., 1998). Además de la melatonina, varios de los metabolitos generados

como resultado de su acción como *scavenger* son también antioxidantes (Hardeland, 2005). La melatonina es capaz de reaccionar en forma directa con óxido nítrico para dar al menos un producto estable que fue caracterizado por espectroscopía RMN y Rayos X (Turjanski y col., 1998), inhibe la actividad de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS-2) y protege contra el daño oxidativo en modelos experimentales de daño inducido por óxido nítrico (Cuzzocrea y col., 1997). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la melatonina modula significativamente la actividad del ciclo glutamato/glutamina (Sáenz y col., 2004), es un potente antioxidante retiniano (Belforte y col., 2010) y un anti-inflamatorio ocular efectivo, capaz de prevenir la ruptura de la barrera hemato-ocular inducida por la inyección intravítrea de LPS, así como las consecuencias bioquímicas, funcionales y ultraestructurales de la uveítis inducida por endotoxina en hámsteres (Sande y col., 2008) y gatos (Del Sole y col., 2012), probablemente a través de la reducción de los niveles de NF- κ B, TNF- α y óxido nítrico. La melatonina disminuye los niveles de ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) y la síntesis de prostaglandinas inducidas por LPS (Domínguez Rubio y col., 2014). En suma, estos resultados indican que la melatonina: 1) es un potente antioxidante retiniano, 2) inhibe el sistema nitrérgico, 3) es un antiinflamatorio efectivo y 4) disminuye las concentraciones sinápticas de glutamato.

5. El ambiente enriquecido

Numerosas investigaciones se han centrado en la plasticidad fenotípica asociada a la interacción del cerebro y el ambiente. Charles Darwin en su libro “El Origen del Hombre” (1871), descubrió observaciones sobre los cerebros de conejos silvestres, de mayor tamaño y peso que el de sus pares en cautiverio. Hacia mediados del siglo XX, los resultados obtenidos a partir de estudios que intentaron relacionar el peso y tamaño cerebral con la “inteligencia” fueron desalentadores y abandonados. Los trabajos pioneros de Rosenzweig y col. en 1962 demostraron que la experiencia modifica la actividad de la enzima acetilcolinesterasa y

consecuentemente, la neuroquímica cerebral (Krech y col., 1960), así como el peso y espesor cortical (Krech y col., 1963) en animales adultos. Para ello, utilizaron el paradigma del ambiente enriquecido (AE), que se definió como una combinación compleja de estimulación social e inanimada (Bennett y col., 1964). El AE consiste en una manipulación en la que los animales están expuestos a condiciones complejas a través de adaptaciones en el entorno físico y social. Este entorno complejo está compuesto por materiales de anidación, ruedas para ejercicio voluntario, túneles, escaleras y juguetes con diferentes texturas, colores, formas y tamaños, que se reemplazan periódicamente. De esta manera, se genera un ambiente que estimula la novedad y brinda oportunidades continuas para la exploración y la estimulación sensorial, cognitiva y de actividad física (Bondi y col., 2014; Sale y col., 2014). En ratones, ratas, gatos y monos, se han demostrado efectos del AE tanto a nivel molecular como celular y conductual (van Praag y col., 2000), tales como un aumento del espesor cortical, del tamaño del soma neuronal, de la arborización y longitud dendrítica y del tamaño y número de sinapsis (Sale y col., 2009). Además, el AE mejora el aprendizaje y la memoria y reduce el deterioro cognitivo típicamente asociado a la edad (Rosenzweig y Bennett, 1996). A nivel celular, el AE promueve el aumento del contacto entre astrocitos y neuronas en la brecha sináptica de las capas I, II y III de la corteza visual (Jones y col., 1996). Además, aumenta la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Garthe y col. 2016; Hu y col., 2010; Monteiro y col., 2014), y el número y recambio de dendritas (Garthe y col. 2016; Monteiro y col., 2014; Tropea y col., 2010).

La mayoría de los cambios corticales inducidos por la experiencia se producen en etapas tempranas de la vida post-natal (Berardi y col., 2000). En este sentido, se ha demostrado que la exposición a AE aumenta la neurogénesis hipocampal en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, otros estudios demostraron que los efectos del AE son similares en animales en etapa post-natal temprana y adulta (Bennett y col., 1996), y que la edad no es un factor

determinante en los efectos del AE (Diamond y col., 1972). Además de los cambios morfológicos, varios trabajos demuestran que el AE proporciona una mejor recuperación de diferentes neuropatologías tales como accidente cerebro-vascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y lesión cerebral traumática (Hannan, 2014; Kline y col., 2010; Sale y col., 2014). Se ha demostrado que el AE acelera el desarrollo del sistema visual en general (Sale y col., 2007) y de la corteza visual en particular (Ciucci y col., 2007). Ratas expuestas a oscuridad desde el nacimiento y alojadas en AE presentan un normal desarrollo de la agudeza visual y duración del período crítico (Bartoletti y col., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que el desarrollo de la agudeza visual retiniana es sensible a AE con la misma escala temporal que los cambios corticales (Landi y col., 2007). Prusky y colaboradores (2000) demostraron que ratones expuestos a AE desde el nacimiento, tienen una mayor agudeza visual en comparación a sus controles alojados en ambiente estándar (AS), lo que sugiere que la *performance* visual está fuertemente influenciada por la complejidad del ambiente (Prusky y col., 2000). Además, se ha descrito que la exposición a AE de ratas preñadas acelera el desarrollo retiniano de las crías, a través de un mecanismo dependiente de IGF-1 (Sale y col., 2007). Se han demostrado efectos neuroprotectores inducidos por AE en un modelo de degeneración retiniana inducida por la administración neonatal de glutamato en ratas (Szabadfi y col., 2009).

Aunque es ampliamente aceptado que la restauración de la función visual sólo es posible si se restablece la experiencia visual “normal” dentro de un período crítico del desarrollo, la exposición a AE durante 2 ó 3 semanas, promueve una recuperación completa de la agudeza visual y la dominancia ocular a nivel electrofisiológico y conductual en un modelo de ambliopía en ratas adultas (Sale y col., 2007; Tognini y col., 2012). En nuestro laboratorio, hemos demostrado el efecto beneficioso del AE en ratas adultas en modelos de isquemia retiniana (Dorfman y col., 2013) y retinopatía diabética (Dorfman y col., 2014). También

demostramos que el NOp es sensible al AE en un modelo de diabetes experimental temprana (Dorfman y col., 2015).

6. Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

El BDNF es la neurotrofina más abundante y ampliamente distribuida en el SNC de mamíferos (Huang y Reichardt, 2001). En 1982 se demostró que el BDNF promueve la supervivencia de una sub-población de neuronas del ganglio de la raíz dorsal y posteriormente, el péptido se purificó del cerebro de cerdo (Barde y col., 1982). Desde entonces, una gran cantidad de evidencias han sustentado su rol central en el desarrollo y la fisiología del cerebro (Gilbert y Lasley, 2013; Karpova, 2014; Park y Poo, 2013), así como en enfermedades neurodegenerativas (Bennett y Lagopoulos, 2014; Binder y Scharfman, 2004; Leal y col., 2014; Marosi y Mattson, 2014).

En diferentes mamíferos, el BDNF está altamente conservado no sólo en la secuencia de aminoácidos sino también en la distribución tisular. Hay dos formas de proteínas BDNF: la isoforma precursora inmadura (pro-BDNF) y la isoforma madura (mBDNF); cada una de ellas posee diferentes características de unión y actividad biológica (Teng y Hempstead, 2004).

El BDNF es producido principalmente por las neuronas, células endodiales, astrocitos y epitelio arterial (Yamamoto y Gurney, 1990), y en la retina, por las células de Müller, CGRs y células amácrinas (Grishanin y col., 2008; Harada y col., 2011). El BDNF es liberado a través de la secreción constitutiva o en forma dependiente de la actividad neuronal. El glutamato, por ejemplo, estimula la expresión de BDNF mientras que el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y agonistas del receptor GABA_A la suprimen. Los niveles de BDNF y de sus receptores están modulados por la actividad neuronal (Karpova, 2014; Porcher y col., 2011). Múltiples evidencias indican que la exposición a AE aumenta los niveles de BDNF y

de sus receptores en retina (Landi y col., 2007), CS (Franklin y col., 2006) y corteza visual (Sale y col., 2014) de animales adultos. Los niveles de otras neurotrofinas, como el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*), el factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF, del inglés *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*) y neurotransmisores como glutamato y GABA también aumentan por exposición a AE (Mora y col., 2008).

Se han descrito dos tipos de receptores BDNF: la quinasa B relacionada con la tropomiosina (TrkB) y p75 (Patapoutian y Reichardt, 2001). El receptor TrkB es de alta afinidad para diversos factores neurotróficos, como BDNF, neurotrofina-3 y neurotrofina-4 (Patapoutian y Reichardt, 2001). Pertenece a la gran familia de receptores acoplados a tirosina quinasas. Se ha demostrado que el receptor TrkB está presente en diferentes tipos celulares retinianos (Grishanin y col., 2008; Harada y col., 2011). El receptor p75 es uno de los 25 miembros conocidos de la superfamilia del receptor de TNF- α . Se expresa principalmente durante la etapa inicial del desarrollo neuronal y desempeña un papel importante en el control de la supervivencia neuronal (Dechant y Barde, 2002). La señalización intracelular estimulada por la vía BDNF/TrkB es crítica para la supervivencia neuronal, la morfogénesis y la plasticidad. A diferencia del receptor TrkB, principalmente el pro-BDNF se une a p75 y generalmente participa en la inducción de muerte neuronal (Barrett, 2000).

7. La barrera hemato-encefálica

El árbol vascular se compone de arterias y arteriolas que llevan sangre a los tejidos, y el lecho capilar que es esencial para el intercambio de gases y nutrientes dentro de los tejidos. Cada segmento tiene diferentes propiedades dependiendo de su localización y el órgano que vascularizan. Hay tres clases estructurales principales de capilares: 1) los capilares continuos no fenestrados de la piel y el pulmón que se unen mediante uniones celulares, tienen una membrana basal completa y carecen de fenestras (poros) en su membrana plasmática; 2) los

vasos fenestrados continuos de las vellosidades intestinales y las glándulas endócrinas que tienen una estructura continua similar y contienen fenestras en toda su membrana, y 3) los capilares discontinuos presentes en el hígado con una membrana basal incompleta (Daneman y Prat, 2015). Estas clases de capilares difieren en la regulación del movimiento de solutos entre la sangre y los tejidos, siendo los capilares fenestrados continuos los más restrictivos (Aird, 2007a; 2007b).

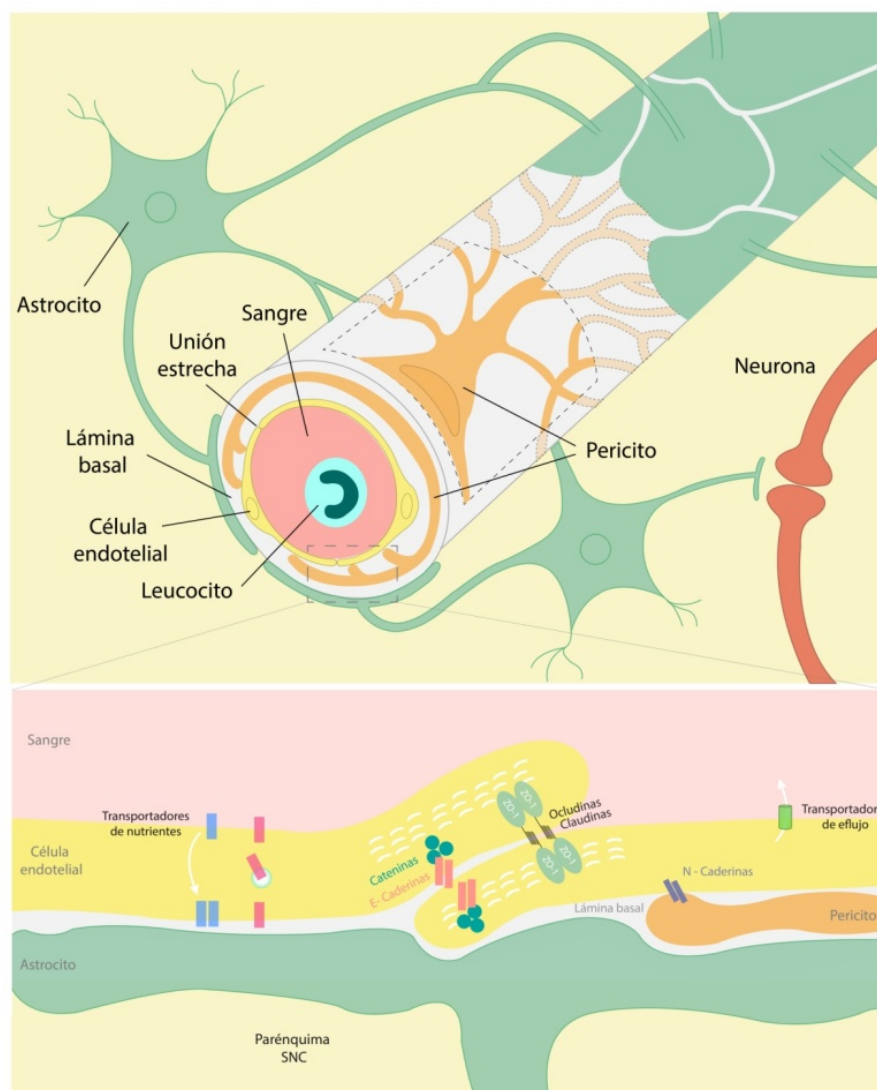


Figura 5. Representación esquemática de la BHE. Panel superior: disposición de los principales componentes de la unidad neuro-vascular a lo largo de un vaso sanguíneo en el SNC. Panel inferior: esquema de disposición de diferentes moléculas de adhesión celular y transportadores de membrana. Adaptado de Obermeier y col., (2013) y Daneman y Prat (2015).

La BHE es el término usado para describir las propiedades únicas de la microvasculatura del SNC (Figura 5). Los vasos del SNC son vasos continuos no fenestrados, pero también contienen una serie de propiedades adicionales que les permiten regular estrechamente el movimiento de moléculas y células entre la sangre y el SNC (Daneman, 2012; Zlokovic, 2008). Esta capacidad de barrera altamente restrictiva permite a las células endoteliales (CEs) de la BHE regular la homeostasis del SNC. La naturaleza restrictiva de la BHE proporciona un obstáculo para toxinas, patógenos y señales inflamatorias periféricas, así como para la administración de fármacos y por lo tanto, se han realizado grandes esfuerzos para generar métodos que permitan modular o eludir la BHE en la administración de productos terapéuticos (Larsen y col., 2014). La pérdida de algunas o la mayoría de estas propiedades de barrera en enfermedades neurodegenerativas es un componente central del inicio de la enfermedad y su progresión (Daneman, 2012; Zlokovic, 2008). La disfunción de la BHE puede conducir a la desregulación iónica y alteración de la homeostasis de señalización, así como a la entrada moléculas y células inmunes al SNC, procesos que conducen a disfunción y degeneración neuronal. Aunque la mayoría de las regiones del SNC están vascularizadas por capilares que contienen propiedades de BHE, los núcleos específicos adyacentes al tercer y cuarto ventrículo, incluyendo el órgano sub-fornical, área postrema, glándula pineal y eminencia media, contienen vasos que tienen una permeabilidad pasiva mucho mayor (Ufnal y Skrzypecki, 2014). Los capilares de estos órganos circunventriculares son vasos fenestrados continuos, con una alta permeabilidad a solutos.

Los vasos sanguíneos están formados por dos tipos de células principales: las CEs que forman las paredes de los vasos sanguíneos y las células murales que se asientan en la superficie abluminal. Las propiedades de la BHE se manifiestan en gran medida dentro de las CEs y son mantenidas por interacciones críticas con células murales, células del sistema inmune, células gliales y neuronas, que interactúan en la unidad neurovascular (Figura 5).

Las CEs del SNC tienen propiedades únicas en comparación con las CEs de otros tejidos: se mantienen unidas por uniones estrechas (*tight junctions*, (TJ)), que limitan significativamente el flujo paracelular de solutos (Brightman y Reese, 1969; Reese y Karnovsky, 1967; Westergaard y Brightman, 1973), contienen cantidades más altas de mitocondrias (Oldendorf, 1977), expresan un nivel extremadamente bajo de moléculas de adhesión leucocitaria (Aird 2007a; 2007b; Daneman y col., 2010; Henninger y col., 1997) y tienen menos eventos de trans-citosis, que restringe en gran medida el movimiento transcelular de solutos mediado por vesículas (Coomber y Stewart, 1985) (Figura 5). Esta estrecha barrera paracelular y transcelular define una célula polarizada con distintos compartimentos, de manera que el movimiento entre la sangre y el SNC es controlado estrechamente a través de propiedades reguladas de transporte celular (Betz y Goldstein, 1978; 1980). Las CEs del SNC expresan transportadores de eflujo y transportadores de nutrientes altamente específicos (Cordon-Cardo y col., 1989; Löscher y Potschka, 2005; Mittapalli y col., 2010; Thiebaut y col., 1989). Las células murales incluyen células de músculo liso vascular que rodean a los grandes vasos y pericitos y cubren de forma incompleta las paredes endoteliales de la microvasculatura. Los pericitos (PCs) son células que se asientan en la superficie abluminal del tubo endotelial microvascular y están incrustadas en la membrana basal (MB) (Figura 5) (Sims, 1986). Extienden largos procesos celulares a lo largo de la superficie abluminal del endotelio. Estas células contienen proteínas contráctiles y tienen la capacidad de controlar el diámetro del capilar (Hall y col., 2014; Peppiatt y col., 2006). Los PCs desempeñan papeles importantes en la regulación de la angiogénesis, el depósito de matriz extracelular, la cicatrización de heridas, la regulación de la infiltración de células inmunitarias y del flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal. Asimismo, se ha sugerido que estas células podrían ser células madre multipotentes del SNC (Armulik y col., 2011). La MB vascular está constituida por una matriz extracelular secretada por CEs y PCs, mientras que la MB

parenquimatosa es secretada principalmente por procesos astrocíticos que se extienden hacia la vasculatura. Estas MBs están compuestas por diferentes moléculas secretadas que incluyen colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos, sulfato de heparina y otras glicoproteínas que proporcionan un anclaje para muchos procesos de señalización y proporcionan una barrera adicional (Daneman y Prat, 2015).

Los astrocitos extienden procesos celulares polarizados que envuelven procesos neuronales o vasos sanguíneos (Abbott y col., 2006) (Figura 5). Los extremos del proceso basal envuelven casi por completo al tubo vascular, y contienen una matriz con proteínas que incluyen distroglicano, distrofina y AQP-4. Los astrocitos proporcionan un enlace celular entre el circuito neuronal y los vasos sanguíneos. Este acoplamiento neurovascular permite a los astrocitos transmitir señales que regulan el flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal (Attwell y col., 2010; Gordon y col., 2011). Esto incluye la regulación de la contracción/dilatación del músculo liso vascular que rodean las arteriolas y los PCs que rodean a los capilares.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. El LPS es una herramienta ampliamente utilizada para inducir inflamación experimental en diversos sistemas. Considerando que la NO es una enfermedad inflamatoria, se planteó la posibilidad de reproducir características centrales de esta enfermedad a través de la microinyección de LPS en el nervio óptico de ratas. En este contexto, el primer objetivo de esta tesis fue: - Desarrollar un nuevo modelo experimental de neuritis óptica primaria.

2. Se ha demostrado que la melatonina es un antioxidante y anti-inflamatorio efectivo en diversos modelos de daño del sistema nervioso central en general y de la vía visual en particular. En este contexto, se planteó la posibilidad de que un tratamiento con melatonina resulte efectivo en la protección de la vía visual frente al daño inducido por NOE. Por lo tanto, el siguiente objetivo de esta tesis fue: - Estudiar el efecto terapéutico de la melatonina sobre el daño de la vía visual inducido por neuritis óptica experimental primaria.

3. Múltiples evidencias experimentales demuestran que la exposición a AE proporciona una mejor recuperación frente a una amplia gama de neuropatologías. Dado que el impacto del AE en procesos neuroinflamatorios ha sido escasamente examinado, se consideró de interés determinar si los efectos deletéreos de la NEO en la vía visual podrían prevenirse o atenuarse mediante la exposición a la EE. Para ello, se planteó el siguiente objetivo: - Analizar el efecto de la exposición a ambiente enriquecido sobre el daño inducido por neuritis óptica experimental.

4. Las enfermedades neuroinflamatorias se caracterizan por la disrupción de la barrera hematoencefálica y la infiltración leucocitaria. Al presente, no se dispone de evidencias concluyentes del rol causal de la infiltración de células inmunes periféricas en la patogénesis de la NO, y no se ha definido aún la contribución de la infiltración de leucocitos a la iniciación y el desarrollo de la enfermedad. En este contexto, se planteó el siguiente objetivo: - Estudiar la contribución de la pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica y el consecuente infiltrado leucocitario al daño visual inducido por neuritis óptica experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los procedimientos del uso de animales fueron realizados de acuerdo al *NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Los experimentos incluidos en esta tesis doctoral fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron ratas *Wistar* macho adultas (2 meses de edad, peso promedio 350 ± 50 g) de nuestra colonia, derivada de *Charles River Breeding Laboratories* (Wilmington, MA, EE.UU.) y una línea transgénica de ratas *Wistar* homocigota para la proteína fluorescente eGFP (^{eGFP}*Wistar*; *Wistar*-TgN(CAG-GFP) 184ys). Los animales se albergaron en un bioterio estándar con agua y comida *ad libitum*, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). El bioterio fue iluminado con luces fluorescentes (200 lux) que se prendían y apagaban automáticamente cada 12 h (de 8 a.m. a 8 p.m.).

1.1. Ambiente estándar. Se utilizaron jaulas estándar de laboratorio (33,5 x 45 x 21,5 cm) en las que se albergaron dos o cuatro ratas/jaula, según el diseño experimental (Figura 6A).

1.2. Ambiente enriquecido. Se albergaron seis animales a la vez en jaulas grandes (46,5 x 78 x 95 cm) que contenían cuatro pisos, cuatro tolvas de alimento, cuatro botellas de agua, tres ruedas de ejercicio voluntario, tubos, rampas y diferentes objetos inanimados (pelotas, cuerdas, piedras) que fueron reposicionados una vez por día y totalmente sustituidos una vez por semana, como se describió en trabajos previos (Dorfman y col., 2013) (Figura 6B). Los animales fueron expuestos constantemente a AS o AE durante diferentes intervalos (3, 14, 17 ó 21 días), como se indica en cada caso. Con el objetivo de evaluar el rol de las ruedas de ejercicio voluntario en el efecto del AE, éstas fueron bloqueadas en algunos experimentos.

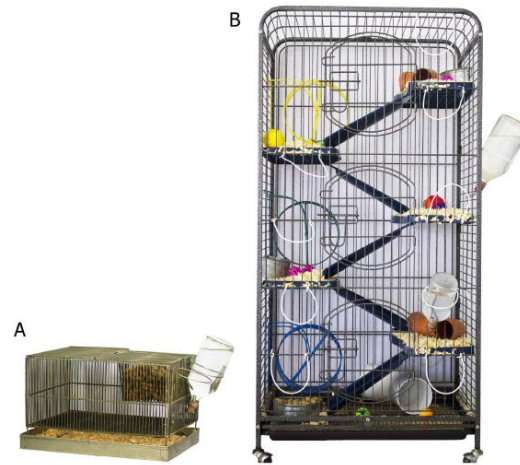


Figura 6. Fotografías de una jaula de ambiente estándar (A) y una jaula de ambiente enriquecido (B). Extraído de Dorfman y col., 2014.

2. Microinyecciones en el nervio óptico

Los animales se anestesiaron intraperitonealmente (i.p.) con hidrocloreto de ketamina (150 mg/kg) e hidrocloreto de xilacina (2 mg/kg). Se afeitó la cabeza de los animales y la piel se desinfectó con iodo-povidona (Pervinox). Se realizó una cantotomía lateral, se resecaron los músculos extraoculares y las glándulas lagrimales y se expuso 3 mm de la región retrobulbar del NOP bajo un microscopio quirúrgico (Figura 7A). Se abrieron longitudinalmente las meninges del NOP y se realizó una microinyección con una aguja 30G acoplada a una jeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA). La aguja se insertó dentro del NOP lo más superficialmente posible, 2 mm posterior del globo, y se inyectó 1 μ l de vehículo (solución salina libre de pirógenos), LPS (4,5 μ g/ μ l *Salmonella typhimurium*, Sigma, St Louis, MO, EE.UU.), LPS + bindarit (100 μ M, *Angelini Research Center-ACRAF*, Italia) o activador tisular del plasminógeno recombinante (rtPA) (250 μ g/ml, Actilyse®, Laboratorios Boehringer Ingelheim) aproximadamente por 10 s (Figura 7B). En algunos experimentos, los nervios ópticos contralaterales se inyectaron con el mismo volumen de vehículo, mientras que en otros experimentos, el NOP contralateral permaneció intacto. Después de la inyección, se suturó la incisión en la piel y se administraron antibióticos de aplicación tópica.

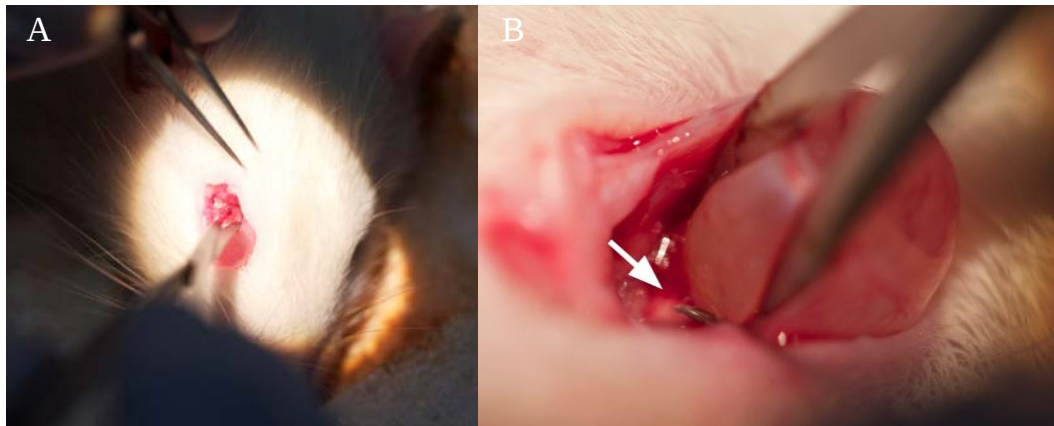


Figura 7. Fotografías de (A) cantotomía y (B) microinyección en la región retrobulbar del NOp (flecha).

3. Tratamiento con melatonina

En un grupo de animales se implantó en forma subcutánea un *pellet* de melatonina (20 mg con 3% p/v de aceite vegetal) comprimido en un cilindro de 2,5 mm de diámetro y 1 mm de longitud. En el grupo control se realizó una operación simulada sin implantar el *pellet*. El *pellet* de melatonina se implantó 1 día antes, y 4 ó 7 días después de la inyección de vehículo o LPS, y se reemplazó cada 10 días. La vía de administración y la dosis de melatonina fueron seleccionadas en base a trabajos previos (Belforte y col., 2010; Salido y col., 2013; Sande y col., 2008).

4. Estudio funcional de la vía visual

4.1. Electrorretinografía escotópica. Las ratas se adaptaron a oscuridad durante 6 h y se anestesiaron bajo luz roja. Las pupilas se dilataron por aplicación tópica de hidrocloreto de fenilefrina y tropicamida (Anestalcon, Laboratorios Alcon, Buenos Aires, Argentina) y la córnea fue lubricada intermitentemente con solución salina. Las ratas se colocaron frente al estímulo lumínico, a una distancia de 20 cm. Todos los registros se realizaron dentro de los 20 min siguientes a la inducción de la anestesia y se mantuvo la temperatura corporal usando mantas térmicas. El electrodo de referencia se colocó en la oreja (ipsilateral), el electrodo de

tierra en la porción media de la cola y un electrodo de registro de oro se ubicó en el centro de la córnea. Todo el procedimiento se realizó bajo una luz roja de 15 W, que no afectó la adaptación de los animales a la oscuridad. Los electrorretinogramas (ERGs) de ambos ojos se registraron simultáneamente y en completa oscuridad. Para ello, se aplicaron 15 pulsos de luz blanca sin atenuación (5 ms, 0,2 Hz) generados por un estimulador fótico de diodos, aplicados con una intensidad máxima de 9 cd.s/m². Los registros se amplificaron utilizando un equipo Akonic BIO-PC (Akonic, Argentina). La señal se registró con una ganancia de 100 V, sin atenuación, con filtros de ruido de baja (1,5 Hz) y de alta (1000 Hz) frecuencia para optimizar el registro. Se determinó la amplitud (en μ V) de la onda a como la diferencia en amplitud entre la línea isoeletrica y el pico negativo, y la amplitud de la onda b como la diferencia entre el pico de la onda a y el pico positivo de la onda b. Se determinaron las latencias de cada onda. La respuesta electrorretinográfica se obtuvo a partir del promedio de los valores de cada corrida.

4.2. Potenciales visuales evocados (VEPs). Los animales se anestesiaron como se describió anteriormente. Bajo control estereotáxico, se colocaron quirúrgicamente dos electrodos de acero inoxidable, utilizados como electrodos positivos, 3 mm lateral a la sutura interhemisférica y 5,6 mm detrás del bregma, que penetró la corteza hasta aproximadamente 0,5 mm (Figura 8). Los electrodos de referencia se colocaron a 2 mm laterales de la línea media y 2 mm anterior a bregma (Belforte y col., 2011). Los electrodos se aislaron y se cubrieron con acrílico; la piel se suturó con nylon 5/0 y se administraron antibióticos tópicamente. Después de 5 días de la implantación de los electrodos, los animales se adaptaron a la oscuridad durante 2 h y se anestesiaron como ya se describió. Todos los registros se obtuvieron dentro de los 20 minutos después de la inducción de anestesia. Las pupilas se dilataron con proparacaína (AlconMidryl, Laboratorios Alcon, Buenos Aires, Argentina), y la córnea se irrigó intermitentemente con solución salina. Cada ojo se registró individualmente, ocluyendo

el ojo contralateral con papel carbón negro, y se registró un promedio de 70 estímulos (Figura 8). Los ojos se estimularon con luz blanca no atenuada (1 Hz) por un fotoestimulador con una intensidad de 5 cd.s/m^2 , con filtros para frecuencias bajas y altas (0,5 a 100 Hz, respectivamente) y 12,5 mV de ganancia. La amplitud y latencia de los componentes P1-N1 y N1-P2 de los VEPs se evaluaron con el *software* AkonicBio-PC (Akonic, Buenos Aires, Argentina) acoplado a una PC.

Potenciales visuales evocados (VEPs)

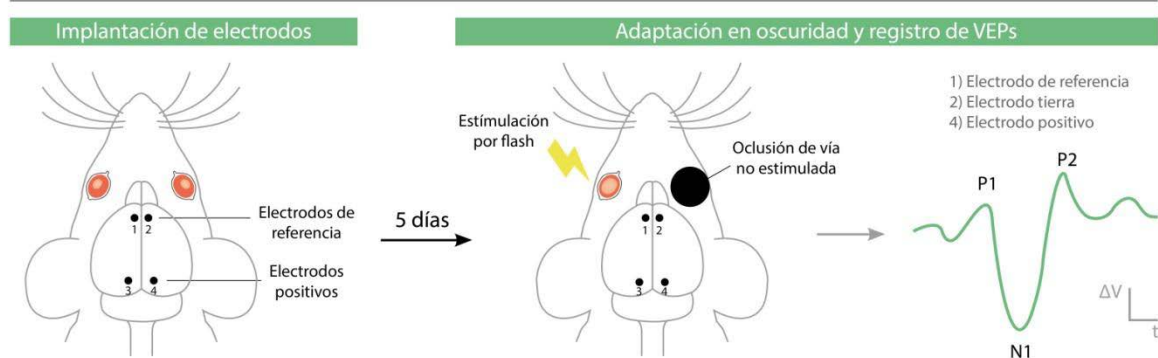


Figura 8. Esquema de procedimiento experimental de registro de potenciales visuales evocados (VEPs).

4.3. Reflejo pupilar consensual. Se inyectó con vehículo, LPS, LPS + bindarit o rtPA en un NOp, mientras que el NOp contralateral permaneció intacto. Los animales se adaptaron a oscuridad por 2 h. En algunos experimentos, el ojo en el que se inyectó el nervio con vehículo o LPS se estimuló con luz de alta intensidad (1200 lux) durante 30 s y se registró el reflejo pupilar (RP) en el ojo contralateral (intacto) (Figura 9). En otros experimentos, el estímulo de luz se aplicó en el ojo intacto, y se registró la contracción pupilar del ojo cuyo nervio fue inyectado. Los registros se realizaron bajo luz infrarroja con una cámara de video digital (Sony DCR-SR60, Tokio, Japón). La frecuencia de muestreo fue de 30 fotogramas por segundo. Se descompilaron los videos en fotogramas por el *software* OSS Video Decompiler Software (One Stop Soft, Nueva Inglaterra, EE. UU.). Los resultados se expresaron como el porcentaje de contracción pupilar antes (estado inicial) y 30 s después del pulso de luz.

Reflejo pupilar consensual (RP)

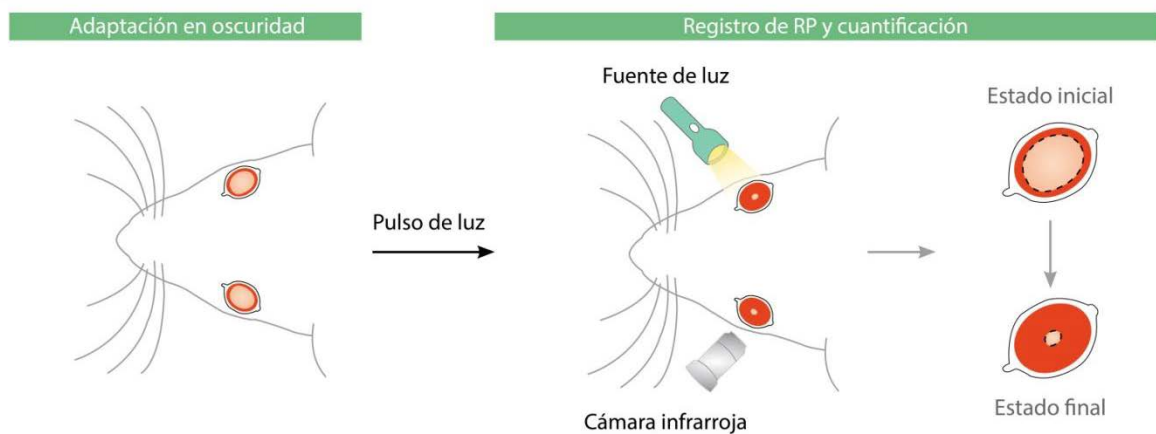


Figura 9. Esquema del procedimiento experimental para el registro del reflejo pupilar consensual (RP).

4.4. Imágenes por resonancia magnética funcional

4.4.1. Preparación de los animales. Los animales se anestesiaron con 4% de isoflurano (mezclado con oxígeno, a un flujo de 2%) durante 5 minutos en una caja de anestesia de acrílico. Las dosis controladas se proporcionaron mediante un vaporizador de isoflurano. Luego de la inducción de anestesia, se inyectó de forma subcutánea 18,5 µg/kg de clorhidrato de dexmedetomidina. La anestesia se mantuvo con 0,7% de isoflurano en oxígeno a lo largo del proceso de configuración y escaneo. Una vez anestesiados, los animales se colocaron boca abajo sobre una cama *ad hoc* (Bruker BioSpin, Alemania), con un cono nasal y una barra dental para restringir el movimiento. Se utilizó una antena de cuadratura para transmisión de radiofrecuencia y una antena de superficie de 2x2 canales para recepción, colocadas directamente sobre el cráneo del animal (Bruker BioSpin, Alemania) de manera que la bobina se centró entre las dos orejas. El conjunto completo se colocó dentro de un escáner de un resonador Bruker Pharmascan 70/16 US, 7 Tesla (Bruker, Ettlingen, Alemania), se hizo circular agua caliente dentro del soporte y se monitoreó la temperatura rectal, la frecuencia respiratoria y la saturación de oxígeno periférico mediante un sensor (SA Instruments, Stony Brook, NY) colocado sobre una de las patas traseras (Figura 10). Las

mediciones de signos vitales se monitorearon en tiempo real y se mantuvieron en límites normales (saturación de oxígeno >89%). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud” del Ministerio de Salud de México, que sigue la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Instituto Nacional de Salud (NIH Publicaciones No. 8023, revisada en 1978). Los protocolos de investigación animal fueron aprobados por el comité de atención de animales del Instituto de Neurobiología, Universidad Autónoma de México.

4.4.2. Estimulación fónica. Para la estimulación lumínica, se diseñó una fuente de luz externa estroboscópica blanca LED acoplada a fibras ópticas que fueron conectadas en los ojos de los animales a través de una máscara diseñada al efecto. Los LEDs fueron conectados a una placa *Arduino 2.0* (Arduino ®) y la programación de la duración y la frecuencia de los estímulos fue realizada con el *software* del fabricante (<https://www.arduino.cc/en/Main/Software>). El protocolo de estimulación tuvo una duración total de 20 min (15 ciclos de 20 s LEDs *off*, 20 s LED izquierdo *on*, 20 s LEDs *off*, 20 s LED derecho *on*) a una frecuencia de 1 Hz.

4.4.3. Adquisición de las imágenes. Los protocolos de imagen se realizaron usando Paravision 6.0.1 (Bruker, Ettlingen, Alemania). Primero, se adquirió una exploración anatómica utilizando una adquisición rápida *spin-echo* con secuencia de ecos reorientados (Turbo-RARE) con los siguientes parámetros: tiempo de repetición (TR) = 1800 ms, tiempo de eco (TE) = 38 ms, factor RARE = 16, número de promedios (NEX) = 2, campo de visión (FOV) = $18 \times 20 \text{ mm}^2$, dimensión de la matriz (MD) = 144×160 , espesor de corte = 0,125 mm, resultando en vóxeles isométricos de $0,125 \times 0,125 \times 0,125 \text{ mm}^3$. Antes de ejecutar la secuencia de imágenes de resonancia magnética funcional (IRMf), la homogeneidad de campo local se optimizó dentro de un elipsoide que cubrió el cráneo utilizando mapas de campo previamente adquiridos. Las imágenes del contraste BOLD (del inglés, *blood-oxygen-*

level dependent) se adquirieron utilizando una secuencia de imágenes 2D mediante adquisición ecoplanar con eco de *spin* (SE-EPI): TR = 1000 ms, TE = 19 ms, ángulo de inclinación (FA) = 90°, FOV = 18 × 16 mm², MD = 108 × 96, produciendo una dimensión de vóxel en el plano de 0,167 × 0,167 mm², y un espesor de corte de 0,7 mm.

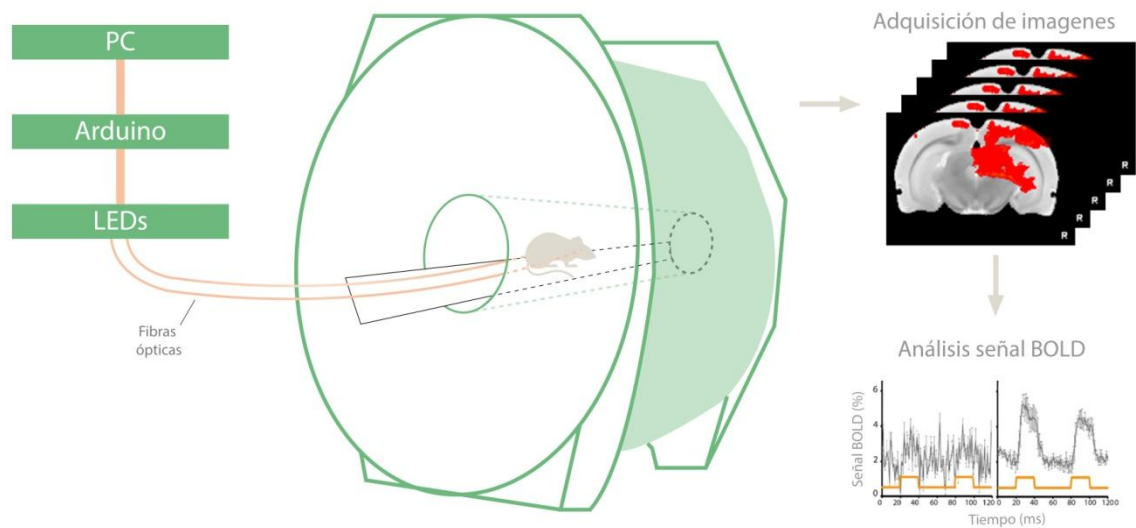


Figura 10. Esquema del procedimiento experimental para la estimulación fónica LED en la adquisición de imágenes de resonancia magnética funcional (IRMf).

4.4.4. Pre-procesamiento de datos funcionales. El pre-procesamiento de datos se realizó con *FSL* v5.0.9. Específicamente, los primeros 5 volúmenes de cada serie funcional se descartaron para evitar la inestabilidad inicial de la señal. Luego, los datos se sometieron a corrección de sincronización de corte y corrección de movimiento, tomando el primer volumen como referencia. Este volumen de referencia también se usó para determinar la transformación del cuerpo rígido a la imagen anatómica correspondiente. La transformación del cuerpo rígido se combinó con una transformación no lineal a la plantilla del grupo. Las imágenes funcionales se deformaron a la plantilla del cerebro de la rata y se re-muestrearon hasta una resolución final de 0,4 × 0,4 × 0,4 mm³. Una vez en el espacio de la plantilla, se obtuvieron los primeros 5 vectores propios (series de tiempo) dentro de la máscara de materia blanca combinada para descartar aún más las confusiones fisiológicas. Estos *eigen-vectores* y

los 6 parámetros de movimiento (3 rotaciones, 3 desplazamientos) fueron regresados de las series funcionales de cada animal.

4.5. Estudio por imágenes de resonancia magnética sensibles a difusión

4.5.1. Preparación del tejido. A los 21 días post-inyección de LPS, las ratas anestesiadas se perfundieron intracardiácamente con solución salina, seguido de una solución fijadora de 4% de formaldehído, 2% de glutaraldehído en PBS 0,1 M y 0,2 % de Gadovist (314 mg de gadolinio, Laboratorios Bayer). Se extrajo el cerebro junto a los nervios ópticos y se trataron con el mismo fijador durante 24 h.

4.5.2. Adquisición de las imágenes. Los cerebros inmersos en fluorocarbono (3M Fluorinert FC-40) se colocaron dentro de una jeringa a una temperatura de 21°C +/- 1°C. Se utilizó una bobina de transmisión/recepción enfriada por helio (Bruker Cryoprobe), que disminuye el ruido térmico propio de la electrónica. Para la adquisición de la serie requerida de imágenes ponderadas por difusión (DWI), se empleó una secuencia ecoplanar con 8 segmentos con adquisición en tres dimensiones, modificada mediante la adición del par de gradientes sensibilizadores a la difusión Stejskal-Tanner. Las imágenes ponderadas por difusión se adquirieron con un período de repetición (TR) de 0,25 s, tiempo de spin-echo (TE) de 25,19 ms, tiempo entre la aplicación de pulsos de gradiente (DELTA) 10,82 ms y duración del gradiente de difusión (delta) 4,9 ms. Las dimensiones de los vóxeles fueron de 80 x 80 x 80 mm³. Las imágenes se adquirieron con 54, 53, 34 y 20 direcciones de gradientes para b = 7000, 5000, 3000 y 1000 respectivamente. La adquisición de estos datos tuvo una duración de 15 horas.

4.5.3. Análisis de las imágenes. Las imágenes de difusión se procesaron utilizando el modelo del tensor (Basser y Pierpaoli, 1996), implementado en el *software* mrtrix (versión 3), que ajusta el modelo de manera no lineal. El tensor se diagonalizó y se obtuvieron parámetros

invariables a rotación, específicamente la fracción de anisotropía (FA, con valores sin unidades, en el rango [0 - 1]). Se delinearon manualmente regiones de interés a nivel de los nervios ópticos, de los cuales se derivaron los valores arriba mencionados como el valor promedio de todos los vóxeles contenidos en las regiones de interés.

4.6. Estudio conductual por estimulación *looming*. Se construyó una arena de material *foam core* de 70 cm de ancho $\times$ 70 cm de profundidad $\times$ 45 cm de alto. El piso y las tres paredes se cubrieron con cartón encapado blanco mate para evitar los reflejos del estímulo luminoso. La arena fue iluminada con luz cenital de la pantalla gris del monitor (20 lux) colocado en el techo. Una de las paredes de la arena fue construida de material acrílico transparente para facilitar el registro de video de las pruebas (Figura 11A). Los registros se realizaron con una cámara de video digital (Sony DCR-SR60, Tokio, Japón). La frecuencia de muestreo fue de 30 fotogramas por segundo. Se descompilaron los videos en fotogramas por el *software OSS Video Decompiler Software (One Stop Soft, Nueva Inglaterra, EE. UU.)*. Después de varias pruebas piloto, todos los experimentos se realizaron en machos y durante el día. Todos los animales fueron evaluados tres veces y se informaron los resultados de un total de 10 animales: 5 cuyos NOps se mantuvieron intactos y 5 animales que fueron inyectados de manera bilateral con LPS en los NOps, antes y 7 y 21 días post-inyección. Una vez finalizado el estímulo, se retiró el animal y la arena se limpió entre ensayos con etanol al 70%. El protocolo del procedimiento de las pruebas de *looming* fue adaptado del trabajo en ratones de Yilmaz y Meister (2013). Luego de 10 min de permanencia en la arena, se reprodujo un video de estímulo *looming* diseñado con el programa Adobe Flash®. El estímulo consistió en 10 ciclos de expansión de un disco negro sobre un fondo gris de 2 a 20 grados durante 0,5 s, seguidos de 0,5 s de pantalla en gris, con una duración total de 10 s

(Figura 11B). Luego de la descompilación de los videos, se midió la latencia desde el inicio del estímulo hasta el comienzo del *freezing* del animal (latencia de *freezing*) (Figura 11C).

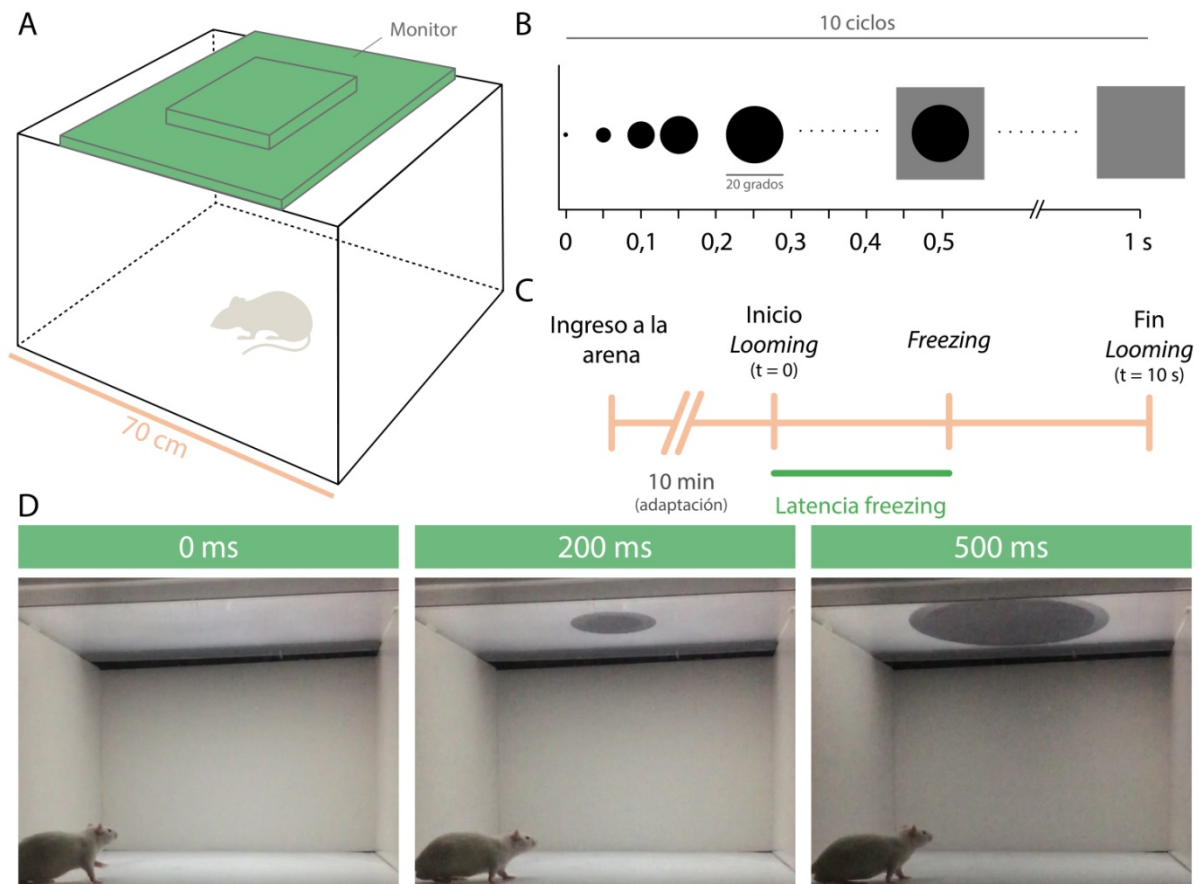


Figura 11. Estimulación *looming*. Panel A: representación esquemática de la arena con el monitor en la parte superior. Panel B: expansión del estímulo *looming* de 2 a 20 grados durante 0,5 s seguido de la pantalla en gris por 0,5 s. Se dispararon 10 ciclos con una duración total de 10 s. Panel C: esquema de procedimiento de cada prueba. Las ratas se expusieron durante 10 min a adaptación, luego se aplicó el estímulo. Se registró la latencia al *freezing*, comprendida entre el inicio del estímulo y el inicio de la respuesta *freezing*. Panel D: fotogramas representativos de una prueba en un animal control antes, 200 y 500 ms del estímulo *looming*.

5. Estudios de transporte de la subunidad β de la toxina colérica

Según el protocolo experimental a los 4 ó 18 días después de la inyección del vehículo o LPS, las ratas se anestesiaron y se les administró tópicamente una gota de proparacaína al 0,5% (Anestalcon, Laboratorios Alcon, Buenos Aires, Argentina) como anestésico local. Utilizando una jeringa Hamilton 30G se inyectaron 4 μ l de la subunidad β de la toxina colérica (CTB) al 0,1% conjugada con el fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE. UU.) en el humor vítreo (Figura 12). Las inyecciones se aplicaron a 1 mm

del limbo y la aguja permaneció en el ojo durante 30 s para evitar la pérdida de volumen. Tres días después de la inyección, las ratas se anestesiaron y se perfundieron intracardiácamamente, como se describirá en la siguiente sección. La cuantificación de la marca de CTB se realizó según el método descrito por Crish y colaboradores (2010) con algunas modificaciones. Se obtuvieron secciones coronales de 40 μm (una por medio) y se realizó una reconstrucción completa del CS en vista dorsal, utilizando el programa Matlab (*The Math Works Inc.*, EE.UU). Para cada sección se delimitó y se calculó el área correspondiente a la región retinotópica. Luego, se convirtieron las imágenes digitales a escala de grises de 8-bits y se calculó la densidad óptica para la marca de CTB, que se relativizó al área total de la proyección retinotópica obtenida anteriormente. De esta forma, se obtuvo un vector con la información lineal de la intensidad relativa de marcación. Se calculó el largo total del CS (en el plano rostro-caudal) y se dividió el vector en *bins* (4 μm) de la región medial a lateral. Finalmente, se aplicó una escala térmica colorimétrica (de azul = 0% a rojo = 100%). Se determinó el número de cortes y el espesor (2x) y se realizó la reconstrucción final del mapa de proyección retinotópica al CS con vista dorsal. Se analizaron 5 animales por grupo.

Transporte anterógrado

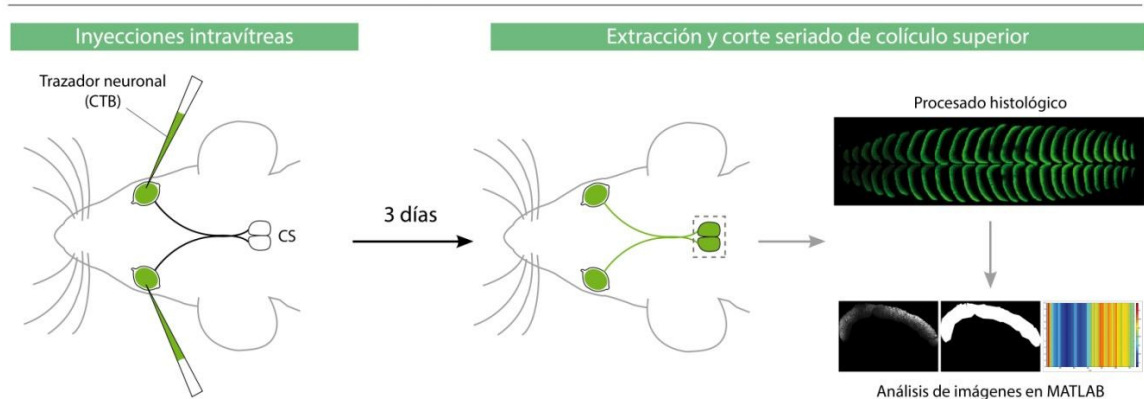


Figura 12. Esquemas del procedimiento experimental y análisis del transporte anterógrado con inyección de CTB acoplada al fluoróforo Alexa 488.

6. Procesamiento histológico

Los animales se anestesiaron y perfundieron intracardiácamente con solución salina, seguida de una solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7,4). Se obtuvieron los nervios desde la cabeza del NOp hasta el quiasma óptico. Tanto los ojos como los nervios ópticos se fijaron posteriormente en solución fijadora durante 24 h a 4°C.

6.1. Secciones semifinas. Las ratas anestesiadas se perfundieron intracardiácamente con solución salina, seguido de una solución fijadora de 4% de formaldehído y 2% de glutaraldehído en PBS 0,1 M (pH 7,4). Se removieron los NOps, se obtuvieron porciones cercanas al ojo (2 mm) y se sumergieron en la misma solución fijadora durante 24 h. Después de varios lavados, algunos bloques de tejido se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 2% en PBS, durante 1 h. La deshidratación se logró mediante series crecientes de etanol, y las muestras de tejido se incluyeron en resina epoxi. Las secciones semifinas (0,5 µm) obtenidas con un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung, Austria) se tiñeron con Azul de Toluidina y se usaron para el análisis morfométrico (densidad y número de axones). Para el estudio ultraestructural, las secciones se montaron en rejillas *Mesh 200* y se tiñeron con acetato de uranilo (2% en etanol al 70%) y con citrato de plomo de Reynolds. Finalmente, se tomaron fotos usando un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 109T (Carl Zeiss Microscopy, Peabody, MA, EE.UU.), equipado con una cámara digital (ES1000W, Gatan, Pleasanton, CA, EE.UU.).

6.2. Obtención de cortes en parafina. Después de la post-fijación, las muestras se incubaron en etanol al 70% durante toda la noche, se deshidrataron (en serie creciente de alcohol: 96%, 100%), se aclararon en 1-butanol y se incluyeron en parafina. Las secciones seriales longitudinales y transversales (5 µm) se obtuvieron usando un microtomo (Leica, Leica Microsystems, Buenos Aires, Argentina). Algunas secciones se usaron para el análisis histológico/morfométrico (tinción con hematoxilina-eosina (H&E), mielinización (*Luxol Fast*

Blue) e inmunofluorescencia. Las secciones para inmunofluorescencia se montaron sobre portaobjetos con carga electrostática (Superfrost Plus Esco, EE.UU), mientras que el resto de las muestras se montaron en portaobjetos no cargados.

6.3. Cortes por congelación. Luego de la post-fijación, los cerebros se sumergieron en soluciones crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%), se armó un taco con solución de criopreservación (Cryoblock, O.C.T, EE.UU). Se obtuvieron cortes coronales (40 μ m) en un crióstato CM 1850 (Leica, Alemania). Las secciones se mantuvieron en PBS/glicerol (50:50) a -20°C hasta su posterior análisis. Todos los cortes se montaron sobre portaobjetos con carga electrostática (Superfrost Plus Esco, EE.UU).

7. Análisis por inmunomarcación

7.1. Inmunofluorescencia en secciones. Las secciones fueron tratadas con xilol y rehidratadas en soluciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 70%) hasta PBS. La recuperación antigénica se realizó a 90°C durante 30 min en buffer citrato (pH 6,3) seguida de una permeabilización con 0,1% de Tritón X-100 en PBS durante 20 min. Las secciones se incubaron con una solución de bloqueo de sitios inespecíficos con suero fetal equino normal al 2% por 60 min. Luego, las muestras se incubaron con diversos anticuerpos primarios (Tabla 1) durante toda la noche a 4°C. Para cada tratamiento se realizaron controles negativos sin el agregado del anticuerpo primario. Luego de varios lavados, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios (Tabla 2) por 2 h a temperatura ambiente.

Anticuerpo	Antígeno	Especie y tipo	Dilución	Empresa
Brn3a	Factor de transcripción de neuronas	Cabra policlonal	1:500	Santa Cruz, EE.UU.
CCL-2	Quimiocina con motivo C-C 2	Conejo policlonal	1:300	Abcam, EE.UU.
ED1	Glicoproteína de cadena corta lisosomal	Ratón monoclonal	1:500	Abcam, EE.UU.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida	Ratón monoclonal	1:1200	Sigma, EE.UU. (conjugado-Cy3)
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida	Ratón monoclonal	1:800	Sigma, EE.UU.
Iba-1	Proteína ligadora de calcio iónico	Cabra policlonal	1:500	Abcam, EE.UU.
MBP	Proteína básica de mielina	Conejo policlonal	1:1000	**
pNFH	Cadena pesada del neurofilamento fosforilado	Ratón policlonal	1:1000	Abcam, EE.UU.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo de tesis. ** El anticuerpo anti-MBP fue donado generosamente por el Dr. Campagnoni AT (Mental Retardation Research Center, University of California, Los Angeles, CA, USA).

Anticuerpo 2 ^{rio}	Especie	Dilución	Empresa	Conjugado
Anti-cabra	Burro	1:500	Life Technologies, EE.UU.	Alexa Fluor 568
Anti-conejo	Burro	1:500	Abcam, EE.UU.	Alexa Fluor 568
Anti-conejo	Burro	1:500	Abcam, EE.UU.	Alexa Fluor 488
Anti-ratón	Burro	1:500	Abcam, EE.UU.	Alexa Fluor 488

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo de tesis.

Finalmente, las secciones se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 0,5 µg/ml en solución fisiológica) o Hoechst 33342 (5 µg/ml en solución fisiológica) por 10 min y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories, EE.UU.).

7.2. Estudios de inmunofluorescencia en retinas en montaje plano. Los animales se perfundieron como ya se describió. Los ojos se extrajeron cuidadosamente y se post-fijaron en la misma solución fijadora por 30 min a 4°C. Se aislaron cuidadosamente las retinas y se lavaron en *free floating*. Tanto la permeabilización como la inmunomarcación se llevaron a cabo como se describió en la sección 6.1. Las retinas se incubaron con anticuerpos primarios

anti-Brn3a durante 16 h a 4°C con una posterior incubación con anticuerpos secundarios. Finalmente se montaron en portaobjetos cargados. Las muestras obtenidas en las secciones 6.1 y 6.2 se observaron con un microscopio de epifluorescencia (BX50; Olympus, Tokio, Japón) conectado a una cámara de video (3CCD; Sony, Tokio, Japón), adjunto a una computadora que ejecuta un *software* de análisis de imágenes (Image-Pro Plus; Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, EE. UU.).

8. Procesamiento de imágenes y cuantificación

Todas las imágenes obtenidas se ensamblaron y procesaron utilizando Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, San José, CA, EE. UU.) y sólo se realizaron ajustes de brillo y contraste. Para todo el procesamiento y análisis de imágenes morfométricas, las imágenes digitalizadas TIFF capturadas se transfirieron al *software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU. [http: //imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)).

8.1. Análisis del nervio óptico

8.1.1. Evaluación morfométrica de cortes transversales de nervio óptico. Algunas secciones se usaron para el análisis histológico (tinción con H&E). Se determinó el área transversal total y el número de núcleos por sección. Las mediciones (200x) se realizaron en la zona yuxtapuesta al área de inyección.

8.1.2. Cuantificación de axones por Azul de Toluidina. Se calculó el área total del NOP a partir de fotografías obtenidas con un aumento de 200x en cortes transversales semifinos (Figura 13A). Se tomaron imágenes (área de 0,01 mm²) con una magnificación de 1000x. El área total de cuantificación para cada muestra fue de 0,05 mm² (25% del área total del NOP). Las fibras mielínicas se delimitaron digitalmente por el margen interno de las vainas de mielina (representando el diámetro axonal) (Figura 13D). Se cuantificó el número y el área de axones por imagen y se obtuvo la densidad axonal. Para cada NOP se promediaron los

resultados obtenidos de 5 secciones y el promedio obtenido de 5 nervios se consideró el valor representativo para cada grupo. Se calculó el número total de axones por sección relativizando la densidad axonal al área total de la sección transversal del NOp.

8.1.3. Cuantificación de marcas inmunorreactivas en nervio óptico. Se analizaron secciones transversales y longitudinales de NOp. Se obtuvieron microfotografías de la región proximal con una magnificación final de 200x. Las imágenes se procesaron como ya se describió. Se cuantificó el área pNFH(+), GFAP(+), Iba-1(+), ED1(+) (también llamado CD68, del inglés *cluster of differentiation* 68), MBP(+) y CCL-2(+). El resultado se expresó en unidades arbitrarias (Figura 13D y F).

8.1.4. Estado de mielinización por Luxol Fast Blue. Luego de la desparafinización, algunas secciones se incubaron en soluciones decrecientes de etanol (100% y 96%) y se sumergieron durante toda la noche a 60°C en una solución de *Luxol Fast Blue* al 0,1% (Biopack, Buenos Aires, Argentina) en etanol acidificado al 96%. La diferenciación y la contratinción se llevaron a cabo con 0,01% de Li_2CO_3 e incubación durante 5 minutos con 0,5% de Rojo Neutro (Biopack, Buenos Aires, Argentina), respectivamente (Figura 13B y E). Finalmente, los portaobjetos se montaron con bálsamo sintético.

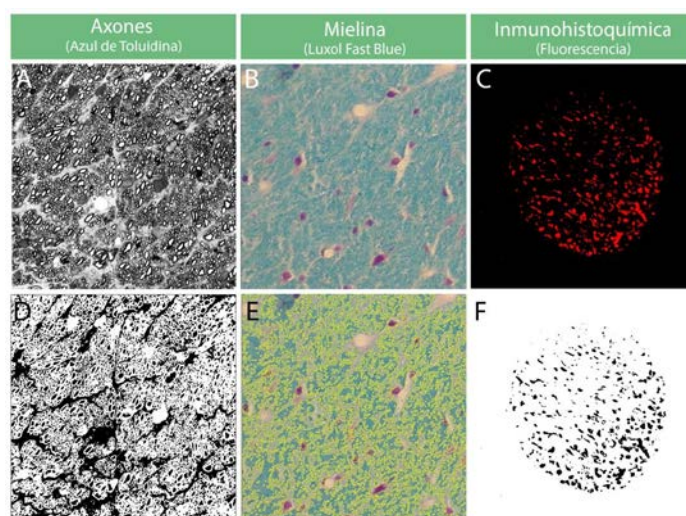


Figura 13. Cuantificación del número y área de axones mielínicos (A), mielina (B) e inmunorreactividad (C) con el programa ImageJ. Para los axones se aplicó un valor umbral de corte en la escala de grises y se convirtió la imagen a modo binario, donde al área axonal quedó delimitada por el borde interior de la vaina mielínica. Finalmente, se cuantificaron las partículas limitando el rango de tamaño, para excluir procesos gliales y vasos

sanguíneos (D). Para la mielina se aplicó un umbral en color, se delimitó en amarillo el área positiva de marca y luego se cuantificó el porcentaje del área positiva para la tinción con *Luxol Fast Blue* (E). En los estudios inmunohistoquímicos, se aplicó un umbral de marca en escala de grises, se transformó a modo binario y se cuantificó el área de marca positiva, relativa al área total de la sección (F).

8.2. Análisis de la retina

8.2.1. Evaluación morfológica de cortes transversales de retina. Secciones transversales de retina se tiñeron con H&E. Se obtuvieron fotografías de secciones tomadas a una distancia aproximada de 1 mm del NOp (región dorsal y ventral), con un aumento final de 200x. Se midió el espesor promedio de la retina total, de la capa plexiforme interna (CPI), de la capa nuclear interna (CNI), de la capa plexiforme externa (CPE), de la capa nuclear externa (CNE) y de los segmentos externos de los fotorreceptores (SE). Para cada muestra, se utilizó el promedio de cuatro secciones diferentes como valor representativo.

8.2.2. Cuantificación de marcas inmunorreactivas en retinas. Se analizaron secciones transversales de retinas en fotografías obtenidas con una magnificación de 200x. Las imágenes se procesaron como ya se describió. Se cuantificó el área GFAP(+), Iba-1(+) y ED1(+). El resultado se expresó en unidades arbitrarias relativizadas a 200 μ m de longitud de retina.

8.2.3. Cuantificación de células ganglionares en retinas en montaje plano. Las retinas se separaron cuidadosamente y se montaron con el lado vítreo hacia arriba en portaobjetos de microscopio *superfrost* (Erie Scientific Company, Portsmouth, New Hampshire, EE. UU.). Las retinas en montaje plano se incubaron durante 16 h a 4°C con los anticuerpos primarios. Después de varios lavados, se añadió un anticuerpo secundario y se incubó durante 2 h temperatura ambiente, como se describió anteriormente. Finalmente, las retinas se montaron con medio de montaje fluorescente (Dako, Glostrup, Dinamarca). Para cada retina, los resultados obtenidos de ocho cuadrantes separados (cuatro del centro y cuatro de la periferia) se promediaron, y la media de 5 ojos se registró como el valor representativo.

9. Cuantificación de leucocitos y temperatura corporal

El número de leucocitos en líquido cefalorraquídeo se evaluó a los 2 días de la inyección de vehículo o LPS en el NOP y en animales cuyos NOPs permanecieron intactos, mediante una cámara *Neubauer*. La técnica para recolectar líquido cefalorraquídeo de la cisterna magna se realizó de acuerdo con Consiglio y Lucion (2000). La cuantificación leucocitaria en sangre periférica se realizó por citometría de flujo con un análisis del tamaño y la complejidad intracelular. Para las mediciones de temperatura corporal, se insertó una sonda a 2 cm en el recto.

10. Western blot

Se homogeneizaron de a dos nervios ópticos por tubo en 250 µl de un buffer que contenía HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, KCl 10 mM, Tritón al 0,5% (v/v), pH 7,9, complementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Después de 15 min a 4°C, los homogenatos se agitaron suavemente durante 15 s y se centrifugaron a 900 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se usaron para determinar la concentración de proteínas. Las proteínas (100 µg/muestra) se separaron en geles conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) y 12% de PAGE (del inglés, *polyacrylamide gel electrophoresis*). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno durante 60 minutos a 15 V en un sistema Bio-Rad Trans-Blot SD (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las membranas se bloquearon en albúmina de suero bobino (BSA) al 3% en solución salina tamponada con Tris (pH 7,4) que contenía Tween-20 al 0,1% durante 60 min a temperatura ambiente y luego se incubaron por 16 h a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo contra COX-2 (1: 200, Cayman Chemical, MI, EE.UU.) o un anticuerpo policlonal de conejo contra NOS-2 (1: 200, Cayman Chemical, MI, EE.UU.). Las bandas se visualizaron por quimioluminiscencia

(*Western Blotting Analysis System*; Amersham Biosciences, Argentina) y se determinaron los niveles de β -actina como control interno de carga. Las membranas se escanearon y la intensidad de las bandas se determinó utilizando el programa *ImageJ*. Los valores se expresaron como unidades arbitrarias de los niveles de la proteína analizada en cada caso, respecto a los niveles de β -actina. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951), usando BSA como estándar.

11. Evaluación de los niveles de TNF- α en nervio óptico

Dos nervios ópticos por tubo se homogeneizaron en 150 μ l de PBS, pH 7,4 complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y un cóctel de inhibidores de proteasas. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13,000 rpm y se eliminó el precipitado. Los niveles de TNF- α se determinaron por ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) usando anticuerpos y estándares de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, EE. UU.). La reacción se detuvo y la absorbancia se leyó inmediatamente a 450 nm en un lector de microplacas (Modelo 3550, BIO-RAD Laboratories, California, EE. UU.). Se expresaron los resultados relativizados a los niveles de proteínas.

12. Evaluación de los niveles de peroxidación lipídica en el nervio óptico

Dos nervios ópticos por tubo se homogeneizaron en 250 μ l de buffer fosfato de potasio 15 mM más 60 mM de KCl, pH 7,2, y los niveles de TBARS (del inglés, *thiobarbituric acid reactive substances*) se analizaron como se describió previamente (Belforte y col., 2010; Moreno y col., 2004). La mezcla de reacción contenía el homogenato de los nervios ópticos (100 μ l), 25 μ l de SDS al 10% y 465 μ l de ácido tiobarbitúrico al 0,8% disuelto en ácido acético al 10% (pH 3,5). Esta solución se calentó a 100°C durante 60 minutos. Después de

enfriar las muestras, el precipitado se eliminó por centrifugación a 3200 g durante 10 minutos. La absorbancia de las muestras se midió a una longitud de onda de emisión de 553 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 515 nm con un espectrofotómetro de fluorescencia Jasco FP 770 (*Japan Spectroscopic Co. Ltd.*, Tokio, Japón). El rango de las curvas estándar de malondialdehído bis-dimetilacetal (MDA) fue 10-2000 pmoles. Los resultados se expresaron como nmoles MDA/mg de proteínas.

13. Purificación de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total de dos nervios ópticos por tubo se aisló usando reactivo TRI (*TRIzol reagent*) (Genbiotech SRL, Buenos Aires, Argentina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó usando transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, EE. UU.). El análisis de los niveles de ARNm de $\text{Il-1}\beta$ y $\text{TNF-}\alpha$ se realizó usando *primers* específicos (para $\text{Il-1}\beta$: Fw: 5'-TGAGTGACACTGCCTTCCTG-3', Rv: 5'-AGGCTTCCTTGTGCAAGTGT-3', para TNF : Fw: 5'-TCAGCCTCTTCTCATTCCTGC-3', Rv: 5'-TTGGTGGTTTGCTACGACGTG-3'). El cDNA del NOP se amplificó por PCR en un ciclador térmico Rotor-Gene 6000 Corbett Life Science (Corbett Research, Mortlake, Australia) y se cuantificó con el *software* Rotor Gene 6000 Series (versión 1.7 *Build 40*). Los productos de PCR se analizaron y se normalizaron al gen de actina- β (*Actb*) como control interno, usando el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

14. Evaluación de los niveles de BDNF en nervio óptico

Dos nervios ópticos por tubo se homogeneizaron en 100 μl de un buffer de muestra del *kit* para la determinación de BDNF (*Emax Immuno Assay System*, Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) con un cóctel de inhibidores de proteasas. Las muestras se

centrifugaron durante 10 min a 15700 g y se eliminó el precipitado. Los niveles de BDNF se determinaron usando un ensayo de ELISA específico para rata, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se detuvo, y la absorbancia se leyó inmediatamente a 450 nm en un lector de microplacas (Modelo 3550, BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

15. Tratamiento con ANA-12 (antagonista selectivo del receptor Trk-b)

En una serie de experimentos, se administró una solución 0,2 mg/kg de peso de ANA-12 en DMSO al 1% (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) o vehículo (DMSO) diariamente de forma intraperitoneal, desde el día 4 hasta el día 7 después de la inyección de vehículo o LPS, 1 hora antes de que se enciendan las luces del bioterio. La forma de administración y la dosificación de ANA-12 se basaron en el trabajo de Cazorla y col. (2011).

16. Análisis de la integridad de la barrera hematoencefálica

16.1. Análisis de la permeabilidad vascular. Los animales se anestesiaron como ya se describió y se realizó una inyección intrayugular de una solución de Azul de Evans (2% peso/volumen en solución fisiológica). Luego de 2 h, los animales se perfundieron con solución salina y se obtuvieron los NOps como se describió previamente. Se determinó la localización del complejo Azul de Evans-albúmina por excitación con luz de 620 nm (emisión 680 nm) en un microscopio de epifluorescencia, como se describió anteriormente.

16.2. Irradiación de animales. Los animales se anestesiaron como se describió anteriormente. Se realizó una irradiación gamma de cuerpo entero en un irradiador IBL 437C (¹³⁷Cesio), fabricado por MikRon Inc. (Wareham, MA, EE.UU.) en la empresa CEBIRSA (Ciudad de Buenos Aires, Argentina). La dosis de radiación fue de 87,2 rad/seg. La dosis de radiación total fue de 9600 rad como una dosis única de cuerpo entero por animal. Durante la

irradiación, las cabezas de los animales se cubrieron con un casco protector de plomo de 5 mm de espesor (Figura 14). Se realizó la inyección de LPS en el NOp como se describió anteriormente 2 días post-irradiación. A los 21 días post-inyección se registró el RP, los animales se sacrificaron, y se procesaron las muestras para el estudio histológico e inmunohistoquímico como se describió anteriormente.

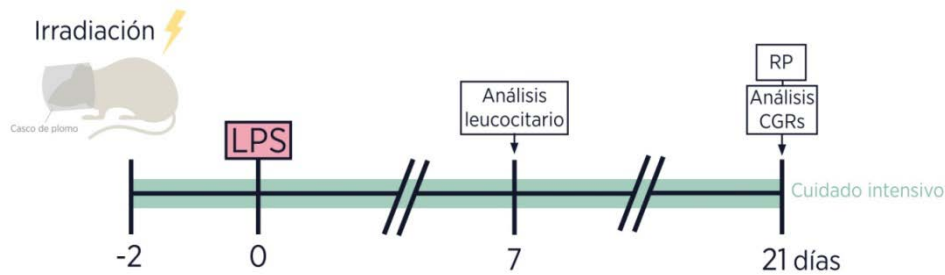


Figura 14. Esquema del procedimiento experimental de irradiación gamma.

16.3. Quimeras WT-GFPp/WT. Ratas *Wistar* macho adultas de 30 días se anestesiaron e irradiaron como ya se describió y recibieron por vía intrayugular 1 ml de solución fisiológica con 500.000 células de médula ósea obtenidas de fémur y tibia de ratas de la cepa ^{eGFP}*Wistar* del mismo peso y edad que las trasplantadas (Figura 15). Luego de 6 semanas las quimeras WT-GFPp/WT se inyectaron con vehículo o LPS en un NOp mientras que el nervio contralateral permaneció intacto, y se sacrificaron a las 6 ó 24 horas post-inyección. Se procesaron los nervios ópticos para el estudio histológico e inmunohistoquímico como se describió anteriormente.

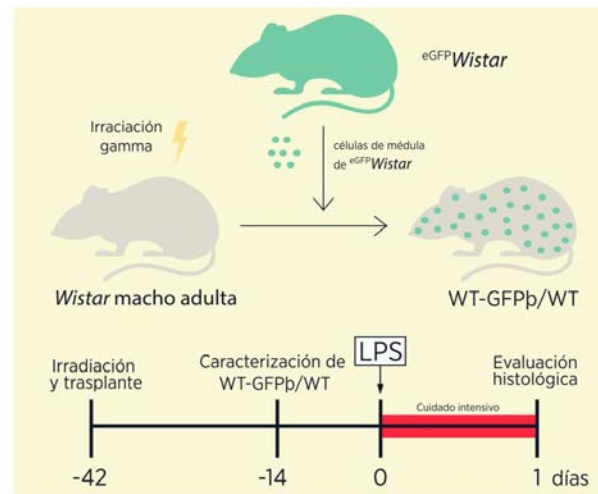


Figura 15. Esquemas del procedimiento experimental para la obtención de animales WT-GFPp/WT.

17. Digestión del nervio óptico y citometría de flujo

Los nervios ópticos se cortaron en trozos pequeños y se digirieron enzimáticamente en 500 μ l de medio (DMEM, 10 mM de HEPES, 16 μ g/ml de colagenasa IV, 10 μ g/ml de DNasa I, 5 mM de Mg^{2+} ; 2,5 mM de Ca^{2+}) a 37°C durante 40 minutos en agitación (< 450 rpm). Se añadió PBS-EDTA (1 mM), el tejido restante se disgregó mecánicamente por pasajes sucesivos por agujas de calibre decreciente (18, 21, 23, 25G) y se filtró con una malla de 70 μ m. Luego, las células se centrifugaron, se lavaron y se tiñeron con colorante de viabilidad *Zombie Yellow* según el protocolo del fabricante (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de bloqueo de suero de rata inactivado por calor, diluido 1: 1 en buffer eFACS (1 mM de EDTA, 10% de FCS). Después del lavado, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios conjugados: AlexaTM 647 CD45 anti-rata y R-Phycoerythrin anti-rata CD11b (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.). Finalmente, las células se lavaron, se resuspendieron en 50 μ l de PBS-EDTA y se analizaron inmediatamente. Todas las etapas de centrifugación se realizaron a 450 g durante 5 minutos a 4°C, y los lavados se realizaron en buffer eFACS. Se analizaron 5×10^5 eventos por condición en un citómetro de flujo Becton-

Dickinson FACSARIAIITM (San José, CA, EE. UU.). Los controles de compensación se prepararon con UltraCompeBeadsTM, siguiendo el protocolo del fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se utilizó el *software* FlowJo v10.0.8 (FlowJo, Ashland, OR, EE. UU.), se excluyeron los dobletes y las células muertas, se seleccionaron las células CD45⁺, que se representaron frente a células CD11b⁺, y se realizaron cuantificaciones relativas.

18. Tratamientos de etopósido y cloruro de gadolinio

Los animales se inyectaron por vía intraperitoneal con etopósido (2 mg/kg, Microsules, Buenos Aires, Argentina) a los -3, -2, -1, 0, 2, 4 y 6 días post-LPS; cloruro de gadolinio (5 mg/kg en 0,6% de NaCl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) a los -1, 0, 2, 4 y 6 días post-LPS, o vehículo (0.9% de NaCl). Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena de la cola a los 0, 4, 7 y 21 días post-inyección, y las poblaciones de leucocitos se analizaron por citometría de flujo (BD AccuriTM C6 Plus). Los resultados se expresaron como porcentaje de cuentas totales. Se midió el RP a los 7 y 21 días post-inyección, y un total de 15 animales (5 animales por tratamiento) se sacrificaron a los 21 días post-inyección de vehículo o LPS para la evaluación histológica.

19. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizaron el test de Student para la comparación entre dos grupos experimentales, o el análisis de varianza a dos vías (ANOVA), seguido del test de Tukey, para comparaciones múltiples.

RESULTADOS

1. Desarrollo de un modelo experimental de neuritis óptica (NOE) primaria

El primer objetivo de esta tesis doctoral fue desarrollar un nuevo modelo de neuritis óptica experimental (NOE) primaria a través de la microinyección de LPS en el nervio óptico (NOp) de ratas *Wistar* macho adultas. Los resultados obtenidos en el cumplimiento de este objetivo se detallan a continuación.

1.1. Estudios funcionales

1.1.1. Potenciales Visuales Evocados. Con el fin de evaluar el efecto de la inyección de LPS en el NOp sobre la función de la vía visual (desde los fotorreceptores hasta la corteza visual primaria), se registraron VEPs a diferentes intervalos posteriores a la inyección de vehículo o LPS. En la Figura 16 se muestra la amplitud promedio de los componentes P1-N1 y N1-P2 de los VEPs, registrados en animales en los que un NOp permaneció intacto (control) y el NOp contralateral se inyectó con vehículo o LPS. El LPS indujo una disminución en la amplitud de los componentes P1-N1 y N1-P2, que fue significativa desde el día 1 y 4 después de la inyección, respectivamente, en comparación con los NOps intactos o inyectados con vehículo (Figura 16A y 16B). No se observó una disminución adicional de estos parámetros hasta 21 días post-inyección de LPS. No se observaron diferencias significativas en las latencias de los componentes P1, N1 y P2 entre todos los grupos (Figura 16 D-F), ni en las amplitudes, ni en las latencias de los VEPs entre NOps intactos y los inyectados con vehículo a lo largo del estudio. En la Figura 16C se muestran registros representativos de VEPs de todos los grupos experimentales en los días 1 y 21 después de la inyección en el NOp.

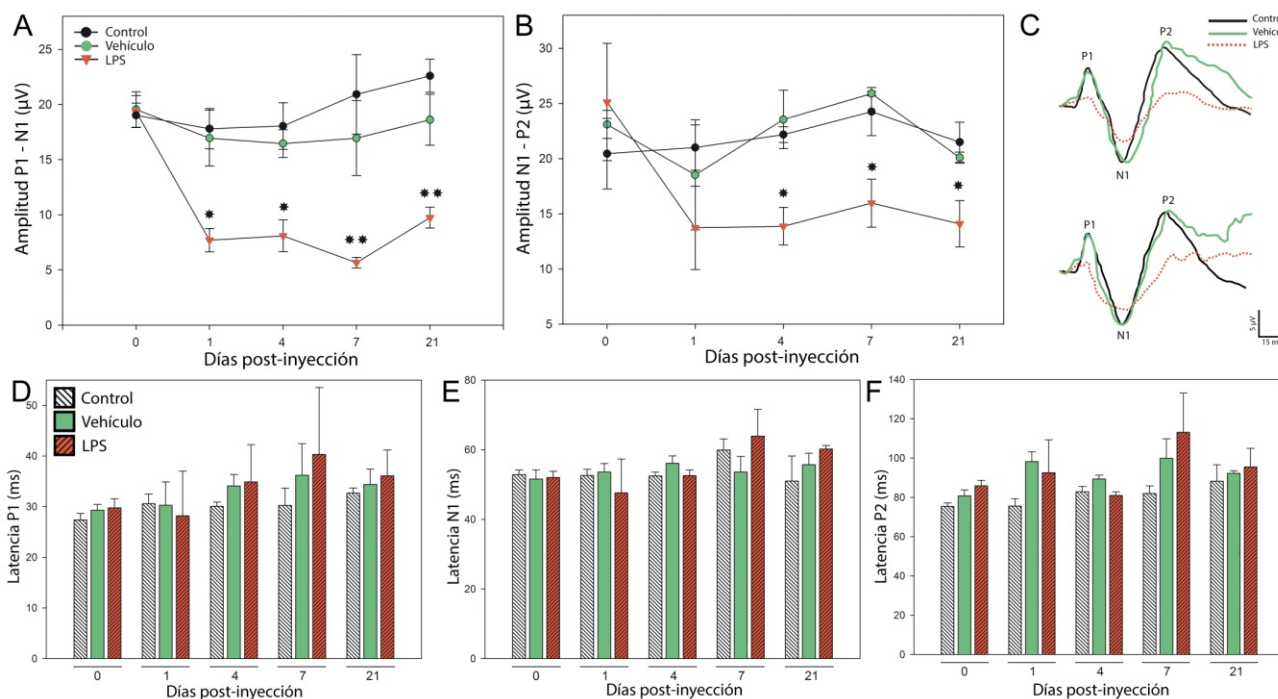


Figura 16. Efecto del LPS sobre los VEPs. Panel A: promedio de las amplitudes del componente P1-N1. Panel B: promedio de las amplitudes del componente N1-P2. La inyección de LPS (triángulos rojos) indujo una disminución en la amplitud de los componentes P1-N1 y N1-P2 a partir del día 1 y 4 post-inyección, respectivamente, en comparación a NOps intactos (control, círculos negros) o inyectados con vehículo (círculos verdes). Los datos están expresados como media $\pm$ SEM ($n = 10$ NOps/grupo). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps intactos o inyectados con vehículo, test de Tukey. Panel C: trazados representativos de VEPs de controles (trazado negro), y NOps inyectados con vehículo (trazado verde) o LPS (trazado discontinuo) a los días 1 (trazados superiores) y 21 post-inyección (trazados inferiores). Se muestran las latencias de P1, N1 y P2 en los paneles D, E y F respectivamente. No se observaron diferencias significativas en las latencias entre los grupos experimentales en todos los intervalos estudiados.

1.1.2. Reflejo pupilar (RP) consensual. Se examinó el RP en animales en los que se inyectó vehículo o LPS en un NOP, mientras que en ambos casos, el NOP contralateral permaneció intacto. Cuando se estimularon con luz los ojos cuyos NOps fueron inyectados con LPS, se observó una disminución significativa en la magnitud de la contracción pupilar del ojo contralateral intacto en todos los intervalos examinados, como se muestra en la Figura 17.

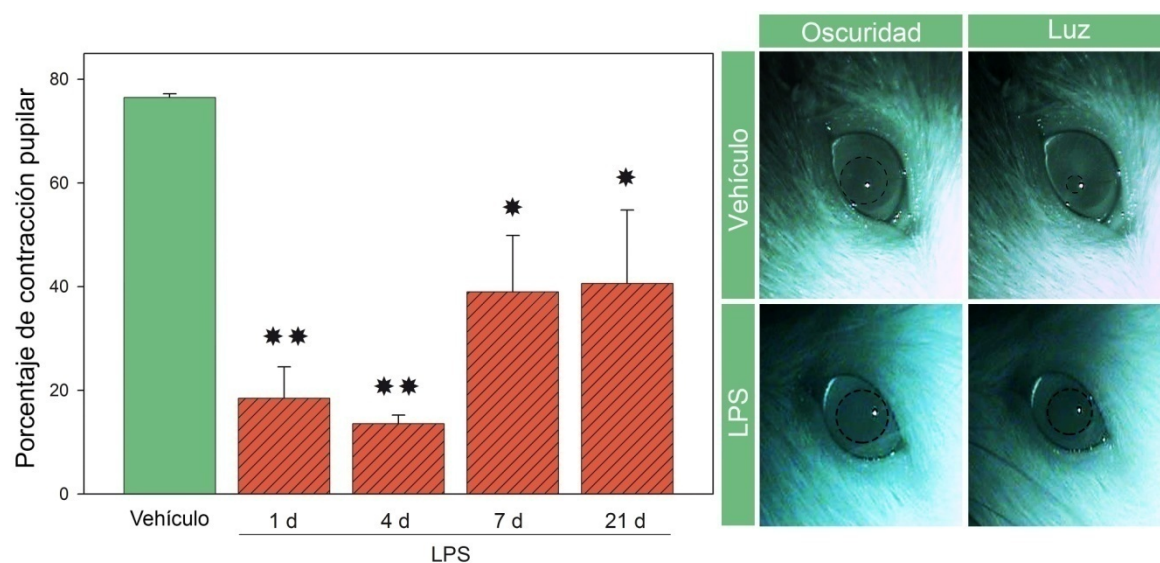


Figura 17. Efecto de la inyección de LPS sobre el RP. Panel izquierdo: se determinó el diámetro pupilar (relativo al diámetro del limbo) a diferentes intervalos post-inyección de vehículo o LPS, y se calculó el porcentaje de contracción pupilar en el ojo contralateral cuyo NOP permaneció intacto. El promedio de la contracción pupilar en respuesta a un flash de luz (1200 lux) disminuyó significativamente partir del día 1 luego de la inyección de LPS y se mantuvo disminuido hasta los 21 días post-inyección. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM ($n = 8$ ojos/grupo). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. vehículo, test de contrastes de Tukey. Panel derecho: imágenes representativas del RP consensual de animales inyectados con vehículo o LPS en el día 1 post-inyección.

Cuando se estimuló con luz el ojo intacto, no se observaron diferencias en la contracción de la pupila entre ambos grupos en todos los períodos post-inyección examinados (Figura 18).

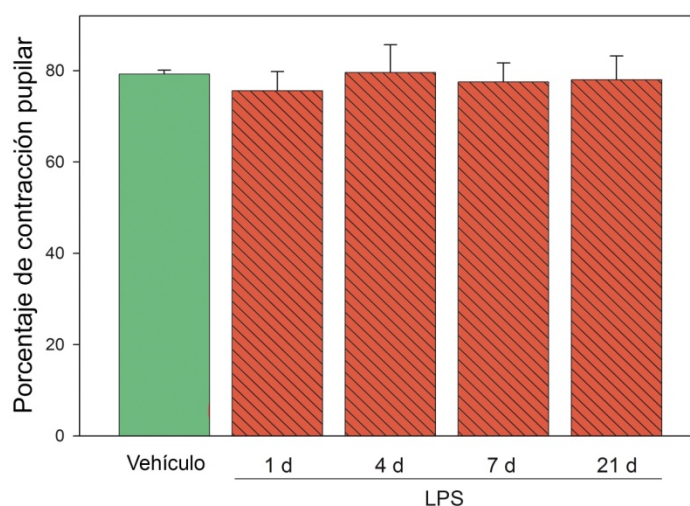


Figura 18. Efecto de la inyección de LPS sobre el RP en el ojo intacto. Se determinó el diámetro pupilar a diferentes intervalos post-inyección de vehículo o LPS, iluminando el ojo intacto y se calculó el porcentaje de contracción pupilar en el ojo contralateral cuyo NOP fue inyectado con vehículo o LPS. No se observaron diferencias entre los grupos experimentales. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM ($n = 8$ ojos/grupo).

1.1.3. Transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica. Se analizó el transporte anterógrado desde las CGRs al CS a través de inyecciones intravítreas bilaterales de CTB en animales en los que se inyectó un NOp con vehículo y el NOp contralateral con LPS. A los 7 días post-inyección de vehículo, se observó marca de CTB en toda el área retino-receptiva del CS contralateral, mientras que en las regiones central y lateral del CS contralateral a NOps inyectados con LPS, se observó una clara reducción en este parámetro (Figura 19A). Un patrón similar se observó a nivel del NGL y el NPO, como se muestra en la Figura 19B).

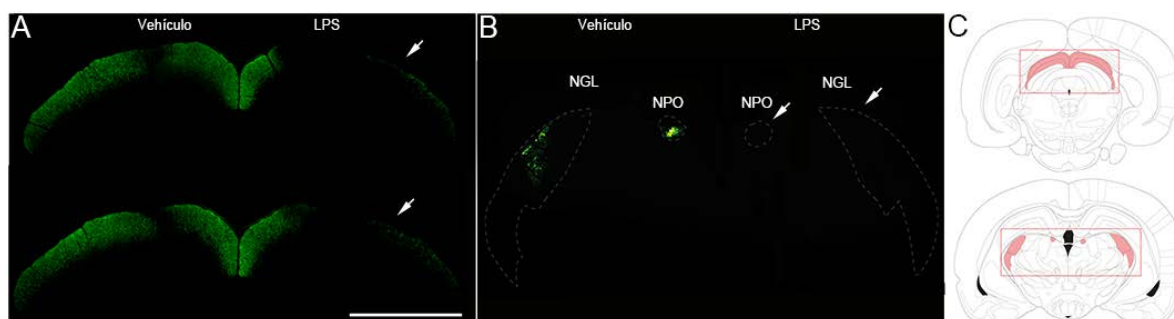


Figura 19. Efecto de la inyección de LPS sobre el transporte anterógrado de CTB desde la retina al CS, el NGL y el NPO. Panel A: Fotografías representativas de secciones coronales del CS de un animal cuyos NOps fueron inyectados con vehículo o LPS. Se observó una disminución de la marca de CTB en el área retino-receptiva del CS contralateral al nervio inyectado con LPS (flecha), en comparación con el CS contralateral al nervio inyectado con vehículo. Panel B: se observó un patrón similar en el NGL y el NPO contralateral a NOps inyectados con LPS (flecha). Se muestran fotografías representativas de 5 animales. Barra = 1 mm. Panel C: Representación esquemática de la localización del CS, el NGL y el NPO en un corte coronal de cerebro de rata.

1.1.4. Imágenes por resonancia magnética funcional. Se analizó por IRMf la señal BOLD en el CS, el NGLd, el NPO y la V1m en respuesta a trenes de estímulos estroboscópicos LEDs antes y 7 y 21 días post-inyección de LPS en el NOp (Figura 20). En estas condiciones experimentales, a los 21 días post-inyección se observó una disminución significativa de la señal BOLD en áreas visuales contralaterales a NOps inyectados con LPS, en comparación a áreas visuales contralaterales a NOps inyectados con vehículo o intactos en todas las áreas visuales estudiadas (Figura 21).

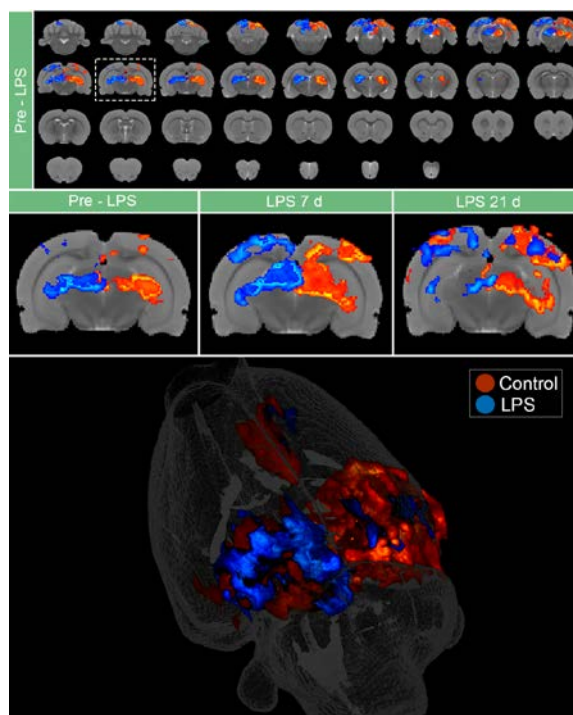


Figura 20. Resonancia magnética funcional en ratas cuyos NOps fueron inyectados con vehículo o LPS. Panel superior: imagen representativa de la señal BOLD en áreas cerebrales que respondieron a estímulos lumínicos estroboscópicos LEDs de 5 animales registrados antes de la inyección de LPS. Panel medio: representación comparativa de la señal BOLD en animales registrados antes y 7 y 21 días post-LPS. Panel inferior: representación de la señal BOLD en vista tridimensional a los 21 días post-inyección de LPS. En todos los casos, la representación térmica en rojo representa la señal BOLD obtenida cuando se estimuló el ojo cuyo nervio permaneció intacto (control), mientras que la representación térmica en azul muestra la señal BOLD cuando se estimuló el ojo cuyo nervio fue inyectado con LPS.

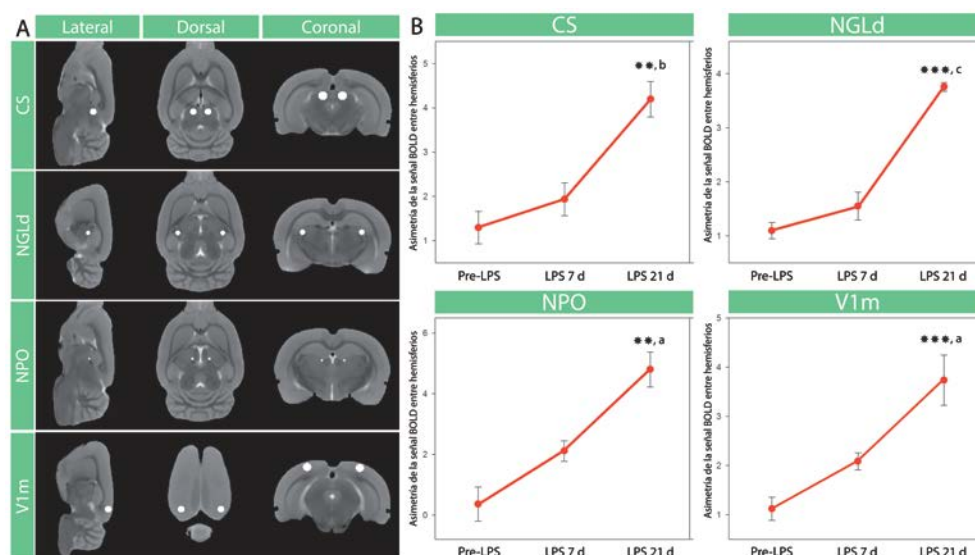


Figura 21. Cuantificación de la señal BOLD por Irmf en cerebro de rata. Panel A: representación de las áreas de estudio (círculos blancos) para cada uno de los núcleos analizados. Panel B: Se observó un aumento en la asimetría de la señal BOLD entre los hemisferios cerebrales a nivel del CS, el NGLd, el NPO y la V1m a los 21 días post-LPS (LPS 21 d). Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ animales/grupo). $**P < 0,01$; $***P < 0,001$ vs. Pre-LPS; a: $P < 0,05$; b: $P < 0,01$; c: $P < 0,001$ vs. 7 días post-LPS (LPS 7d), test de Tukey.

1.1.5. Estudio por imágenes de resonancia magnética sensibles a difusión. Se analizaron imágenes sensibles a difusión de NOps *ex vivo* en la región peri-quiasmática de animales cuyos NOps permanecieron intactos o fueron sacrificados a los 21 días post-inyección de LPS (Figura 22A). Luego del procesamiento de las imágenes, se aplicó el modelo del tensor y se calculó la fracción de anisotropía (FA). Se observó una disminución significativa de este parámetro a los 21 días post-LPS (Figura 22B).

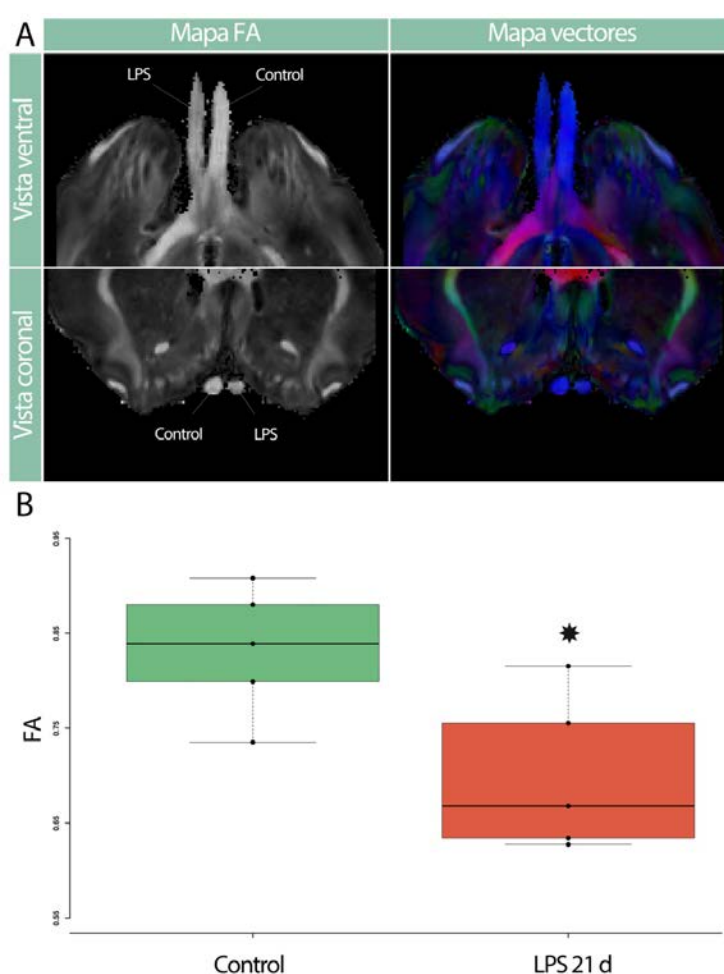


Figura 22. Imágenes sensibles a difusión. Panel A: Se muestran imágenes representativas de mapas de FA y de vectores de la región periquiasmática de 5 animales inyectados con LPS a los 21 días post-inyección (LPS 21 d). Panel B: Cuantificación de FA en NOps de animales intactos o inyectados con LPS a los 21 días post-LPS. Se observó una disminución significativa de este parámetro en NOps inyectados con LPS. Los datos se muestran en *box plot* (n = 5 animales/grupo). * $P < 0,05$ vs. NOps intactos, test de Tukey.

1.1.6. Estudio funcional por estímulo *looming*. Con el fin de analizar funcionalmente la conexión entre la retina y el CS, se realizó la puesta a punto del test de función visual con

estímulo *looming* en animales intactos o inyectados bilateralmente con LPS a los 7 y 21 días post-inyección. Los resultados obtenidos indicaron un aumento significativo en la latencia al comienzo del *freezing* en animales inyectados con LPS a los 21 días post-inyección (Figura 23).

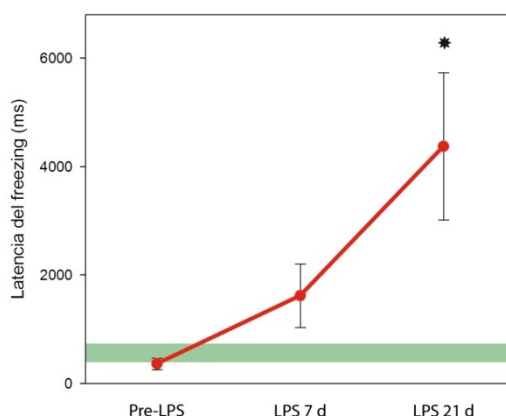


Figura 23. Estudio funcional de la comunicación retina-CS por estímulo *looming*. Se muestra la cuantificación de la latencia desde el comienzo del estímulo al inicio del *freezing* en animales intactos (barra inferior) o inyectados bilateralmente antes (Pre-LPS) y 7 y 21 días post-LPS. Se observó un aumento significativo en este parámetro a los 21 días post-inyección de LPS. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ animales/grupo). * $P < 0,05$ vs. Pre-LPS, test de Tukey.

1.2. Estudios histológicos del NOP

1.2.1. Estudio morfométrico. Se realizó una tinción con H&E en secciones longitudinales y transversales de NOP (Figura 24). En los NOPs inyectados con LPS, se observó un aumento significativo en el número de núcleos ya al día 1, que persistió hasta los 21 días post-inyección (Figura 24). Además, la inyección de LPS indujo un aumento significativo en el área de la sección transversal del NOP a los 7 y 21 días post-inyección. No se detectaron diferencias en el número de núcleos y en el área de sección transversal entre NOPs intactos o inyectados con vehículo en ninguno de los intervalos examinados (datos no mostrados).

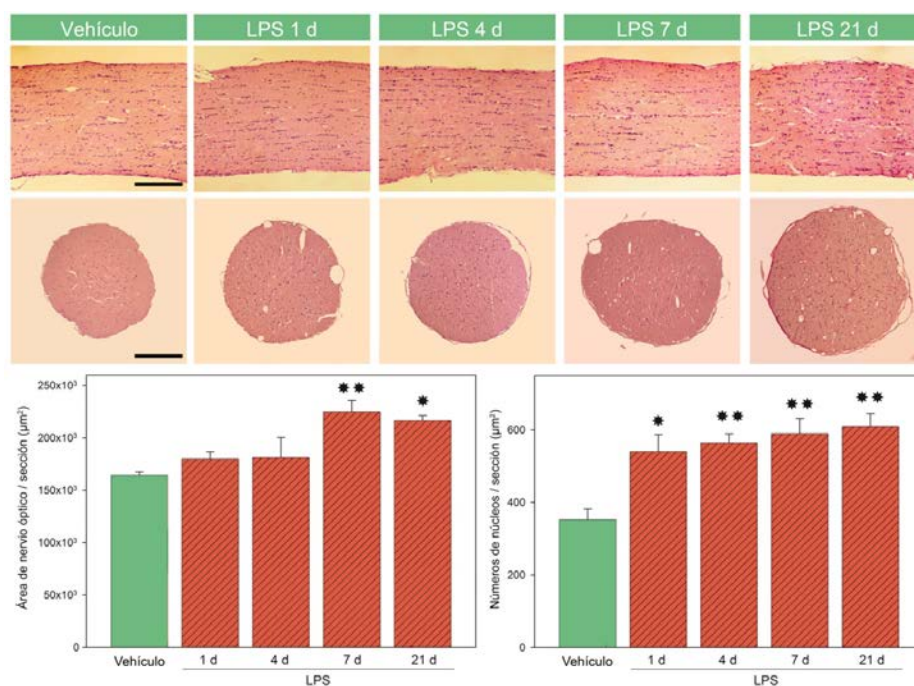


Figura 24. Efecto de la inyección de LPS sobre la estructura del NOP. Se muestran secciones representativas de cortes longitudinales (panel superior) y transversales (panel medio) de 5 NOPs/grupo a los 21 días post-inyección de vehículo y a los 1, 4, 7 y 21 días post-LPS (H&E). Se observó un aumento significativo en el número de núcleos en NOPs inyectados con LPS al día 1 que persistió hasta los 21 días post-inyección. Se observó un aumento en el área de las secciones transversales de NOPs a los 7 y 21 días post-LPS. Panel inferior: cuantificación del área transversal y del número de núcleos por sección. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOPs/grupo). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con vehículo, test de contrastes de Tukey. Barra = 200 μm .

1.2.2. Estudios inmunohistoquímicos. La reactividad de microglía/macrófagos se analizó a través de la inmunomarcación contra Iba-1 y ED1. Como se muestra en la Figura 25, en los NOPs inyectados con LPS, el área Iba-1(+) fue significativamente mayor a partir del día 1 post-inyección y permaneció aumentada hasta el día 21 respecto a los NOP inyectados con vehículo (Figura 25B). No se detectó inmunomarcación para ED1 en NOPs inyectados con vehículo o LPS al día 1 post-inyección, en tanto que a los 4 y 7 días post-LPS, se observó un aumento en este parámetro que fue menor a los 21 días (Figura 25). Además, se observó un aumento significativo en el área GFAP(+) a los 21 días post-inyección de LPS (Figura 25B). No se observaron diferencias en la inmunomarcación para Iba-1, ED1 y GFAP a diferentes intervalos después de la inyección de vehículo, que no difirió de NOPs intactos (datos no mostrados).

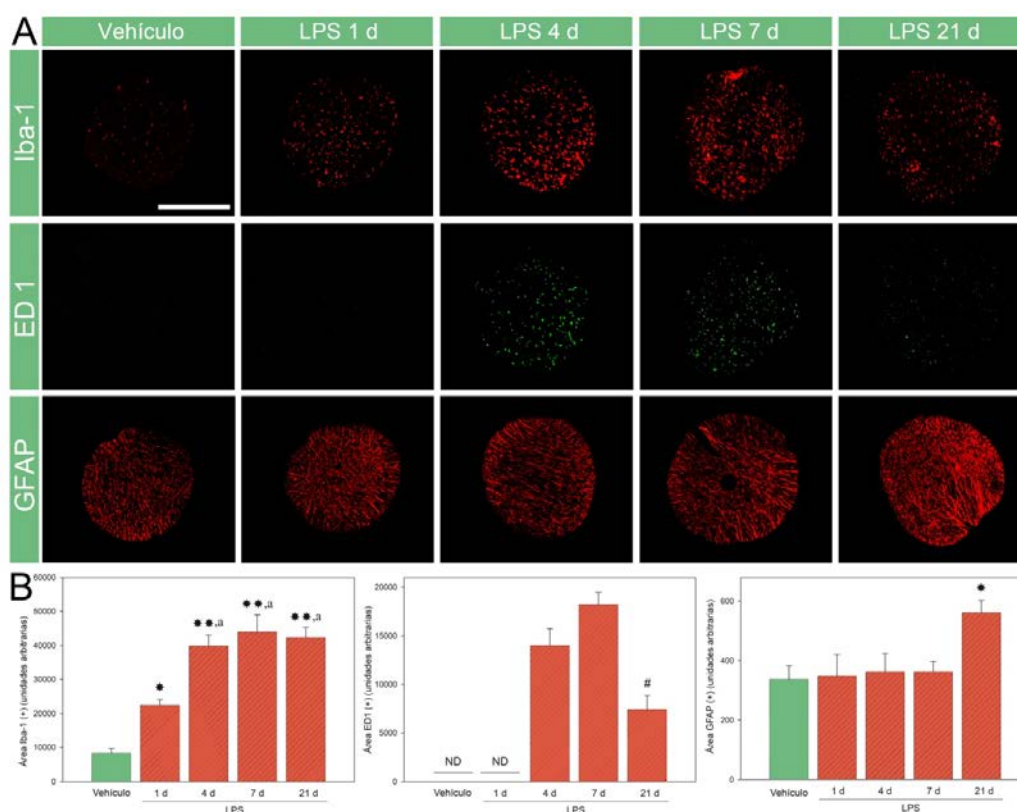


Figura 25. Análisis de microglía/macrófagos, células fagocíticas y astrocitos. Panel A: fotografías representativas de estudios inmunohistoquímicos contra las proteínas Iba-1 (panel superior), ED1 (panel medio) y GFAP (panel inferior) en secciones transversales de NOps inyectados con vehículo a los 21 días post-inyección y a los 1, 4, 7 y 21 días post-LPS. Panel B: análisis del área Iba-1(+), ED1(+) y GFAP(+). La inyección de LPS indujo un aumento significativo en el área Iba-1(+) al día 1 que fue aún mayor a los 4, 7 y 21 días post-inyección. No se detectó (ND) inmunorreactividad para ED1 en NOps inyectados con vehículo o LPS al día 1 post-inyección, en tanto que se observó un aumento significativo de este parámetro a los 4 y 7 días post-LPS, que fue menor en el día 21 post-LPS. Se observó un aumento significativo en la inmunorreactividad para GFAP a los 21 días post-inyección de LPS. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOps/grupo); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo, a: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS al 1 día post-inyección, #: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS a los 4 ó 7 días post-inyección, test de contrastes de Tukey. Barra = 200 μ m.

1.2.3. Densidad axonal y número de axones. Los axones del NOP se analizaron por tinción con Azul de Toluidina. En secciones transversales semifinas de la región proximal al sitio de inyección, el LPS indujo una disminución significativa de la densidad axonal a los 7 días (Figura 26), y una disminución en el número de axones a los 21 días, como se muestra en la Figura 26B.

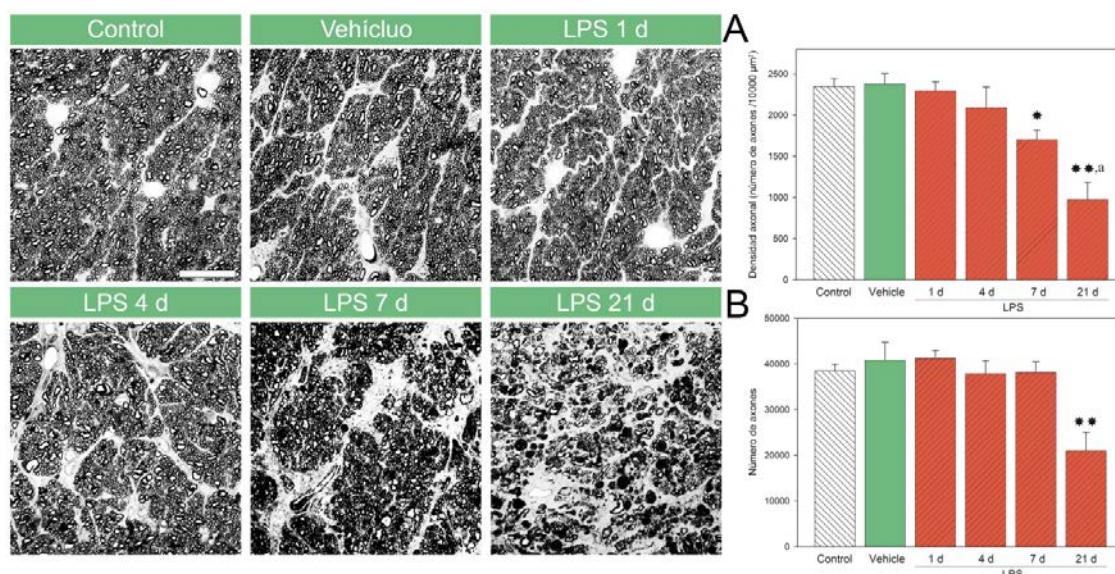


Figura 26. Efecto de la inyección de LPS sobre los axones en la porción proximal del NOP. Imágenes representativas de secciones transversales semifinas de NOPs de animales inyectados con vehículo a los 21 días post-inyección y a 1, 4, 7 y 21 días post-LPS, (tinción con Azul de Toluidina). Panel A: el LPS indujo una disminución en la densidad axonal a los 7 y a los 21 días post-inyección. Panel B: la inyección de LPS indujo una disminución significativa en el número total de axones a los 21 días post-inyección. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOPs/grupo); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con vehículo, a: $P < 0,05$ vs. NOPs inyectados con LPS a los 7 días post-inyección, test de contrastes de Tukey. Barra = 25 μ m.

En secciones transversales semifinas de la región distal al sitio de inyección de NOPs inyectados con LPS, se observó una disminución significativa de ambos parámetros a los 21 días post-inyección (Figura 27).

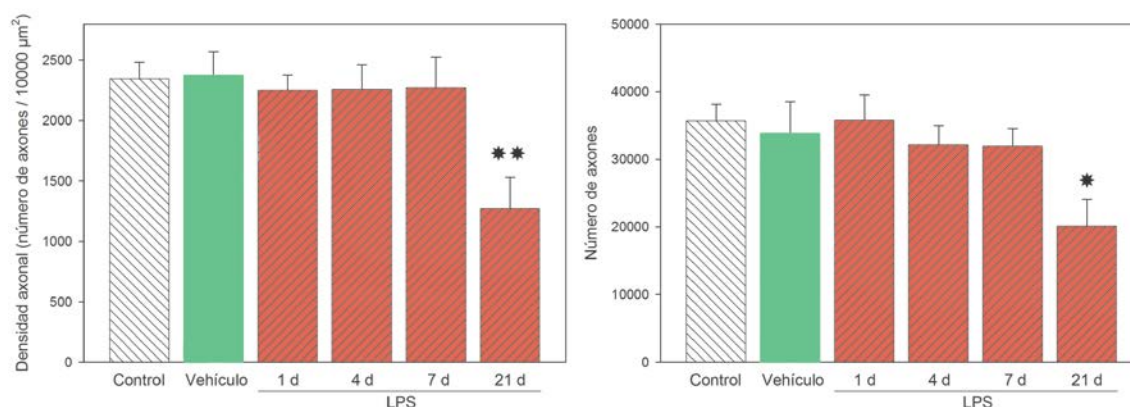


Figura 27. Efecto de la inyección de LPS sobre los axones en la porción distal del NOP. Panel izquierdo: el LPS indujo una disminución en la densidad axonal a los 21 días post-inyección. Panel derecho: la inyección de LPS indujo una disminución significativa en el número total de axones a los 21 días post-inyección. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOPs/grupo); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con vehículo, test de contrastes de Tukey.

Además, se realizó un histograma de frecuencias del número de axones en función del área axonal (agrupada en rangos) en la porción proximal al sitio de inyección (Figura 28).

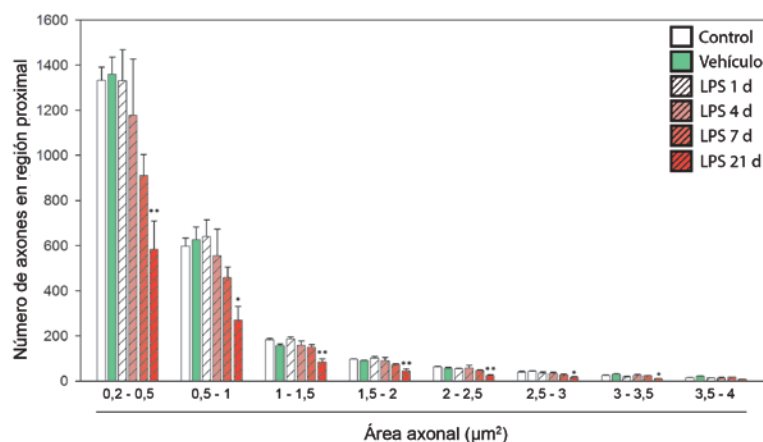


Figura 28. Efecto de la inyección de LPS sobre los axones en la porción proximal del NOp. Se muestra la distribución de frecuencia de axones agrupados en rangos de diámetro axonal de NOps intactos o inyectados con vehículo 21 días post-inyección y a 1, 4, 7 y 21 días post-LPS, (tinción con Azul de Toluidina). Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOps/grupo); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps intactos, test de contrastes de Tukey.

1.2.4. Mielinización. Se evidenciaron signos de desmielinización (tinción con *Luxol Fast Blue*) a los 21 (pero no a los 7) días post-LPS (Figura 29) y se observó una disminución en la inmunorreactividad para MBP a los 21 días post-inyección de LPS (Figura 30).

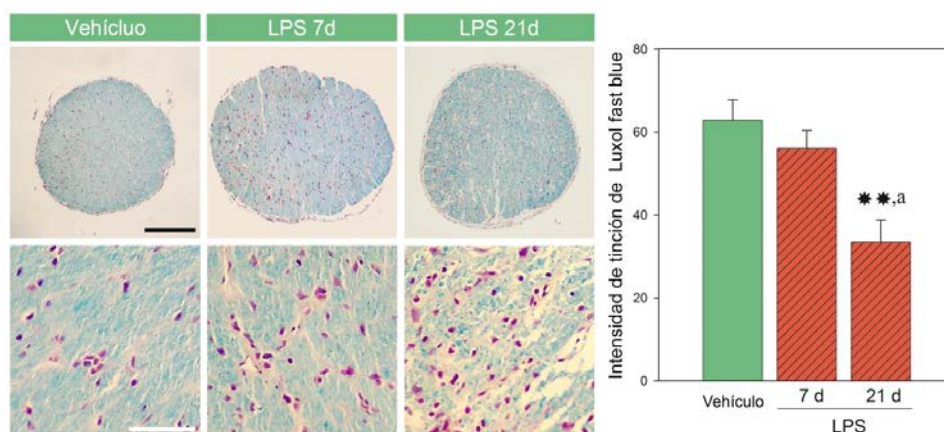


Figura 29. Efecto de la inyección de LPS sobre la mielinización del NOp. Imágenes representativas de secciones transversales de NOps a los 21 días post-inyección de vehículo y a los 7 y 21 días post-LPS (*Luxol Fast Blue*) (detalles en el panel inferior). Se observó una marca compacta en NOps inyectados con vehículo y 7 días post-LPS y una marca menor en NOps inyectados con LPS a los 21 días post-inyección. Panel B: cuantificación de la intensidad de marca. El LPS indujo una disminución de este parámetro a los 21 días post-inyección. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOps/grupo); ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo, a: $P < 0,05$ vs. NOps a los 7 días post- LPS, test de contrastes de Tukey. Barra negra = 200 μ m, barra blanca= 50 μ m.

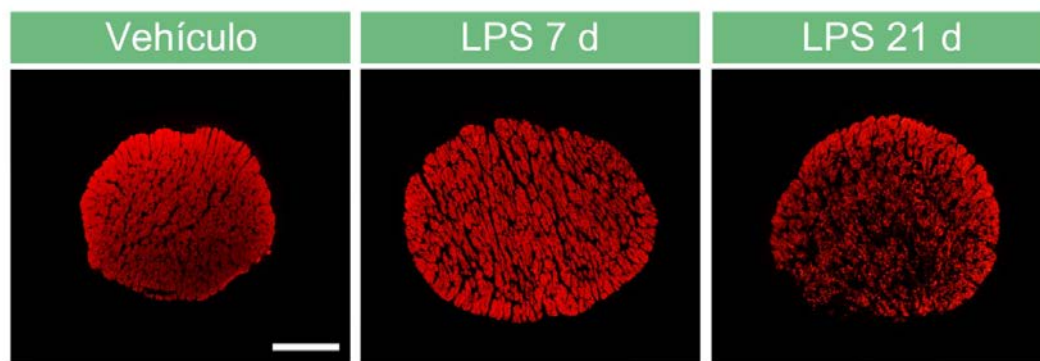


Figura 30. Efecto de la inyección de LPS sobre los niveles de MBP en secciones transversales de NOps a los 21 días post-inyección de vehículo y 7 y 21 días post-inyección de LPS. Se observó una marca compacta en NOps inyectados con vehículo ó 7 días post-inyección de LPS y una disminución en la inmunorreactividad para MBP en NOps inyectados con LPS a los 21 días post-inyección. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo. Barra = 200 μ m.

1.2.5. Estudio de la ultraestructura del NOp. Se analizó la ultraestructura en secciones transversales de NOps por microscopía electrónica de transmisión. Se observó desorganización de la mielina y la presencia frecuente de cuerpos membranosos lamelares a los 21 días post-inyección de LPS, mientras que a los 7 días, sólo ocasionalmente se observaron axones desmielinizados (Figura 31). No se observaron alteraciones ultraestructurales en el NOp inyectado con vehículo a lo largo del estudio, ni al día 1 ó 4 post-LPS (datos no mostrados).

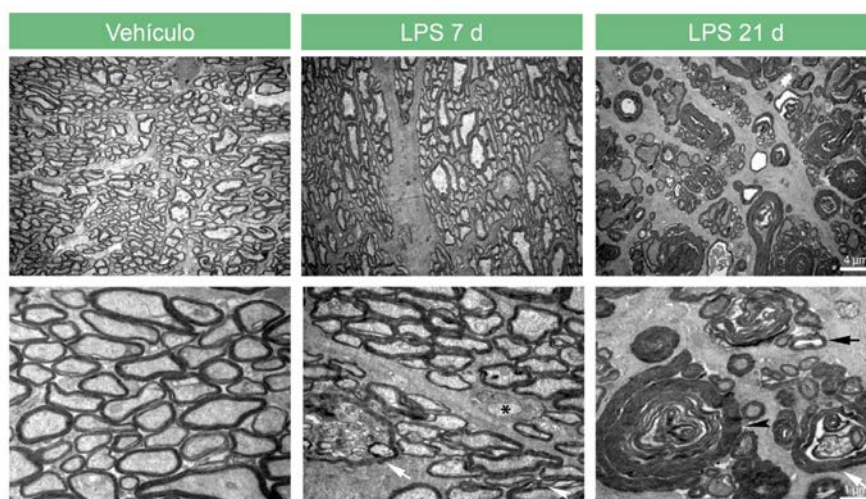


Figura 31. Efecto de la inyección de LPS sobre la ultraestructura del NOp. Imágenes representativas de secciones transversales semifinas de NOps a los 21 días post-vehículo o a los 7 y 21 días post-LPS. A los 7 días post-LPS, se observó la presencia de algunos axones degenerados (flecha blanca), axones amielínicos (asterisco) y zonas de mielina desempaquetada (cabeza de flecha blanca). A los 21 días post-LPS se observó la presencia

de cuerpos lamelares (flecha negra), cuerpos lamelares sin contenido axonal (cabeza de flecha negra) y axones degenerados. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo.

1.3. Estudios de la retina

1.3.1. Electrorretinogramas. A continuación, se evaluó el efecto de la inyección de LPS en el NOp sobre la función retiniana. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la amplitud y la latencia promedio de las ondas a y b del ERG escotópico hasta el día 21 después de la inyección de vehículo o LPS (Figura 32).

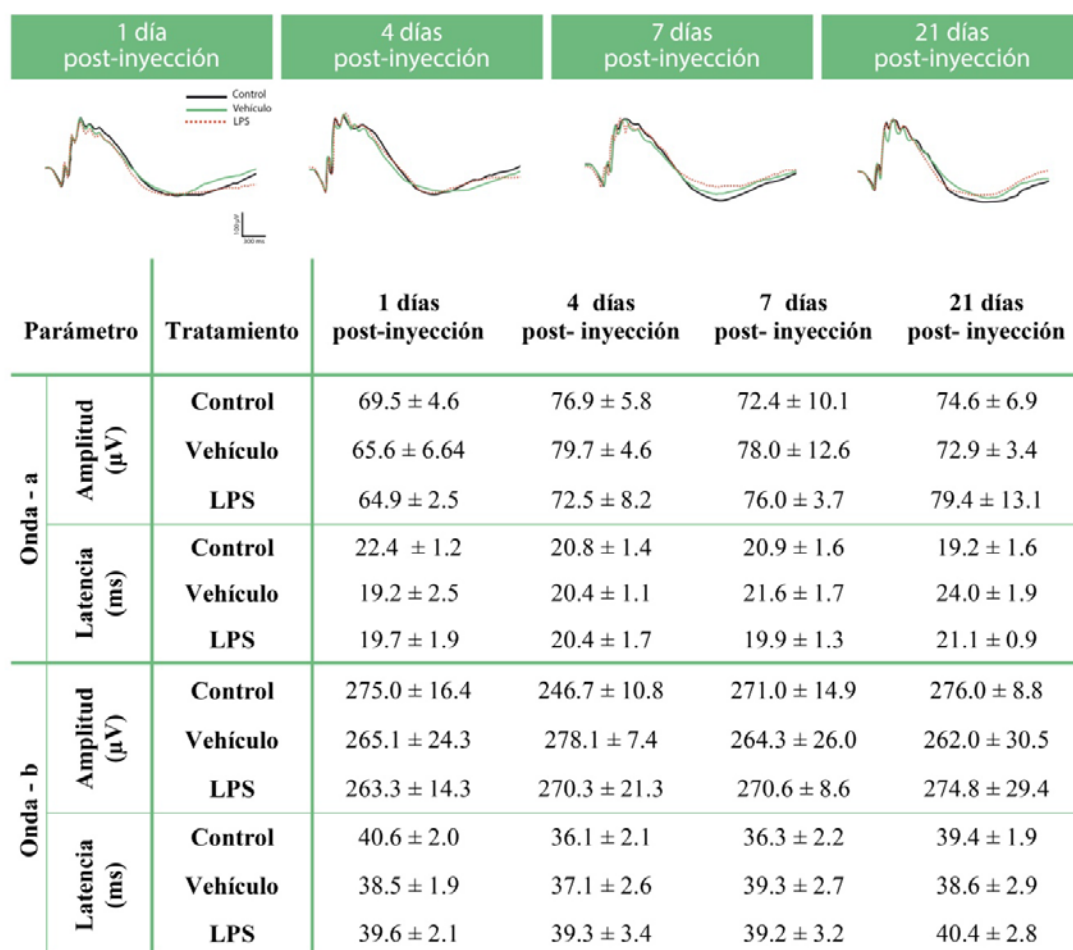


Figura 32. Electrorretinogramas escotópicos al día 1, 4, 7 y 21 post-inyección de vehículo o LPS. Panel superior: trazados representativos. Panel inferior: amplitud y latencia de la onda a y la onda b del ERG. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, en ninguno de los tiempos y parámetros estudiados. Los datos se muestran como la media ± SEM (n = 5 ojos/grupo).

1.3.2. Estudio morfométrico. Se realizó un análisis morfométrico en secciones transversales de retina obtenidas a los 21 días post-inyección, por tinción con H&E (Figura 33). No se

observaron diferencias entre los grupos experimentales tanto en el espesor total de retina, como en el de cada una de las capas (CPI, CNI, CPE, CNE y SE).

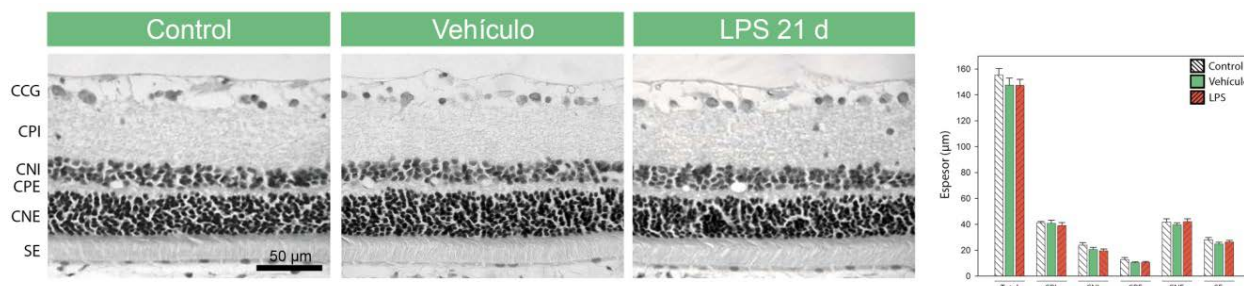


Figura 33. Efecto de la inyección de LPS en el NOP sobre la estructura de la retina. Panel izquierdo: imágenes representativas de cortes transversales de retina de ojos cuyos NOps permanecieron intactos o fueron inyectados con vehículo o LPS, a los 21 días post-inyección (tinción con H&E). No se observaron alteraciones en la morfología retiniana. Panel derecho: cuantificación del espesor total y de cada uno de las capas retinianas en los grupos control, vehículo o LPS. No se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. CPI: capa plexiforme interna, CNI: capa nuclear interna, CPE: capa plexiforme externa, CNE: capa nuclear externa y SE: segmentos externos de los fotorreceptores. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ retinas/grupo).

1.3.3. Estudios inmunohistoquímicos en la retina. Se realizó un estudio inmunohistoquímico contra las proteínas Iba-1, GFAP y Brn3a en secciones transversales de retinas cuyos NOps permanecieron intactos o fueron inyectados con vehículo o LPS en el día 1, 4, 7, 14 y 21 post-inyección (Figura 34). Se observó un aumento en la inmunomarcación para Iba-1 a los 4 días, que persistió hasta los 21 días post- LPS en comparación con retinas control (Figura 34). A los 21 días post-LPS se observó una disminución significativa en el número de CGR Brn3a(+), así como un aumento en la inmunorreactividad para GFAP en la capa de fibras y en los procesos de células de Müller (Figura 34).

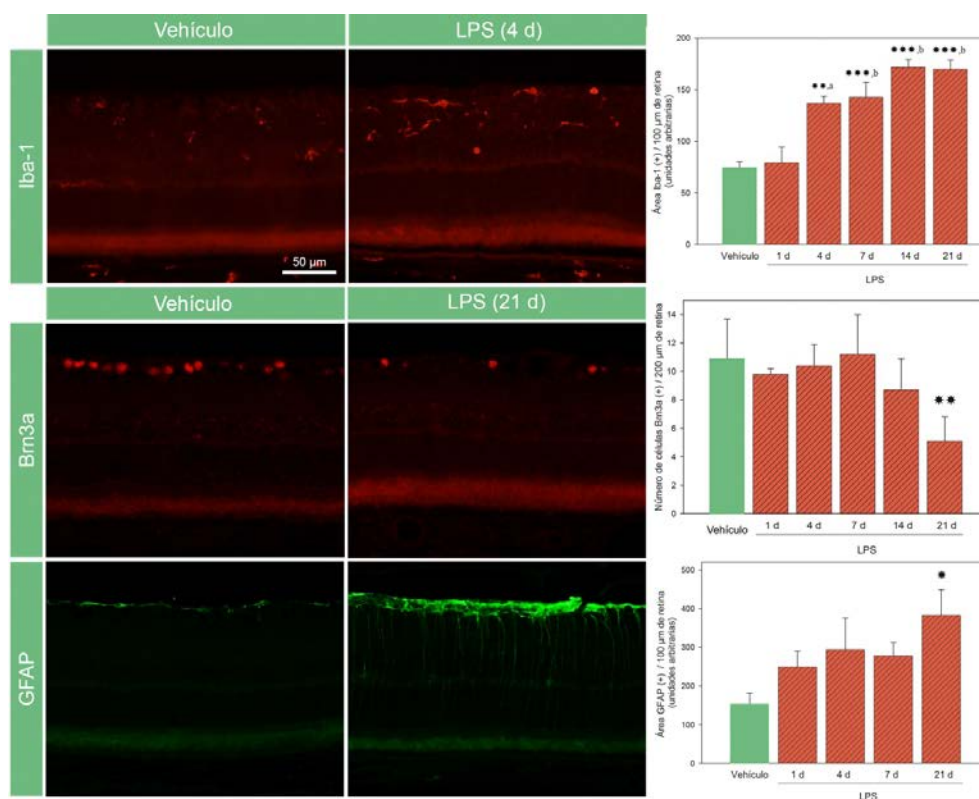


Figura 34. Análisis de microglía/macrófagos, células ganglionares retinianas, astrocitos y procesos de células de Müller en secciones transversales de retina. Se observó un aumento en la inmunomarcación para Iba-1 a los 4 días que persistió hasta los 21 días post-LPS en comparación con retinas control. A los 21 días post-LPS se observó una disminución significativa en el número de CGR Brn3a(+), así como un aumento en la inmunorreactividad para GFAP en la capa de fibras y en los procesos de células de Müller. Los datos se expresan como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ retinas/grupo); * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con vehículo, a: $P < 0,05$; b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS al día 1 post-inyección, test de contrastes de Tukey.

1.3.4. Cuantificación del número de células ganglionares retinianas en montaje plano.

Para analizar específicamente el efecto de la inyección de LPS en el NOp sobre el número de CGRs, se analizó la inmunomarcación para Brn3a (un marcador específico de este tipo celular) en retinas en montaje plano (Figura 35). Se observó una disminución significativa en el número de CGR Brn3a(+) a los 21 días post-inyección de LPS, como se muestra en la Figura 35. No se observaron cambios en este parámetro en los días 1, 4 y 7 post-LPS (datos no mostrados).

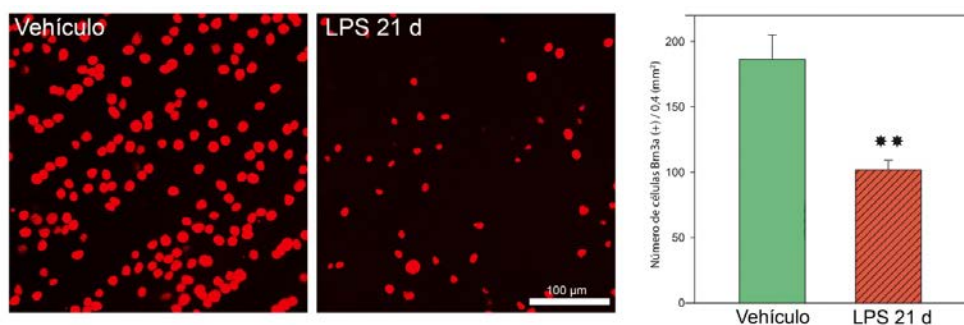


Figura 35. Efecto de la inyección de LPS en el NOp sobre el número de CGRs. Panel izquierdo: imágenes representativas de la inmunorreactividad para Brn3a en retinas en montaje plano a los 21 días post-inyección de vehículo o LPS. Panel derecho: cuantificación de células Brn3a(+). Se observó una disminución significativa en el número de células Brn3a(+) en retinas cuyos NOps fueron inyectadas con LPS. Los datos se muestran como la media $\pm$ SEM ($n = 5$ retinas/grupo); *** $P < 0,01$ vs. retinas cuyos NOps fueron inyectados con vehículo, test de Student.

En conjunto, los resultados presentados hasta aquí indican que la inyección de LPS en el NOp reproduce aspectos centrales de la NO primaria humana. Por lo tanto, este modelo experimental podría ser una herramienta potencialmente útil para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, lo que constituyó el siguiente objetivo de este trabajo de tesis doctoral.

2. Efecto de la melatonina

Como se detallará a continuación, se evaluó el efecto del tratamiento con melatonina sobre el daño de la vía visual inducido por NOE primaria.

2.1. Estudios funcionales

2.1.1. Potenciales Visuales Evocados. En la Figura 36 se muestra la amplitud de los VEPs en animales sometidos a un tratamiento simulado o implantados con un *pellet* de melatonina, en los que un NOp se inyectó con vehículo y el NOp contralateral se inyectó con LPS un día después de la implantación del *pellet*. La melatonina previno significativamente la disminución en la amplitud de los VEPs inducida por LPS a los 21 días post-inyección. Se muestran también en la Figura 36 registros de VEPs representativos de todos los grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en la amplitud de los VEPs en los

NOps inyectados con vehículo, en presencia o ausencia de melatonina, ni en las latencias de los componentes P1, N1 y P2 de los VEPs entre todos los grupos experimentales (datos no mostrados).

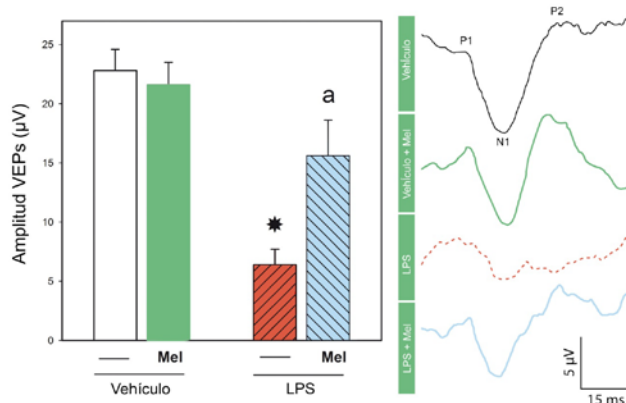


Figura 36. Efecto de la melatonina sobre los VEPs. Panel izquierdo: promedio de las amplitudes del componente N1-P2. Los NOps se inyectaron con vehículo o LPS en presencia o ausencia de melatonina y los VEPs se registraron a los 21 días post-inyección. La melatonina previno significativamente la disminución en la amplitud del componente N1-P2 inducida por NOE. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM ($n = 8$ NOps/grupo). * $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, $a: P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey. Panel derecho: trazados representativos de VEPs.

2.1.2. Reflejo pupilar consensual. A continuación, se examinó el efecto de la melatonina sobre la alteración del RP inducida por NOE. La melatonina, que careció de efecto en NOps inyectados con vehículo, previno el efecto de LPS sobre este parámetro (Figura 37).

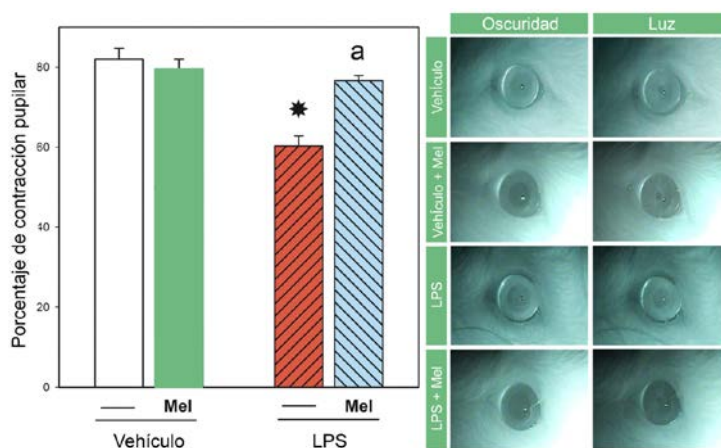


Figura 37. Efecto de la melatonina (Mel) sobre el RP. Panel izquierdo: se muestra el promedio de la contracción pupilar en animales cuyos NOps fueron inyectados con vehículo o LPS, en ausencia o presencia de melatonina. La melatonina que careció de efecto *per se*, previno el efecto del LPS sobre este parámetro. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM ($n = 8$ ojos/grupo). * $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, $a: P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey. Panel derecho: imágenes representativas de la contracción pupilar inducida por luz.

2.1.3. Transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica. La melatonina, que no afectó el transporte anterógrado retiniano en el grupo tratado con vehículo, previno la reducción en la tinción para CTB en toda la proyección retinotópica del CS contralateral a NOps inyectados con LPS (Figura 38).

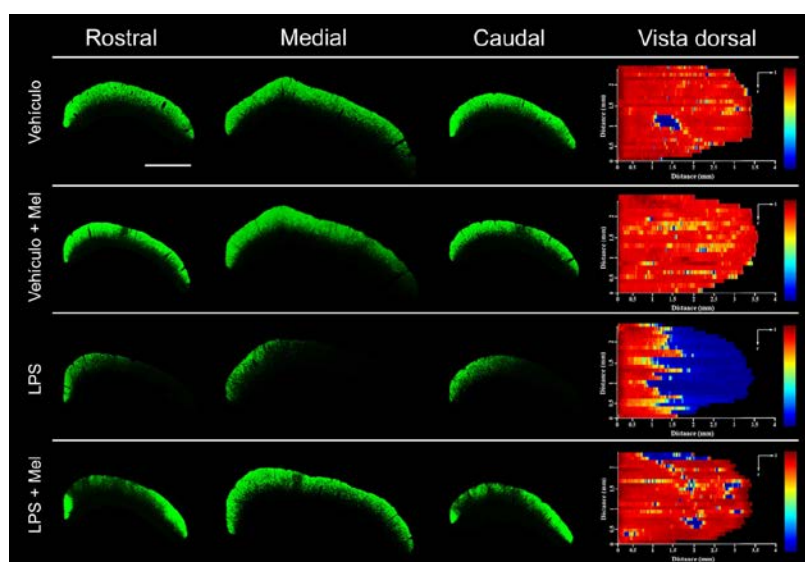


Figura 38. Efecto de la melatonina sobre el transporte anterógrado. Panel izquierdo: imágenes representativas del patrón de marca de CTB en las capas retino-receptivas del CS. Se muestran tres secciones representativas de cada región del CS (rostral, medial y caudal) de todos los grupos experimentales. La melatonina preservó el transporte anterógrado en NOps inyectados con LPS. Se muestran imágenes representativas de 5 animales/grupo. Barra = 500 μ m. Panel derecho: vista dorsal de la reconstrucción de un mapa térmico (de azul a rojo, de menor a mayor marca de CTB, respectivamente) en el CS.

2.2. Estudios histológicos de NOP

2.2.1. Estudios inmunohistoquímicos. Se analizó la inmunorreactividad para Iba-1, ED1 y GFAP en secciones transversales de NOps. La melatonina no afectó el aumento en el área de Iba-1(+), pero evitó significativamente el aumento en la inmunorreactividad para ED1 inducido por LPS (Figura 39). Asimismo, la melatonina previno el aumento en el área GFAP(+) inducido por LPS, que alcanzó valores similares a los observados en NOps inyectados con vehículo (Figura 39). La melatonina no afectó la inmunorreactividad para Iba-1, ED1 y GFAP en NOps inyectados con vehículo.

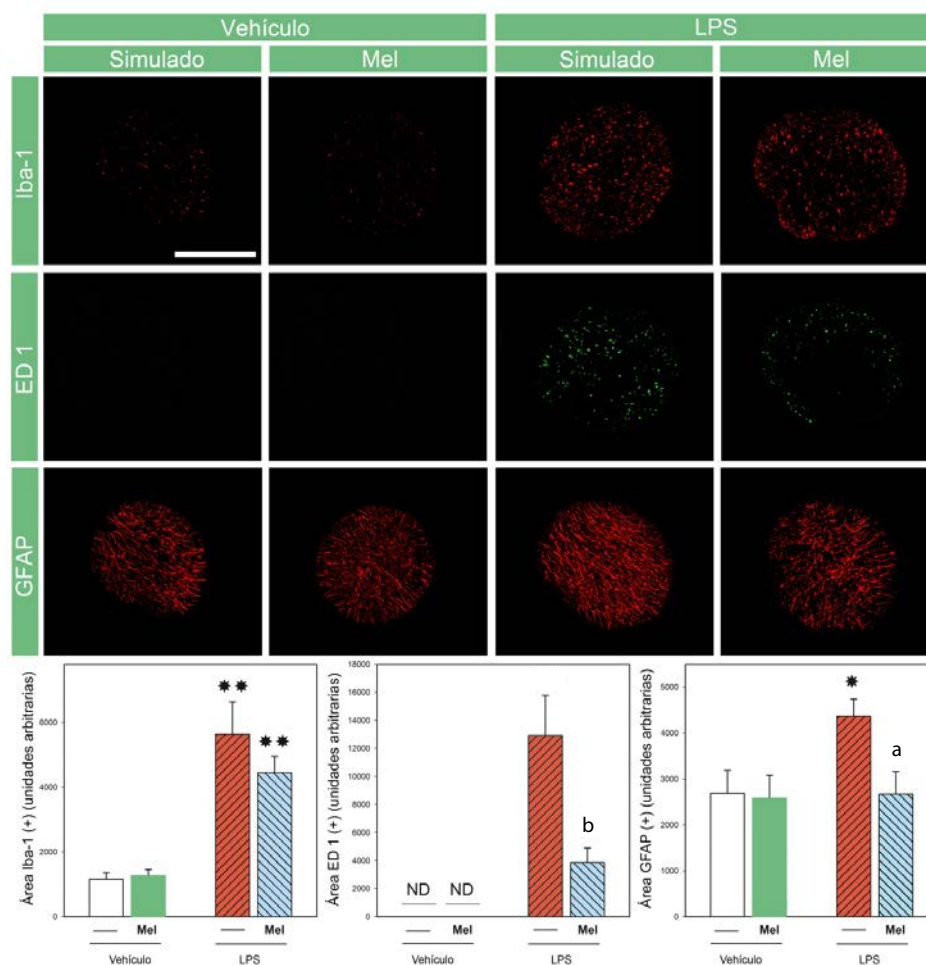


Figura 39. Efecto de la melatonina sobre la microglía/macrófagos, células fagocíticas y astrocitos. Panel superior: fotografías representativas de estudios inmunohistoquímicos contra las proteínas Iba-1 (panel superior), ED1 (panel medio) y GFAP (panel inferior) en secciones transversales de NOps inyectados con vehículo o LPS en presencia o ausencia de melatonina, a los 21 días post-inyección. Barra = 200 μ m. Panel inferior: análisis del área Iba-1(+), ED1(+) y GFAP(+). La melatonina que no tuvo efecto *per se* sobre ninguno de estos parámetros, previno significativamente el aumento del área ED1(+) y GFAP(+) inducido por NOE. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM (n = 5 NOps/grupo). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, a: $P < 0,05$; b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS, en ausencia de melatonina, test de Tukey.

2.2.2. Número de axones. La disminución en el número de axones a los 21 días post-LPS no fue evidente en los animales tratados con melatonina (Figura 40).

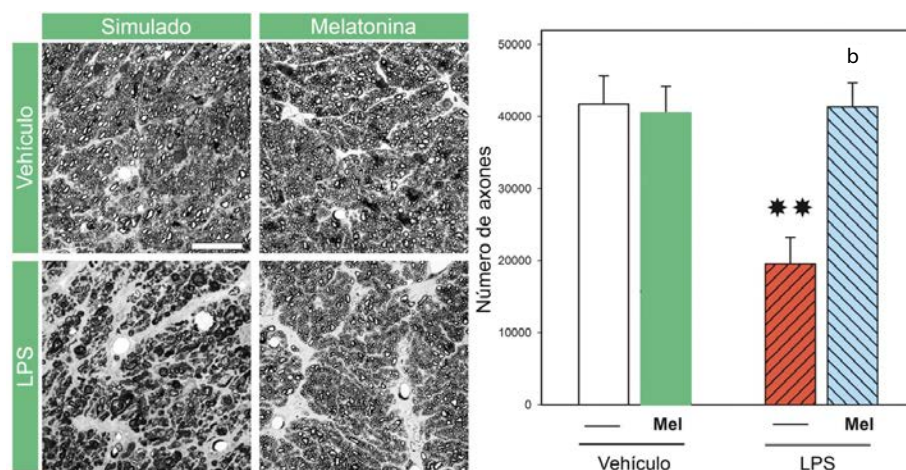


Figura 40. Efecto de la melatonina sobre el número de axones del NOP. Panel izquierdo: imágenes representativas de secciones transversales semifinas de NOPs inyectados con vehículo o LPS en presencia o ausencia de melatonina a los 21 días post-inyección. La disminución en el número de axones (tinción con Azul de Toluidina) en NOPs inyectados con LPS no fue evidente en animales tratados con melatonina. Barra = 25 μ m. Panel derecho: La melatonina previno el efecto del LPS sobre el número de axones. Se muestran los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOPs/grupo) $^{**}P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, $b: P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey.

2.2.3. Mielinización. La melatonina redujo la aparición de signos de desmielinización en NOPs inyectados con LPS (Figura 41).

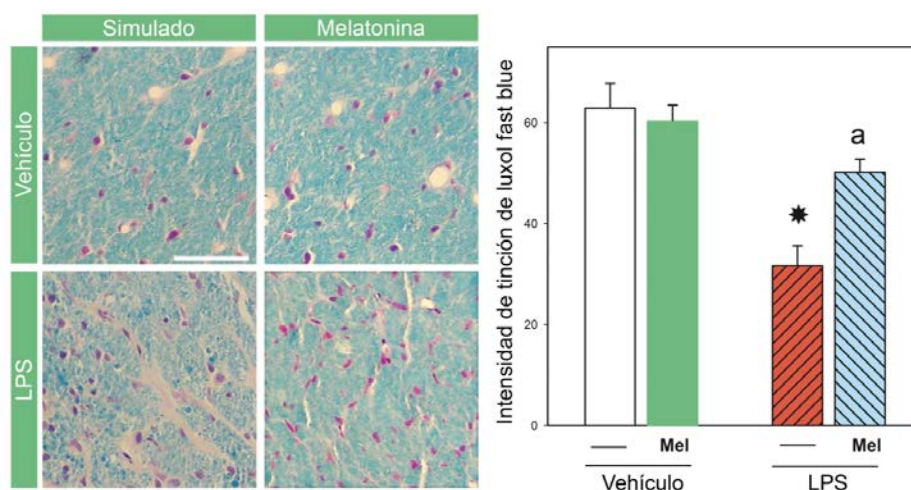


Figura 41. Efecto de la melatonina sobre la mielinización del NOP. Panel izquierdo: imágenes representativas de secciones transversales de NOPs inyectados con vehículo o LPS, en ausencia o presencia de melatonina a los 21 días post-inyección (tinción con *Luxol Fast Blue*). Se observó una menor marca de *Luxol Fast Blue* en NOPs inyectados con LPS en ausencia de melatonina, que no fue evidente en los NOPs inyectados con LPS en animales tratados con melatonina. Barra = 50 μ m. Panel derecho: evaluación de la mielinización de los NOPs a través de la cuantificación de la intensidad de marca de *Luxol Fast Blue*. Panel derecho: se muestran los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOPs/grupo). $^{*}P < 0,05$ vs. NOPs inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, $a: P < 0,05$ vs. NOPs inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey.

2.3. Estudios histológicos de la retina.

El análisis morfométrico de secciones transversales de retinas (tinción con H&E) a los 21 días post-inyección de vehículo o LPS en ausencia o presencia de melatonina, no reveló diferencias en el espesor total de la retina, ni de las CPI, CNI, CPE, CNE y SE entre los grupos experimentales (Figura 42). En cambio, el tratamiento con melatonina redujo significativamente la disminución en el número de CGR Brn3a (+) observada a los 21 días post-inyección de LPS (Figura 43).

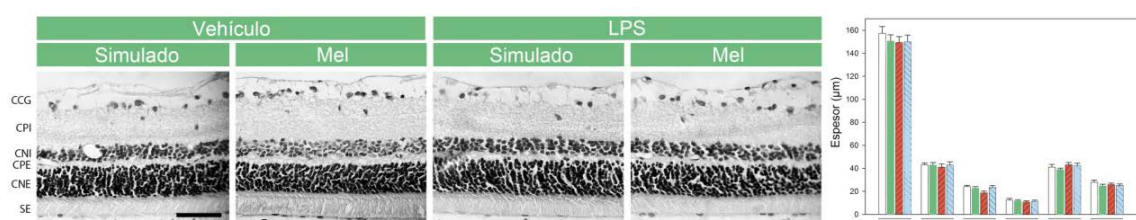


Figura 42. Efecto de la inyección de LPS y la melatonina sobre la estructura de la retina. Panel izquierdo: imágenes representativas de cortes transversales de retina de ojos cuyos NOps fueron inyectados con vehículo o LPS en presencia o ausencia de melatonina (H&E). No se observaron alteraciones en la morfología retiniana. Panel derecho: cuantificación del espesor total y de cada uno de las capas retinianas en los grupos inyectados con vehículo o LPS en ausencia o presencia de melatonina. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros estudiados. Se muestran los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ retinas/grupo). Barra = 50 μm .

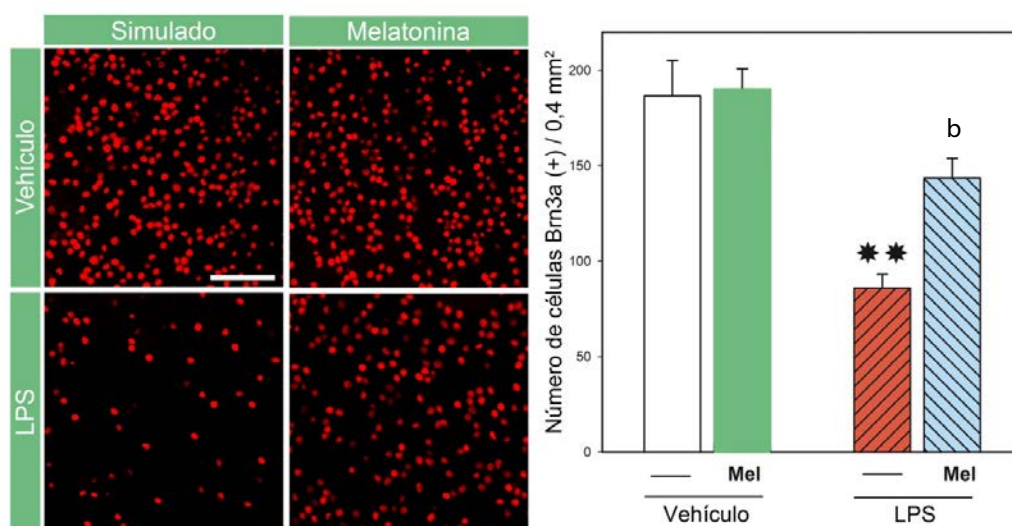


Figura 43. Efecto de la melatonina sobre el número de CGRs. Panel izquierdo: imágenes representativas de la inmunorreactividad para Brn3a en retinas en montaje plano. Panel derecho: cuantificación del número de células Brn3a(+). La melatonina previno significativamente la disminución en el número de CGR Brn3a(+) inducida por NOE. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ retinas/grupo) $**P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey. Barra = 100 μm .

2.4. Estudio del mecanismo de acción de la melatonina en la protección de la vía visual frente a NOE

Con el fin de identificar los mecanismos involucrados en el efecto protector de la melatonina, se analizaron los niveles proteicos de NOS-2, COX-2 (Figura 44) y TNF- α (Figura 45), así como la peroxidación lipídica (Figura 46) en NOps inyectados con vehículo o LPS en ausencia o presencia de melatonina al día 1 post-inyección. La melatonina previno significativamente el aumento en todos estos parámetros inducidos por la inyección de LPS.

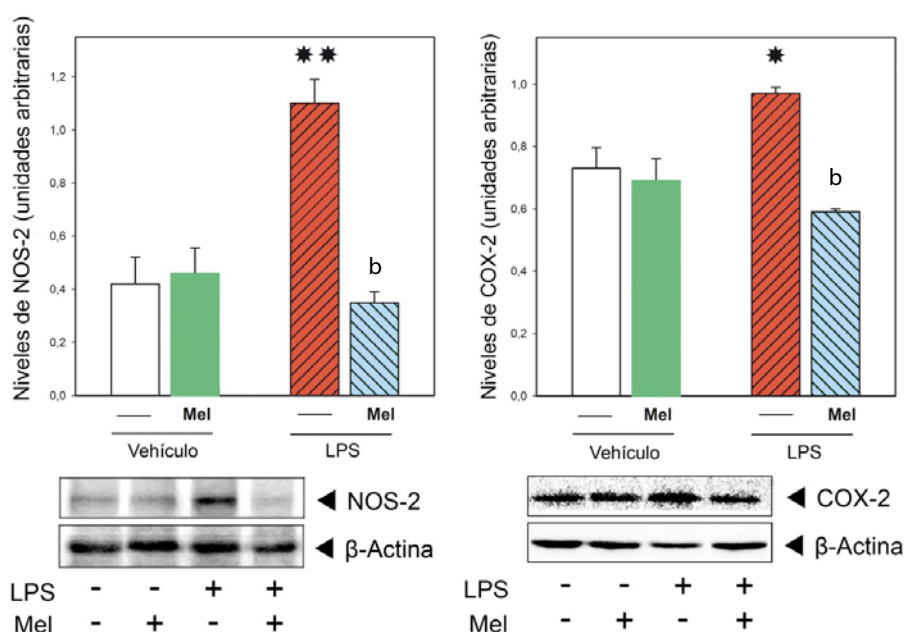


Figura 44. Efecto de la melatonina sobre los niveles proteicos de NOS-2 y COX-2. Panel superior: cuantificación por *Western blot* de los niveles proteicos de NOS-2 (izquierda) y COX-2 (derecha) relativizados a los niveles de β -actina en homogenatos de NOps obtenidos en el día 1 post-inyección de vehículo o LPS en ausencia o presencia de melatonina. La inyección de LPS indujo un aumento significativo de ambos parámetros, en tanto que la melatonina previno el efecto del LPS. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOps/grupo) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey. Panel inferior: *Western blots* representativos para la determinación de los niveles de NOS-2 y COX-2 (izquierda y derecha, respectivamente).

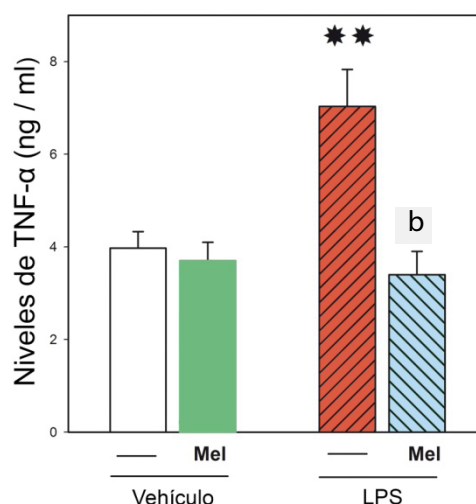


Figura 45. Efecto de la melatonina sobre los niveles de TNF- α . Cuantificación de los niveles proteicos de TNF- α (ELISA) en homogenatos de NOps al día 1 post-inyección de vehículo o LPS en ausencia o presencia de melatonina. La inyección de LPS indujo un aumento significativo de los niveles de TNF- α , que no fue observado en animales tratados con melatonina. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n = 5 NOps/grupo) *** P < 0,01 vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, b: P < 0,01 vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey.

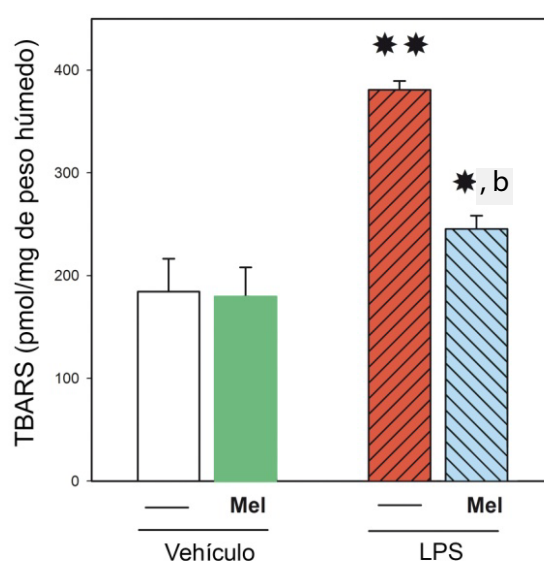


Figura 46. Efecto de la inyección de LPS y la melatonina sobre la peroxidación lipídica. Cuantificación de los niveles de TBARS en homogenatos de NOps obtenidos en el día 1 post-inyección de vehículo o LPS, en ausencia o presencia de melatonina. La inyección de LPS indujo un aumento significativo en los niveles de TBARS que fue significativamente menor en animales tratados con melatonina. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n = 5 NOps/grupo) * P < 0,05; ** P < 0,01 vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, b: P < 0,01 vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey.

2.5. Post-tratamiento con melatonina

Los resultados presentados indican que el tratamiento con melatonina iniciado 1 día antes de la inyección de LPS previno significativamente las alteraciones funcionales e histológicas inducidas por NOE experimental. Con el objeto de analizar el efecto terapéutico de la melatonina sobre la disfunción visual, se implantó un *pellet* de melatonina 4 ó 7 días después de la inyección de vehículo o LPS, y se analizaron los VEPs y el RP a los 21 días post-inyección. Como se muestra en la Figura 47, cuando el *pellet* se implantó a los 4 días post-inyección de LPS, la melatonina evitó las alteraciones de ambos parámetros inducidas por NOE. En cambio, cuando el tratamiento con melatonina se inició a los 7 días post-LPS, no se observó preservación del RP (Figura 48).

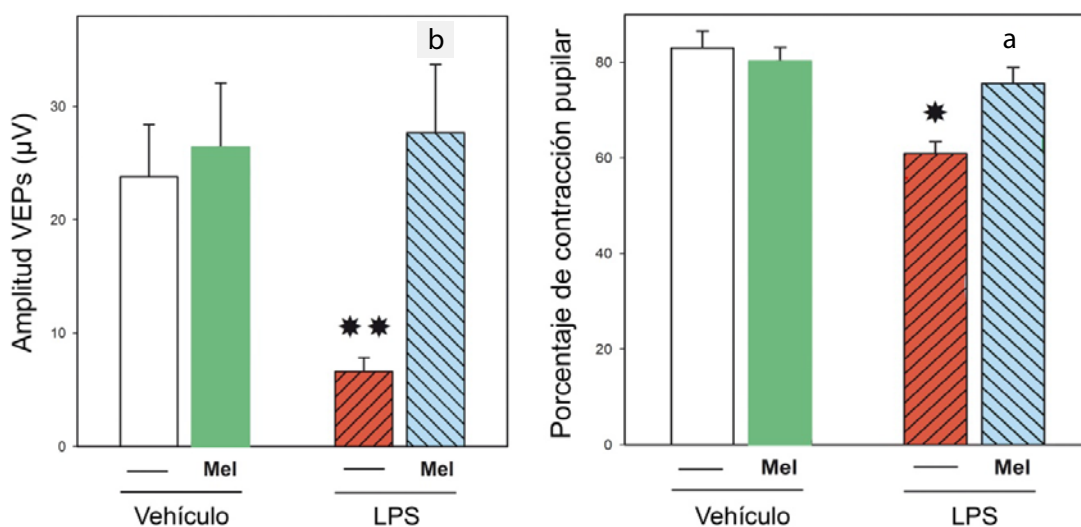


Figura 47. Efecto del post-tratamiento con melatonina iniciado a los 4 días post-inyección de vehículo o LPS, sobre la disfunción visual inducida por NOE. Panel izquierdo: amplitud promedio del componente N1-P2 de los VEPs. El post-tratamiento con melatonina revirtió la disminución de este parámetro inducida por NOE. Panel derecho: el tratamiento con melatonina revirtió el efecto del LPS sobre el RP. Se muestran los datos como media $\pm$ SEM ($n = 8$ ojos/grupo) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, a: $P < 0,05$; b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de melatonina, test de Tukey.

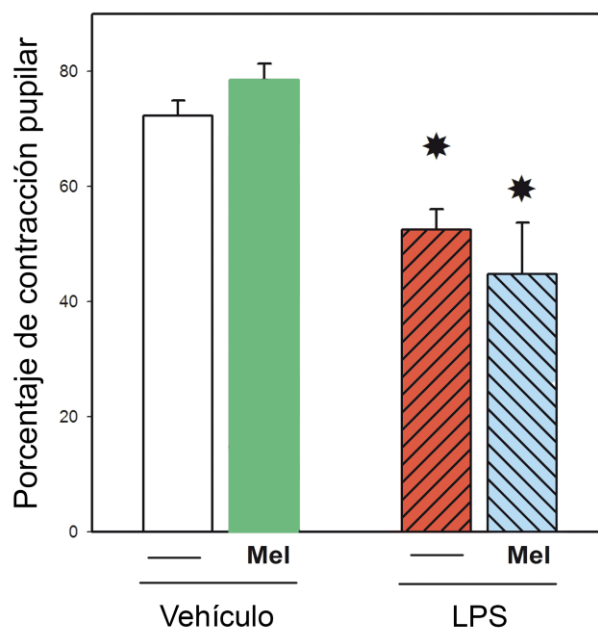


Figura 48. Efecto del post-tratamiento con melatonina comenzado 7 días después de la inyección de LPS. La melatonina no preservó el RP a los 21 días post-inyección de LPS. Se muestran los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ ojos/grupo) * $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de melatonina, test de Tukey.

3. Efecto de la exposición a ambiente enriquecido

El siguiente objetivo de esta tesis doctoral fue analizar el efecto de la exposición a ambiente enriquecido (AE), como estrategia terapéutica para la NOE. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

3.1. Estudios funcionales

3.1.1. Potenciales Visuales Evocados. En animales albergados en AS, la inyección de LPS en el NOp indujo una disminución significativa en la amplitud de los VEPs, que no se observó en animales expuestos a AE. También se muestran en la Figura 49 registros representativos de VEPs para todos los grupos experimentales. No se observaron diferencias significativas en las amplitudes de los VEPs entre los NOps inyectados con vehículo de animales alojados en AS o AE. No se observaron diferencias en las latencias P1, N1 y P2 entre los grupos (datos no mostrados).

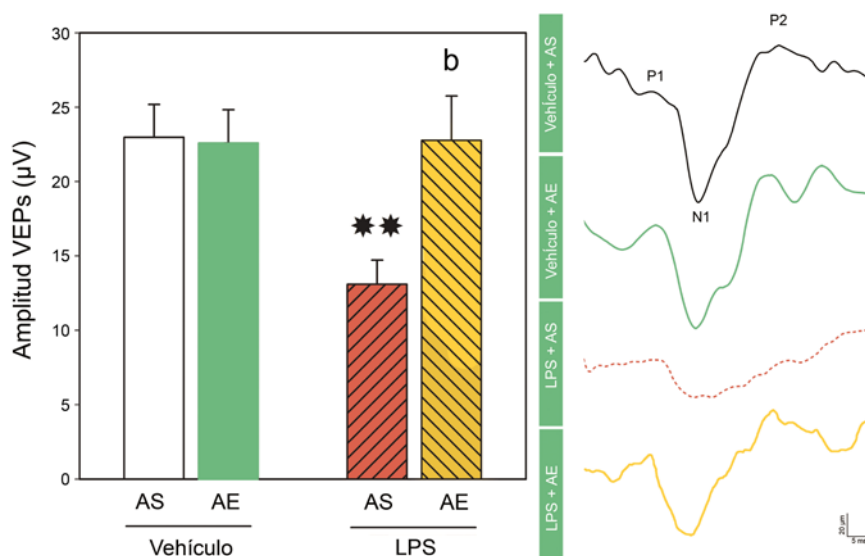


Figura 49. Efecto de la exposición a AE sobre los VEPs. Panel izquierdo: promedio de las amplitudes de los VEPs registrados a los 21 días post-inyección. La exposición a AE previno significativamente la disminución en la amplitud del componente P1-N1. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM ($n = 12$ NOps/grupo). $^{***}P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey. Panel derecho: trazados representativos de VEPs.

3.1.2. Reflejo pupilar consensual. La exposición a AE previno completamente el efecto del LPS sobre la contracción pupilar inducida por luz (Figura 50). Dado que el bloqueo de la rueda de ejercicio voluntario no modificó el efecto protector del AE sobre el RP y los VEPs (datos no mostrados), en los siguientes experimentos se bloquearon las ruedas.

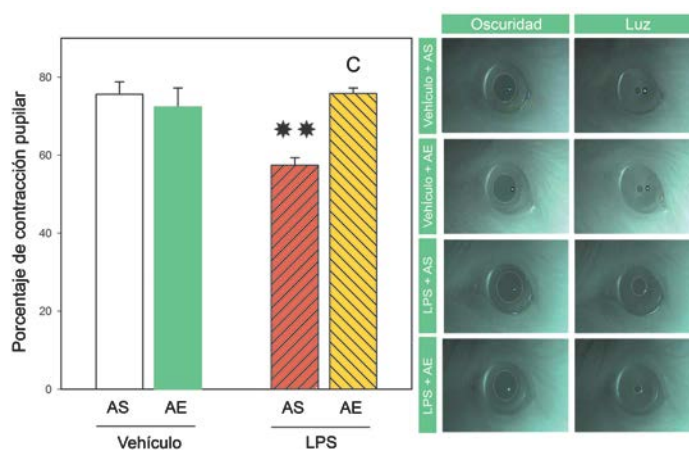


Figura 50. Efecto de la exposición a AE sobre el RP. Panel izquierdo: el promedio de la contracción pupilar fue significativamente menor en animales albergados en AS cuyos NOps fueron inyectados con LPS en comparación a animales que fueron inyectados con vehículo, en tanto que el AE previno la disminución de este parámetro. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM ($n = 12$ ojos/grupo). $^{***}P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, c: $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey. Panel derecho: Imágenes representativas de la contracción pupilar inducida por luz en todos los grupos experimentales.

3.1.3. Transporte anterógrado de la subunidad β de la toxina colérica. En animales alojados en AS, la NOE indujo una reducción en la marca de CTB en el CS contralateral, en tanto que la exposición a AE previno el déficit en el transporte anterógrado inducido por el LPS (Figura 51). El AE no afectó este parámetro en NOps tratados con vehículo.

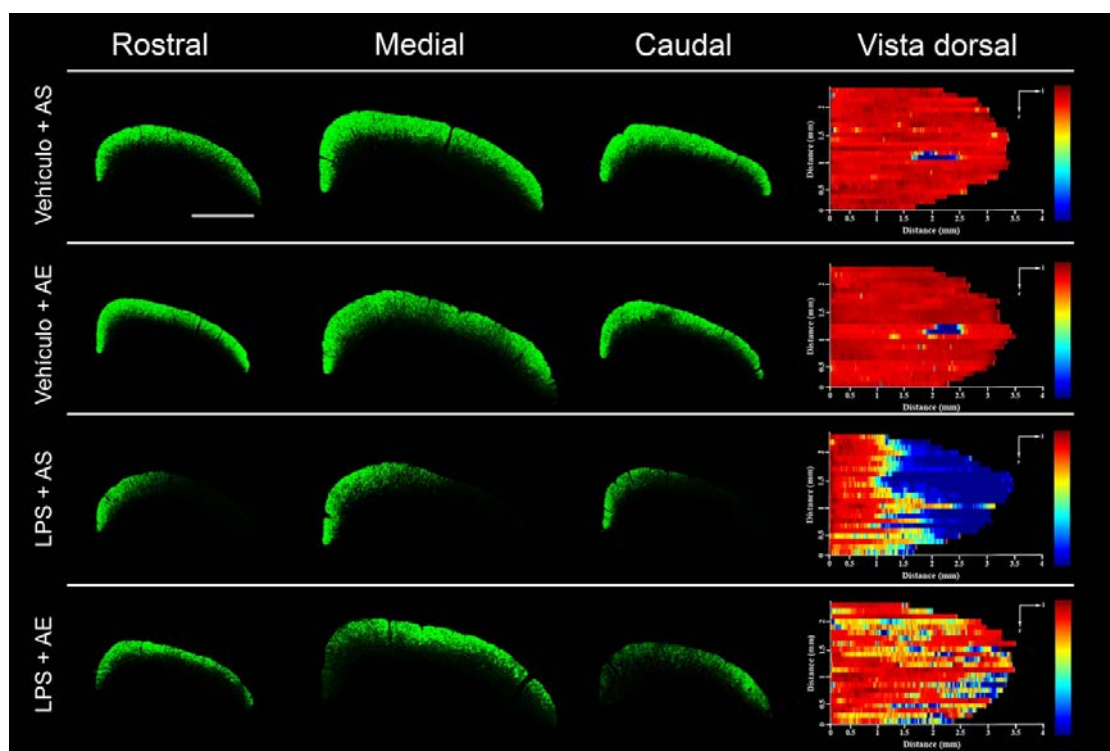


Figura 51. Efecto de la exposición a AE sobre el transporte anterógrado al CS. Panel izquierdo: imágenes representativas del patrón de marca de CTB en las capas retino-receptivas del CS. Se muestran tres secciones representativas de cada región del CS (rostral, medial y caudal) de todos los grupos experimentales. La exposición a AE preservó el transporte anterógrado en NOps inyectados con LPS. Se muestran imágenes representativas de 6 animales/grupo. Barra = 500 μ m. Panel derecho: vista dorsal de la reconstrucción de un mapa térmico (de azul a rojo, de menor a mayor marca de CTB, respectivamente).

3.2. Estudios histológicos de NOp

3.2.1. Estudios inmunohistoquímicos. Se observó una disminución de la inmunorreactividad para pNFH en secciones de NOps de animales alojados en AS a los 21 días post-inyección de

LPS, en tanto que la exposición a AE previno significativamente el efecto del LPS sobre este parámetro (Figura 52).

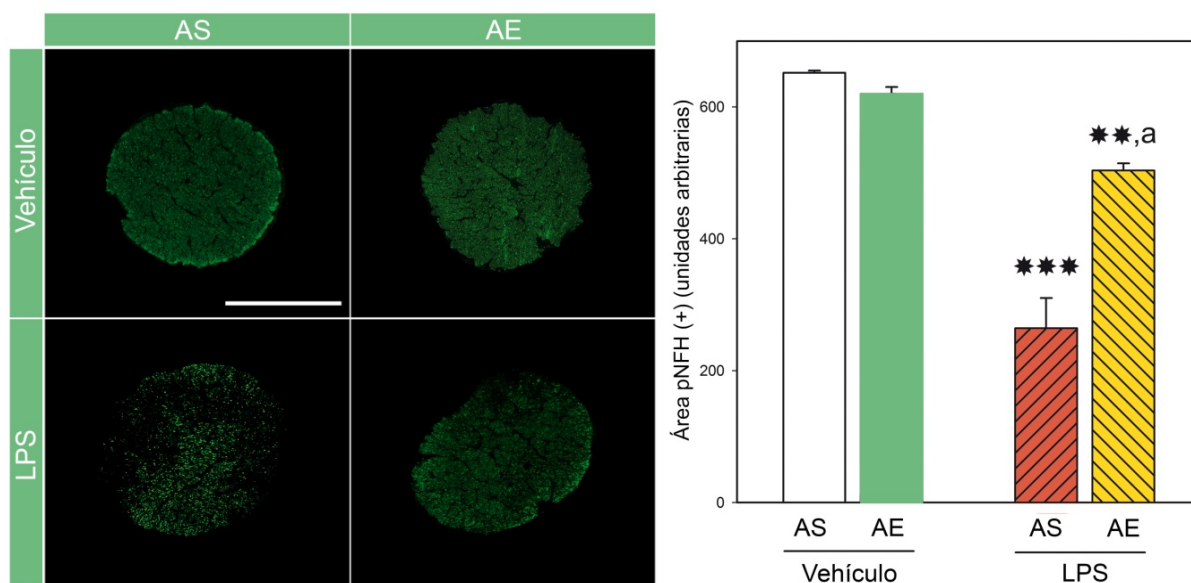


Figura 52. Efecto de la exposición a AE sobre la inmunorreactividad para pNFH. Panel izquierdo: microfotografías representativas de la inmunorreactividad para pNFH en secciones transversales de NOps inyectados con vehículo o LPS de animales expuestos a AS o AE a los 21 días post-inyección. Barra = 200 µm. Panel derecho: análisis del área pNFH(+). En AS, la inyección de LPS indujo una disminución significativa en el área pNFH(+), en tanto que la exposición a AE previno este efecto. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM (n = 6 NOps/grupo). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, a: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

A continuación, se analizaron los niveles de Iba-1, ED1, y GFAP en los mismos grupos experimentales. En animales alojados en AS, se observó un aumento significativo en el área Iba-1(+), ED1(+) y GFAP(+) a los 21 días post-inyección de LPS. La exposición a AE previno significativamente el efecto de LPS sobre la inmunorreactividad para los tres marcadores, como se muestra en la Figura 53. La exposición a AE no afectó estos parámetros en NOps inyectados con vehículo.

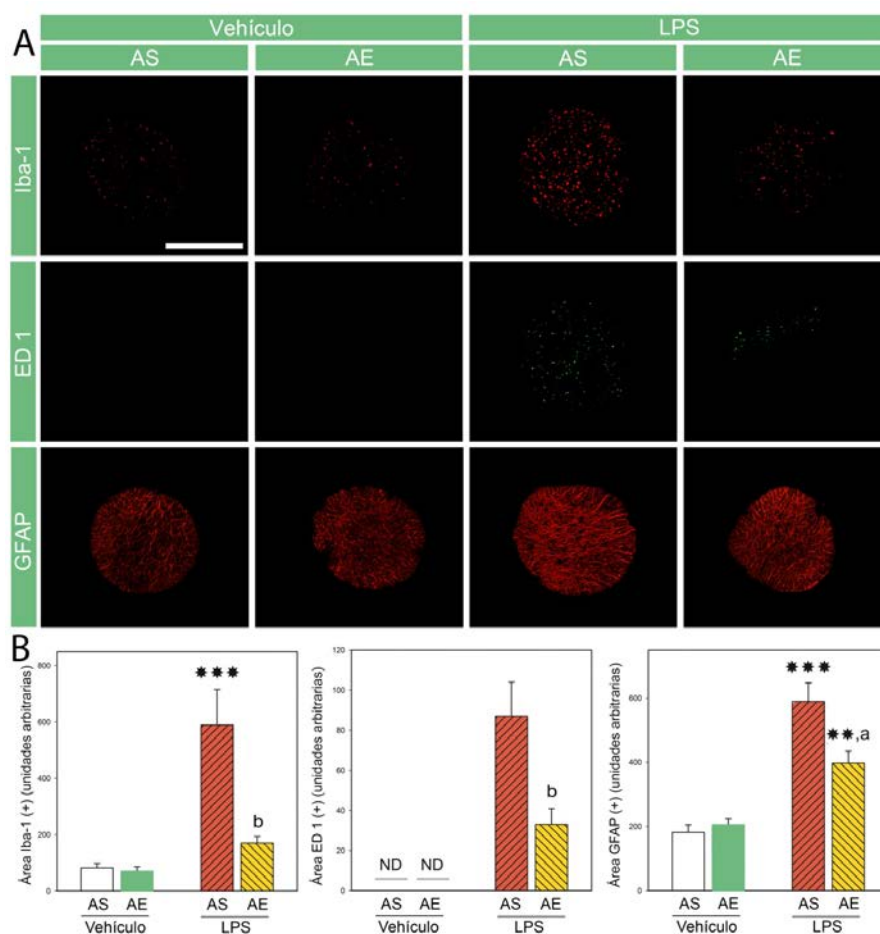


Figura 53. Efecto de la exposición a AE sobre la microglía/macrófagos, células fagocíticas y astrocitos. Panel superior: microfotografías representativas de la inmunorreactividad para Iba-1 (panel superior), ED1 (panel medio) y GFAP (panel inferior). Barra = 200 μ m. Panel inferior: análisis del área Iba-1(+), ED1(+) y GFAP(+). En AS, la NOE indujo un aumento significativo en el área Iba-1(+), ED1(+) y GFAP(+), en tanto que la exposición a AE previno significativamente este aumento. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM (n = 6 NOps/grupo). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, a: $P < 0,05$; b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

3.2.2. Estado de mielinización y número de axones. En animales alojados en AS, se observó una disminución en la tinción con *Luxol Fast Blue* en NOps inyectados con LPS, que fue significativamente menor en animales albergados en AE (Figura 54).

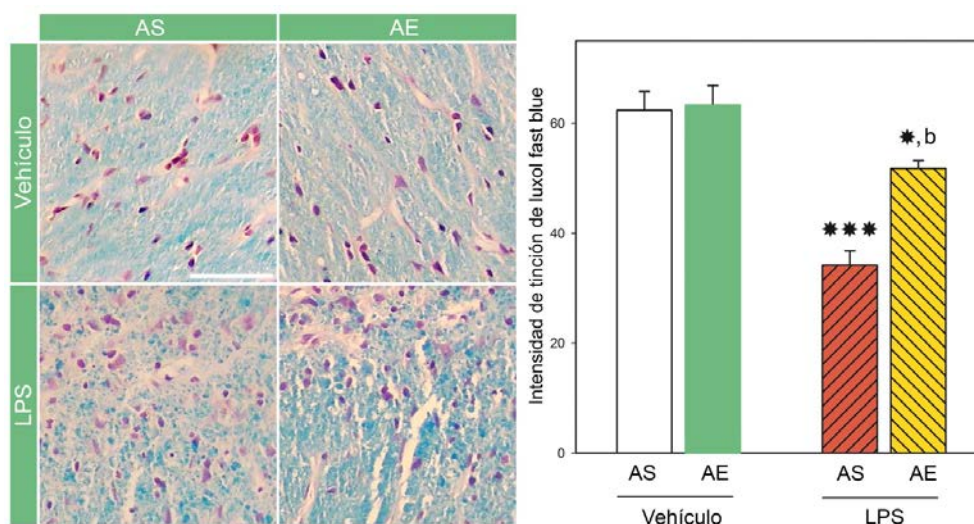


Figura 54. Efecto de la exposición a AE sobre la mielinización del NOP. Panel izquierdo: Imágenes representativas de secciones transversales (tinción con *Luxol Fast Blue*) de NOPs inyectados con vehículo o LPS de animales albergados en AS o AE a los 21 días post-inyección. En NOPs inyectados con vehículo en AS o AE se observó una marca compacta de *Luxol Fast Blue*. En animales expuestos a AS, se observó una menor marca de *Luxol Fast Blue* en NOPs inyectados con LPS. Este efecto fue significativamente prevenido por la exposición a AE. Barra = 50µm. Panel derecho: Se muestran los datos como media $\pm$ SEM (n = 6 NOPs/grupo) * $P < 0,05$; *** $P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con vehículo en AS, b: $P < 0,01$ vs. NOPs inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

En animales albergados en AS, el LPS indujo una disminución significativa en el número de axones, que fue prevenida en animales expuestos a AE (Figura 55).

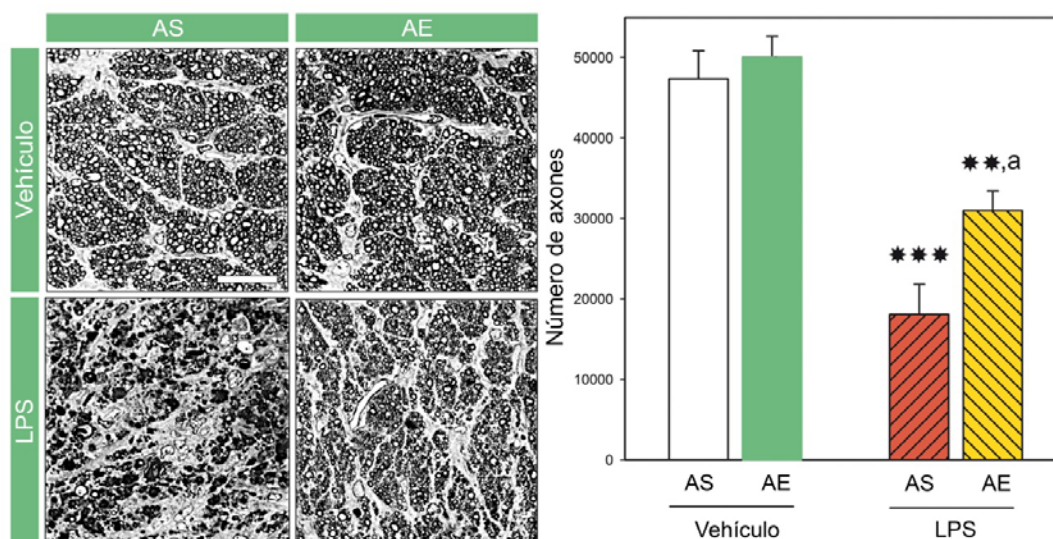


Figura 55. Efecto de la exposición a AE sobre el número de axones del NOP. Panel izquierdo: imágenes representativas de secciones transversales semifinas de NOPs proveniente de animales expuestos a AS o AE e inyectados con vehículo o LPS, a los 21 días post-inyección. En AS, la inyección de LPS indujo una disminución significativa en el número de axones, que fue significativamente prevenida en animales expuestos a AE. Barra = 25 µm. Panel derecho: Se muestran los datos como media $\pm$ SEM (n = 6 NOPs/grupo) ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. NOPs inyectados con vehículo en AS, a: $P < 0,05$ vs. NOPs inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

3.3. Estudio histológico de la retina

La exposición a AE previno el efecto de la NOE sobre el número de CGR Brn3a(+), como se muestra en la Figura 56.

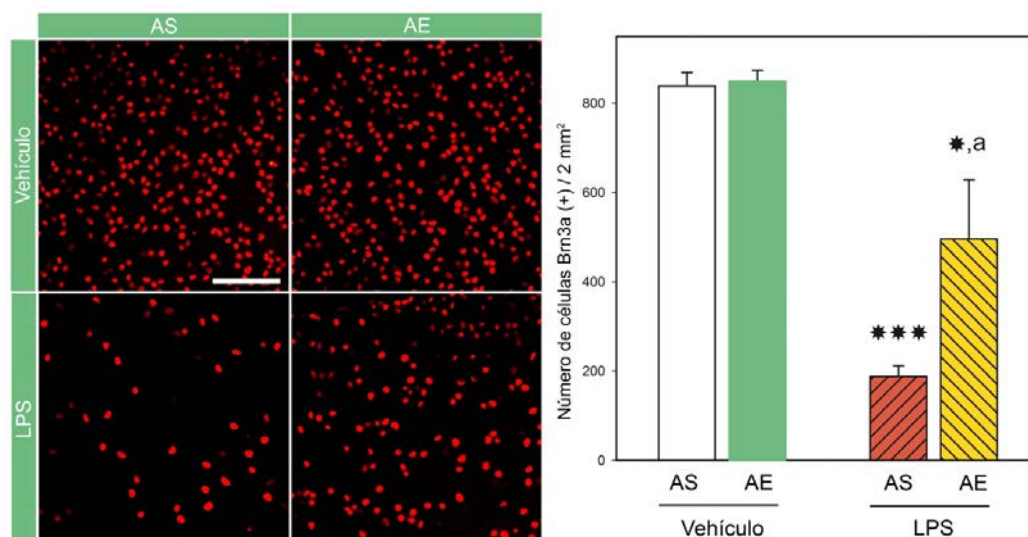


Figura 56. Efecto de la exposición a AE sobre el número de CGRs. Panel izquierdo: imágenes representativas de la inmunorreactividad para Brn3a en retinas en montaje plano cuyos NOps de animales albergados en AS o AE, fueron inyectados con vehículo o LPS. Barra = 100 μm. Panel derecho: cuantificación de células Brn3a(+). La exposición a AE previno significativamente la disminución en el número de CGR Brn3a(+) inducido por NOE. Se expresan los datos como media ± SEM (n = 6 retinas/grupo) * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, a: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

3.4. Estudios moleculares y de peroxidación lipídica

Se determinaron los niveles proteicos de NOS-2 y COX-2 por *Western blot* (Figura 57), la peroxidación lipídica (TBARS) (Figura 58), así como los niveles de ARNm de IL-1β y de TNF-α (Figura 59) en NOps de animales alojados a AS o AE a los 4 días post-inyección de vehículo o LPS. La exposición a AE previno significativamente el aumento de todos estos parámetros inducido por LPS. Además, la exposición a AE aumentó significativamente los niveles de BDNF en NOps inyectados con vehículo o LPS (Figura 60).

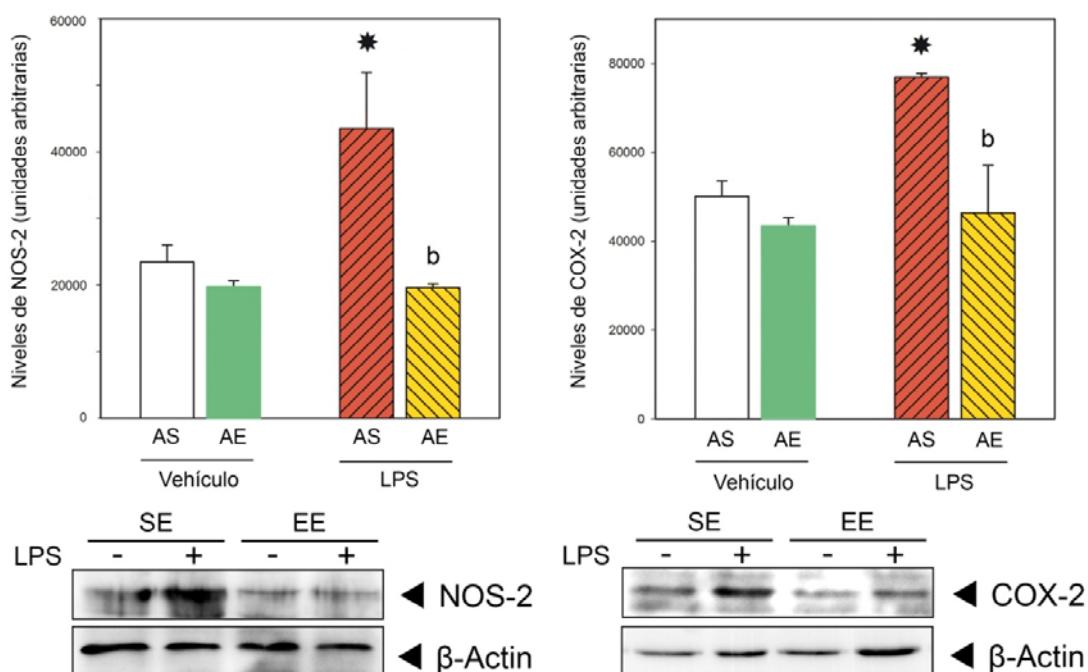


Figura 57. Efecto de la exposición a AE sobre los niveles proteicos de NOS-2 y COX-2. Panel superior: cuantificación por *Western blot* de los niveles proteicos de NOS-2 (izquierda) y COX-2 (derecha) relativizados a los niveles de β-actina en homogenatos de NOps obtenidos a los 4 días post-inyección de vehículo o LPS en animales albergados en AS o AE. La inyección de LPS indujo un aumento significativo de ambos parámetros, en tanto que la exposición a AE previno este aumento. Se expresan los datos como media ± SEM (n = 6 NOps/grupo) * $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, $b: P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey. Panel inferior: *Western blots* representativos para la determinación de los niveles proteicos de NOS-2 y COX-2 (izquierda y derecha, respectivamente).

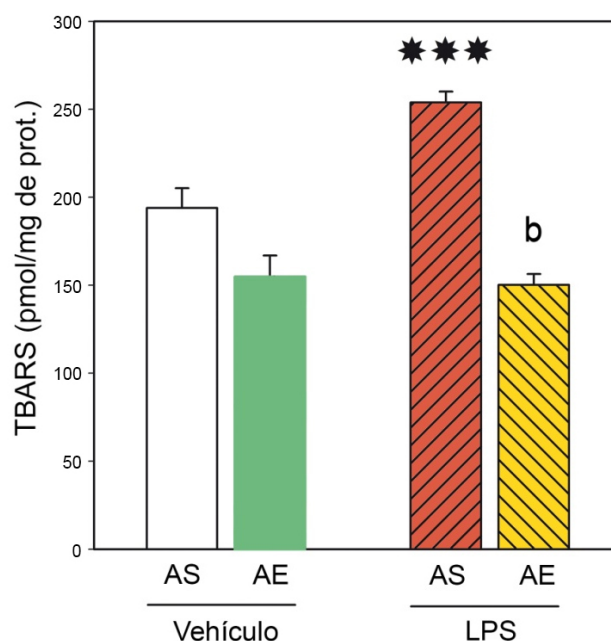


Figura 58. Efecto del LPS y el AE sobre la peroxidación lipídica. Cuantificación de los niveles de TBARS en homogenatos de NOps de animales albergados en AS o AE y obtenidos a los 4 días post-inyección de vehículo o LPS. La inyección de LPS indujo un aumento significativo en los niveles de TBARS, que no fue evidente en animales expuestos a AE. Se expresan los datos como media ± SEM (n = 6 NOps/grupo) *** $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, $b: P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

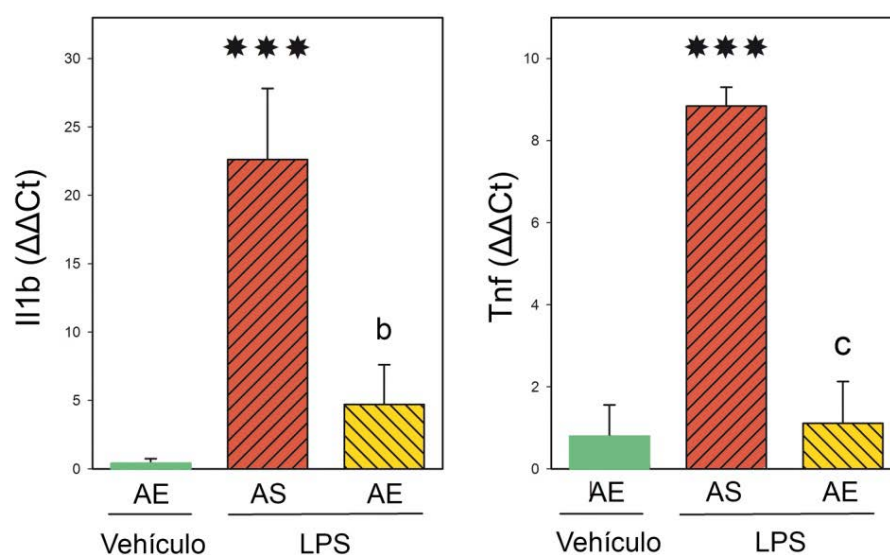


Figura 59. Efecto del AE sobre niveles de ARNm de Il1b y Tnf a los 4 días post-inyección, el LPS indujo un aumento significativo de ambos parámetros en animales albergados en AS, que no fue evidente en animales expuestos a AE. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n= 6 NOps/grupo). *** P < 0,001 vs. NOps inyectados con vehículo en AS, b: P < 0,01; c: P < 0,001 vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

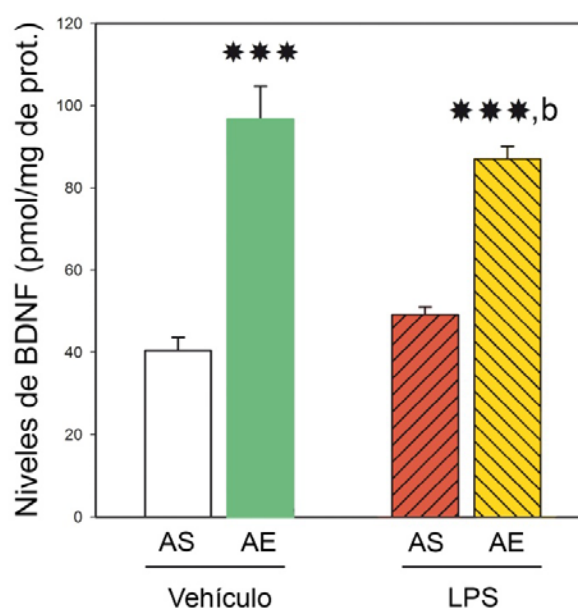


Figura 60. Efecto del AE sobre los niveles de BDNF en el NOP. Cuantificación de los niveles de proteicos de BDNF por ELISA. Se observó un aumento significativo de los niveles de BDNF en NOps de animales que fueron albergados en AE en comparación a NOps provenientes de animales expuestos a AS a los 4 días post-inyección de vehículo o LPS. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n = 6 NOps/grupo). *** P < 0,001 vs. NOps inyectados con vehículo en AS, b: P < 0,01 vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

3.5. Efecto de la exposición retrasada a AE

Con el objeto de estudiar el efecto de la exposición a AE *a posteriori* de la inducción de NEO, se transfirieron animales a AE en los días 4 ó 7 post-inyección y se analizó el RP en diferentes intervalos. La exposición a AE comenzada en el día 4 post-inyección de LPS, protegió significativamente el RP luego de sólo 3 días de exposición (es decir, 7 días después de la inyección de LPS), como se muestra en la Figura 61. Asimismo, cuando la exposición a AE comenzó a los 4 días post-inyección y se extendió hasta el día 21 de vehículo o LPS, se observó una completa preservación del RP contra el daño inducido por LPS a los 21 días post-inyección (Figura 62). Cuando el alojamiento en AE duró sólo 3 días, comenzando el día 4 y terminando el día 7 post-LPS, se observó una preservación completa de RP en el día 21 post-inyección (Figura 62). Sin embargo, cuando la exposición a AE comenzó a los 7 días post-inyección de LPS, no se observó protección del RP (Figura 62).

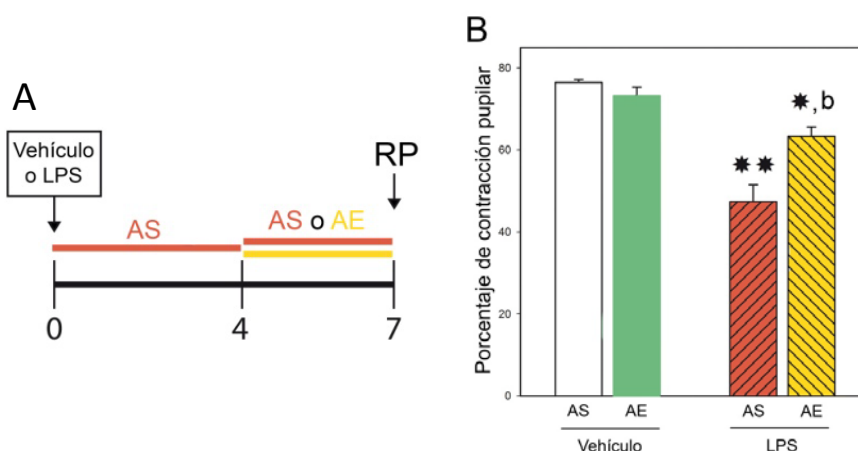


Figura 61. Efecto de la exposición a AE *a posteriori* de la inyección de LPS. Panel A: Esquema de la exposición a AS o AE. Se determinó el RP a los 7 días post-inyección de LPS. Panel B: cuantificación del RP de los grupos experimentales. La exposición a AE durante 3 días (comenzando el día 4 post-LPS) indujo una protección parcial del RP. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n= 6 ojos/grupo) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, b: $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

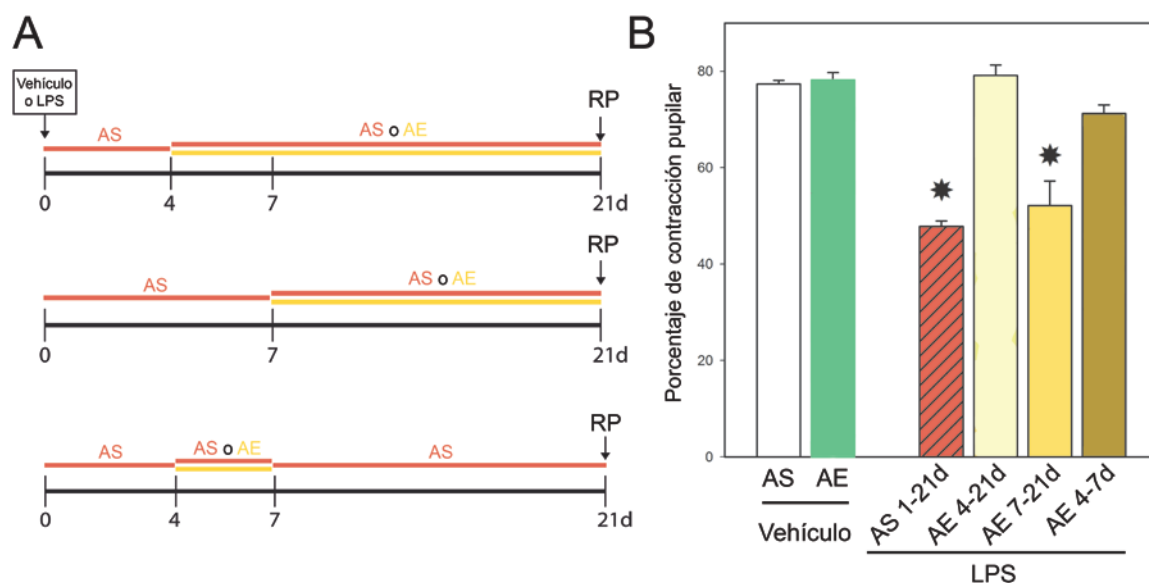


Figura 62. Efecto de la exposición a AE iniciada a diferentes intervalos post-inyección de LPS. Panel A: esquema de los diferentes períodos de exposición a AE: de 4 - 21 (panel superior), 7 - 21 (panel medio) y 4 - 7 días post-inyecciones en el NOP. En todos los casos se determinó el RP a los 21 días post-inyección. Panel B: cuantificación del porcentaje de contracción pupilar en los diferentes grupos experimentales. Cuando la exposición a AE comenzó a los 3 días post-inyección, se observó una completa preservación del RP contra el daño inducido por NOE. La exposición a AE comenzada a los 7 días post-inyección fue inefectiva. Cuando el alojamiento en AE duró sólo 4 días (comenzando el día 4 y terminando el día 7 post-LPS), se observó una preservación completa de RP. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 6$ ojos/grupo) * $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, test de Tukey.

3.6. Tratamiento con ANA-12

Con el objeto de analizar la participación de la vía BDNF/TrkB en la protección inducida por exposición a AE, se administró por vía intraperitoneal ANA-12, un antagonista selectivo del receptor TrkB. El ANA-12 se inyectó una vez por día (desde el día 4 al 7 post-inyección), en animales que fueron transferidos a AE el día 4 post-inyección y se evaluó el RP a los 21 días post-inyección. La inyección de ANA-12 inhibió completamente el efecto del AE sobre el RP (Figura 63). El ANA-12 no afectó este parámetro en animales alojados en AS cuyos NOps se inyectaron con vehículo o LPS.

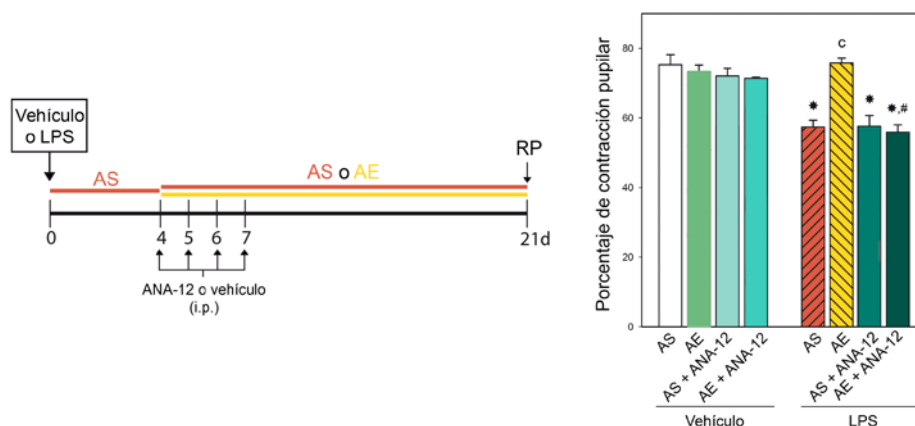


Figura 63. Efecto del ANA-12 sobre el RP. Panel izquierdo: esquema de exposición a AS o AE a los 4 días post-inyección y aplicación intraperitoneal de vehículo o ANA-12 diariamente (días 4, 5, 6 y 7 post-inyección de vehículo o LPS). Se determinó el RP a los 21 días post-inyección. Panel derecho: cuantificación del porcentaje de contracción pupilar en los grupos experimentales. La inyección de ANA-12 que no afectó este parámetro en animales alojados en AS, inhibió el efecto del AE sobre el RP. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n= 6 ojos/grupo) * $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con vehículo en AS, c: $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, #: $P < 0,05$ vs. LPS en AE, test de Tukey.

3.7. Contribución del componente visual del AE en el tratamiento de la NOE

Para evaluar la contribución del estímulo visual en la protección inducida por la exposición a AE, se inyectó bilateralmente vehículo o LPS en animales expuestos a AS o AE. Tanto el RP como el número de CGRs no difirieron significativamente entre animales albergados por 21 días en AS o AE inyectados con LPS bilateralmente (Figura 64).

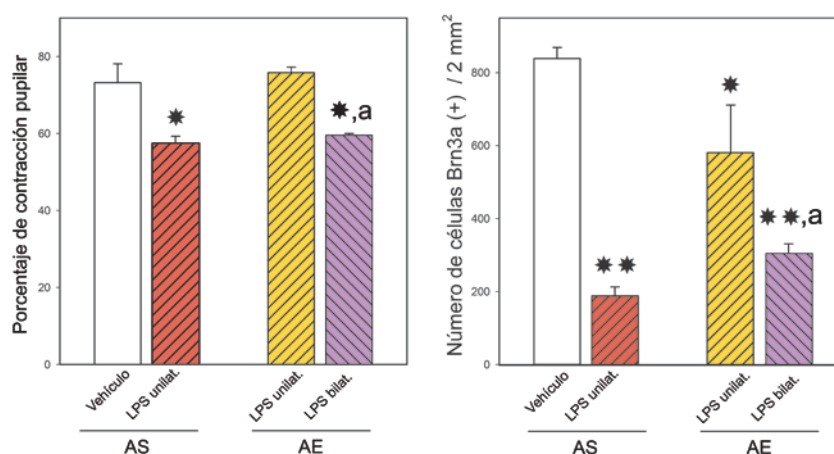


Figura 65. Efecto de la exposición a AE sobre la NOE bilateral. Se realizaron inyecciones bilaterales de vehículo o LPS en animales que se albergaron en AS o AE y se determinó el RP y el número de CGRs a los 21 días post-inyección. No se observaron diferencias en ambos parámetros entre animales que fueron inyectados bilateralmente con LPS y albergados en AE en comparación a animales expuestos a AS que fueron inyectados con LPS en forma unilateral. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n= 6 ojos/grupo) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados unilateralmente con LPS en AE, a: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en AS, test de Tukey.

4. Estudio de la integridad de la barrera hemato-encefálica

El siguiente objetivo de esta tesis doctoral, fue estudiar la contribución de la pérdida de integridad de la BHE y el consecuente infiltrado leucocitario al daño visual inducido por NOE.

4.1. Análisis de la permeabilidad de la BHE

Se evaluó la permeabilidad de la BHE en NOps intactos o inyectados con vehículo o LPS, a través de la inyección intrayugular de Azul de Evans. A las 6 h post-LPS, se observó un aumento de la permeabilidad vascular que persistió a las 24 h y 7 días post-inyección (Figura 65). Además, se observaron puntos de fuga de Azul de Evans en vasos superficiales del NOP a las 24 h post-inyección de LPS.

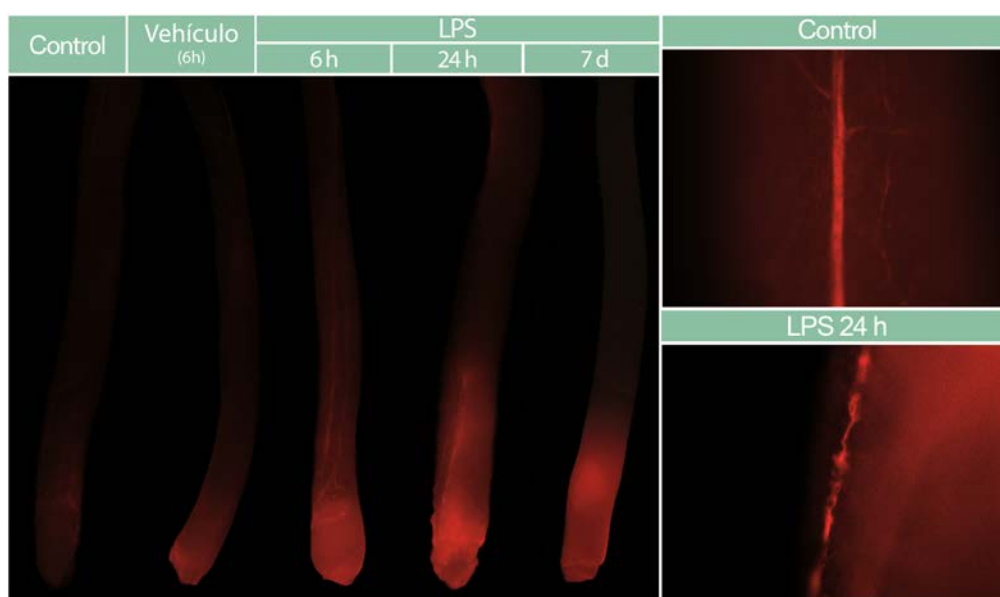


Figura 65. Análisis de la integridad de la BHE. Se analizó la permeabilidad vascular en NOps a las 6 y 24 h, y 7 días post-inyección de LPS. Panel izquierdo: microfotografías de NOps de animales perfundidos con Azul de Evans. Se observó un aumento en la permeabilidad de la BHE a las 6 h, que persistió a las 24 h y 7 días post-LPS. Panel derecho: vasos sanguíneos superficiales de un NOP intacto ó 24 h post-inyección de LPS. Se observaron varios puntos de fuga de Azul de Evans en vasos superficiales de NOps a las 24 h post-LPS. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo.

4.2. Análisis del infiltrado leucocitario en la NOE

Se analizó la celularidad por tinción con H&E en secciones transversales de NOps a las 6 h y 24 h post-inyección de vehículo o LPS. Ya a las 6 h se observó un aumento en el número de células en NOps inyectados con LPS, con una morfología compatible con la de neutrófilos (Figura 66A). A continuación, se utilizaron quimeras WT-GFPp/WT y se observó la presencia de células GFP(+) en secciones longitudinales de NOps a las 24 h post-inyección de LPS, que según su morfología fueron identificadas como neutrófilos y monocitos (Figura 66B).

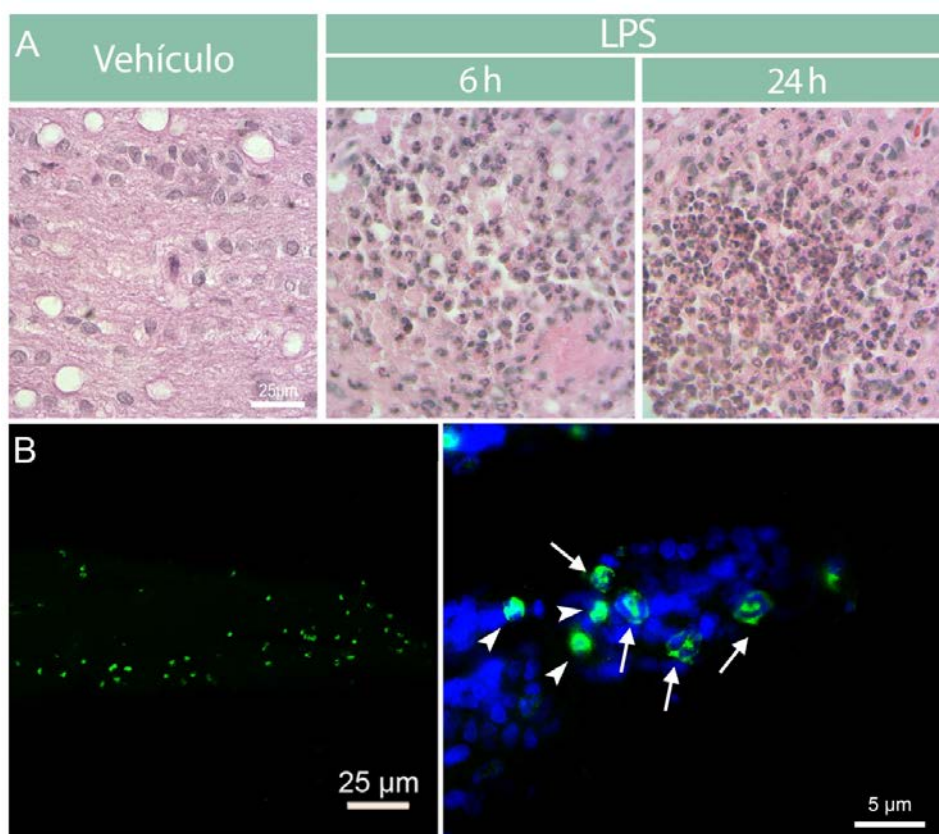


Figura 66. Infiltrado leucocitario en el NOp. Panel A: Se muestran tinciones con H&E en secciones longitudinales de NOps inyectados con vehículo o LPS a las 6 y 24 h post-inyección. Se observó un aumento en el número de células a las 6 h y a las 24 h post-LPS. Panel B: secciones longitudinales de NOps provenientes de ratas WT-GFPp/WT a las 24 h post-inyección de LPS. Se observó la presencia de células GFP(+) en el sitio de lesión que según su morfología, fueron identificadas como neutrófilos (flecha) y monocitos (punta de flecha). Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo.

Por citometría de flujo, se observó un aumento significativo en el número de células $CD11b^+CD45^{low}$ (microglía) y células $CD11b^+CD45^{high}$ (macrófagos infiltrados) a los 24 h post-inyección de LPS (Figura 67).

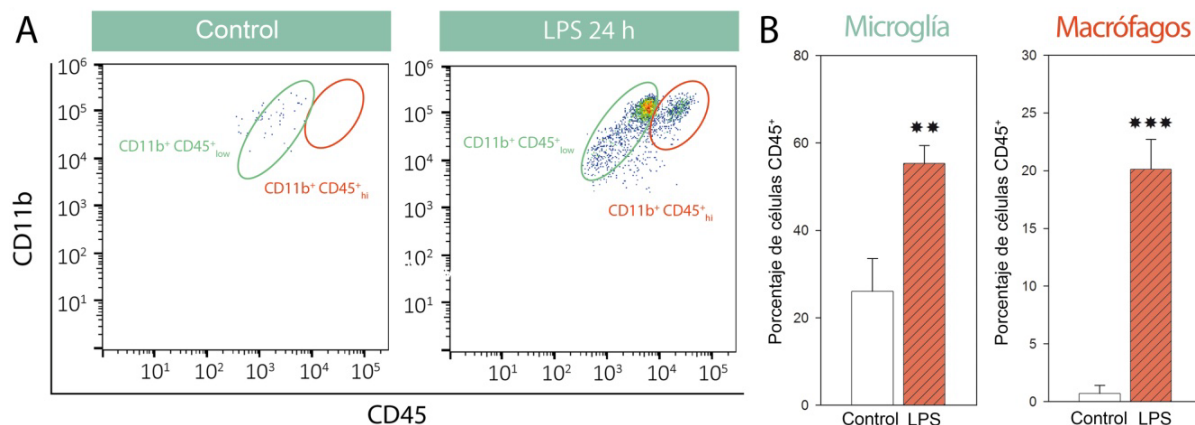


Figura 67. Análisis de microglía residente y macrófagos infiltrados por citometría de flujo. Panel A: citometrías representativas del análisis de células provenientes de un animal cuyo NOp permaneció intacto y de un animal cuyo NOp fue inyectado con LPS a las 24 h post-inyección. Panel B: cuantificación de células microgliales ($CD11b^+CD45^{low}$) y macrófagos derivados de monocitos ($CD11b^+CD45^{high}$). La inyección de LPS indujo un aumento significativo de ambas poblaciones celulares. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n= 5 NOps/grupo) ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. NOps intactos, test de Student.

Con el objeto de estudiar la relevancia de la infiltración leucocitaria en el daño de la vía visual inducida por NOE, se realizaron inyecciones de vehículo o LPS en animales que fueron irradiados con rayos γ , portando un casco de plomo protector de cabeza y ojos. Se realizó la cuantificación leucocitaria en sangre periférica y se confirmó un conteo leucocitario disminuido en animales irradiados en comparación a animales no irradiados (Tabla 3). A las 6 h post-inyección, el LPS indujo un aumento en la permeabilidad vascular en el NOp aun en animales irradiados (Figura 68A). Sin embargo, la irradiación previno en forma robusta el efecto del LPS sobre el RP (Figura 68B) y el número de CGRs (Figura 68C) en comparación con animales no irradiados cuyos NOps fueron inyectados con LPS.

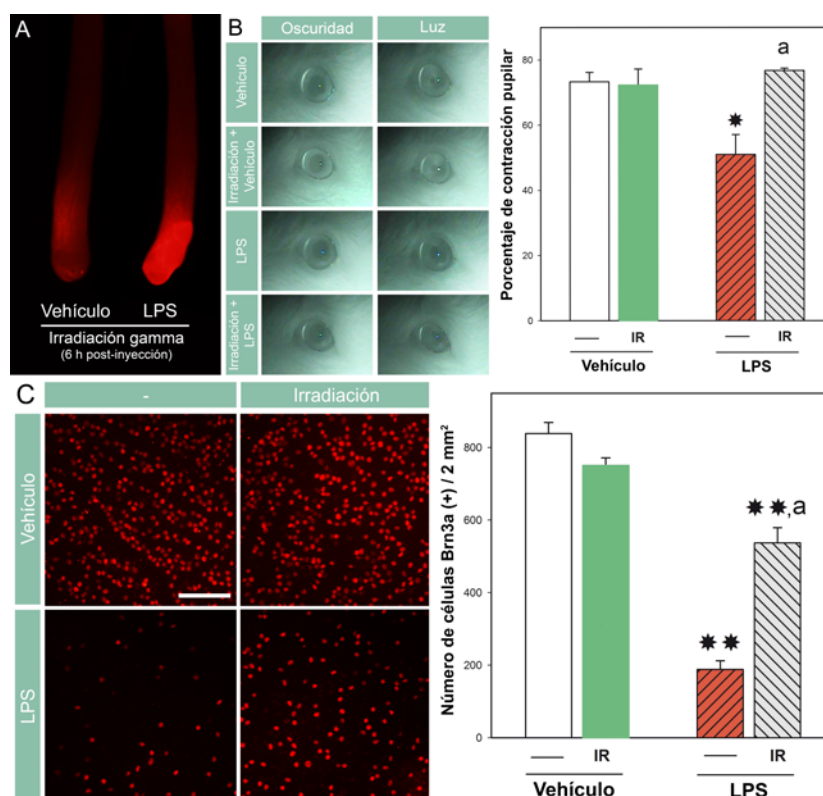


Figura 68. Efecto de la irradiación gamma. Panel A: estudio de la integridad de la BHE por perfusión con Azul de Evans en NOps de animales irradiados (IR), a las 6 h post-inyección de vehículo o LPS. Se observó un aumento en la permeabilidad de la BHE en animales irradiados inyectados con LPS. Panel B: Determinación del RP en animales intactos o irradiados, inyectados con vehículo o LPS a los 21 días post-inyección. El LPS indujo una disminución del RP en animales no irradiados, en tanto que el RP en animales irradiados e inyectados con LPS no difirió del observado en animales no irradiados o irradiados cuyos NOps fueron inyectados con vehículo. Panel C: cuantificación del número de células Brn3a(+) en retinas de animales intactos o irradiados, inyectados con vehículo o LPS a los 21 días post-inyección. El LPS indujo una disminución en el número de CGRs en animales no irradiados, en la tanto que la irradiación previno significativamente el efecto del LPS sobre este parámetro. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ ojos/grupo), * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en animales no irradiados, $a: P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en animales no irradiados, test de Tukey. Barra = 100 μ m.

4.3. Efecto de la microinyección de rtPA en el nervio óptico

La inyección de rtPA indujo un aumento en la permeabilidad vascular a las 6 h post-inyección (Figura 69). Asimismo, la inyección de rtPA disminuyó significativamente el RP y el número de CGRs a los 21 días post-inyección, en tanto que la irradiación previa a la microinyección, previno significativamente el efecto del rtPA sobre ambos parámetros (Figura 69). El efecto de la microinyección de rtPA fue similar al observado luego de la microinyección de LPS en cuanto al RP y el número de células Brn3a(+) (datos no mostrados).

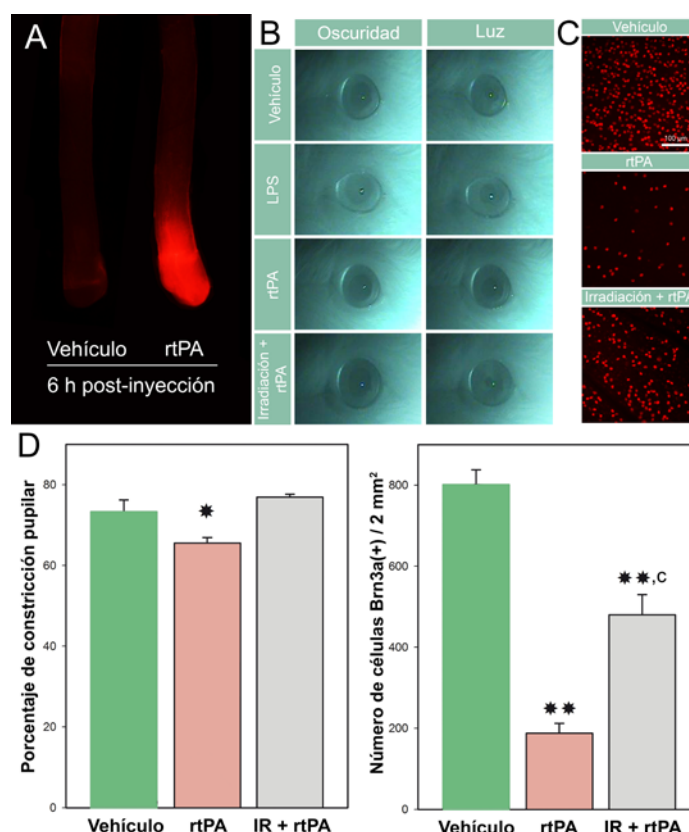


Figura 69. Efecto de la microinyección de rtPA en el NOP. Panel A: estudio de la integridad de la BHE por perfusión con Azul de Evans en NOps a las 6 h post-inyección de vehículo o rtPA. Se observó un aumento en la permeabilidad de la BHE en NOps de animales inyectados con rtPA. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo. Panel B: determinación del RP en animales no irradiados o irradiados inyectados con vehículo o rtPA a los 21 días post-inyección. El rtPA indujo una disminución del RP en animales no irradiados, pero no en animales irradiados. Panel C: cuantificación del número de células Brn3a(+) a los 21 días post-inyección. En animales no irradiados, el rtPA indujo una disminución en el número de CGRs, en tanto que la irradiación previno significativamente el efecto del rtPA sobre este parámetro. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n=5$ NOps/grupo) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo, c: $P < 0,001$ vs. NOps inyectados con rtPA en animales no irradiados, test de Tukey.

4.4. Estudio de la participación de la quimiocina CCL2

A continuación, se determinaron los niveles de CCL2 en el NOP. A las 6 h post-LPS, se observó un aumento en la inmunorreactividad para CCL2 co-localizada con células morfológicamente similares a neutrófilos (Figura 71), sin co-localización con células Iba-1(+) (microglía o macrófagos) o células GFAP(+) (astrocitos) (Figura 70). En este intervalo, el LPS indujo una notable disminución en la inmunorreactividad para GFAP. A las 24 h post-LPS, se observó un aumento en la inmunorreactividad para Iba-1 y su co-localización con CCL2 (Figura 71).

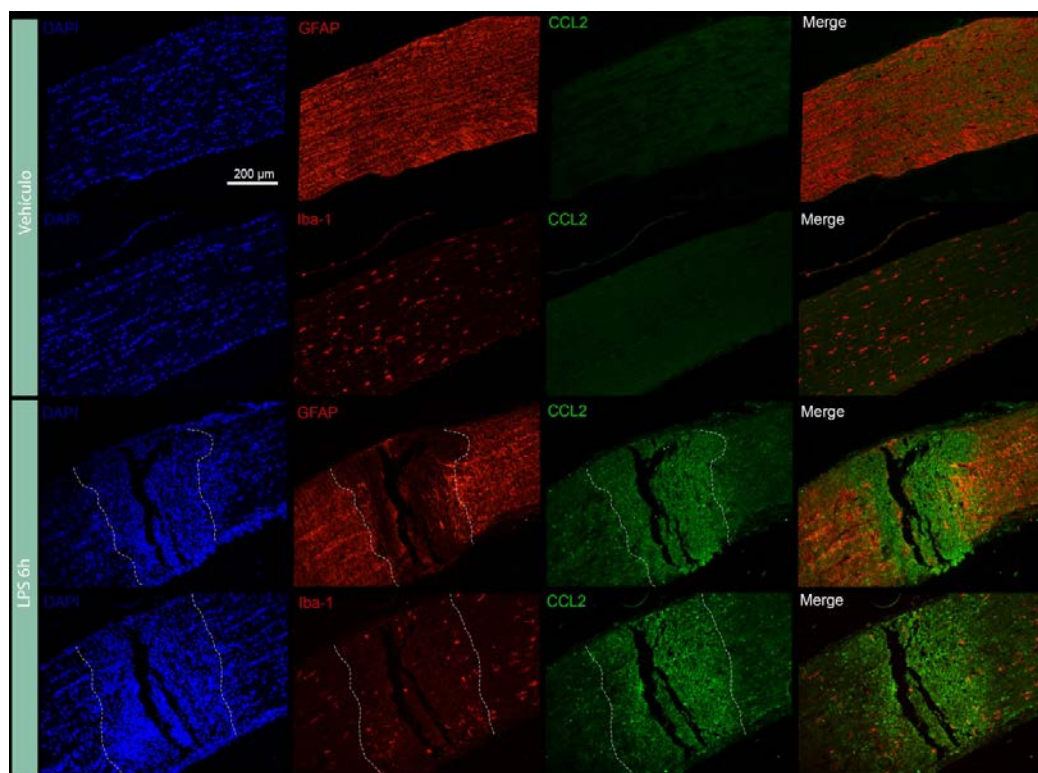


Figura 70. Estudio inmunohistoquímico para CCL2. Se analizó la inmunorreactividad para CCL2 (verde) y su co-localización con células Iba-1(+) (microglía/macrófagos) o células GFAP(+) (astrocitos) en secciones longitudinales de NOps inyectados con vehículo (panel superior) o LPS, a las 6 h post-inyección (panel inferior). Se observó un aumento en la inmunorreactividad para CCL2 en el área de lesión (delimitada en líneas punteada) sin co-localización evidente con células Iba-1(+) o GFAP(+). Se observó una disminución en la inmunorreactividad para GFAP, sin cambios en la inmunorreactividad para Iba-1. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo.

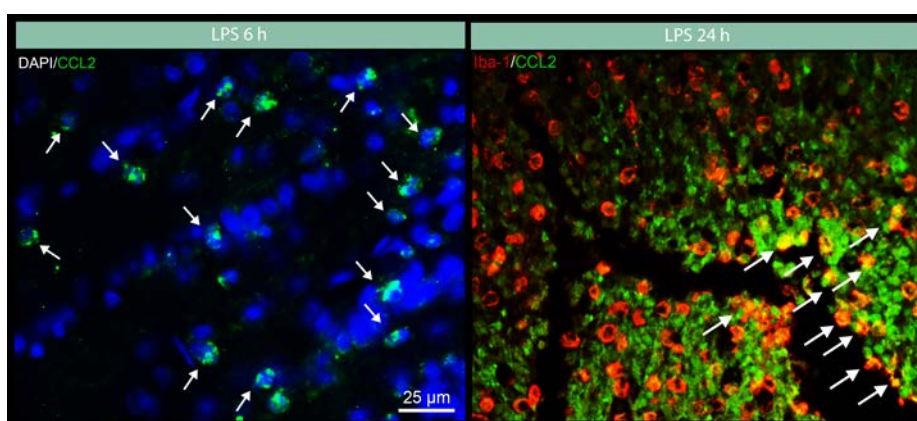


Figura 71 Determinación de los niveles de CCL2. Panel izquierdo: a las 6 h post-inyección de LPS se observó inmunorreactividad para CCL2 en células con apariencia morfológica similar a neutrófilos. Panel derecho: a las 24 h post-LPS, se observó co-localización de CCL2 con células Iba-1(+) en secciones longitudinales de NOps. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo.

Con el objeto de analizar la participación de CCL2 en el daño de la vía visual inducido por NOE, se realizó una co-inyección de LPS con bindarit, un inhibidor de la síntesis *de novo* de

CCL2. El bindarit indujo una disminución en la inmunorreactividad para CCL2 a las 6 h post-LPS (Figura 72). La co-inyección de LPS con bindarit previno significativamente el efecto del LPS sobre los VEPs (Figura 72), el RP y el número de CGRs a los 21 días post-inyección (Figura 73).

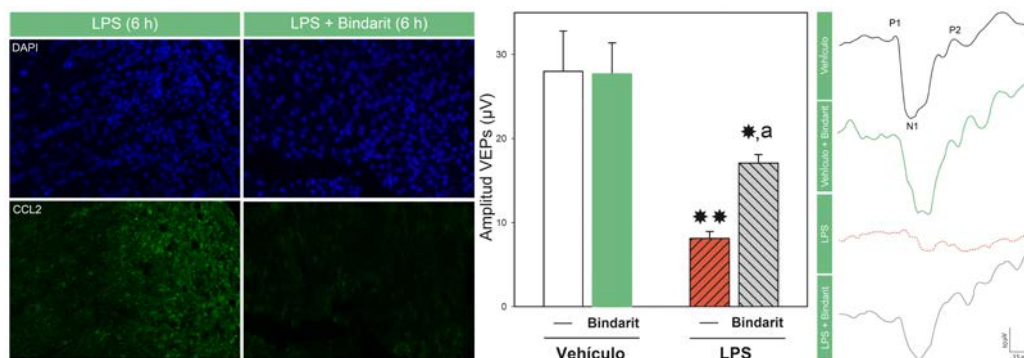


Figura 72. Efecto del bindarit sobre la expresión de CCL2 y los VEPs. Panel izquierdo: estudio inmunohistoquímico para CCL2 en secciones longitudinales de NOps. El bindarit indujo una disminución en la inmunorreactividad para CCL2 en el sitio de lesión a las 6 h post-inyección. Se muestran imágenes representativas de 5 NOps/grupo. Panel derecho: cuantificación y trazados representativos de VEPs de animales que fueron inyectados con vehículo, vehículo + bindarit, LPS o LPS + bindarit a los 21 días post-inyección. El bindarit indujo una preservación parcial de la amplitud de los VEPs. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ NOps/grupo) $*P < 0,05$; $**P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de bindarit, a: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de bindarit, test de Tukey.

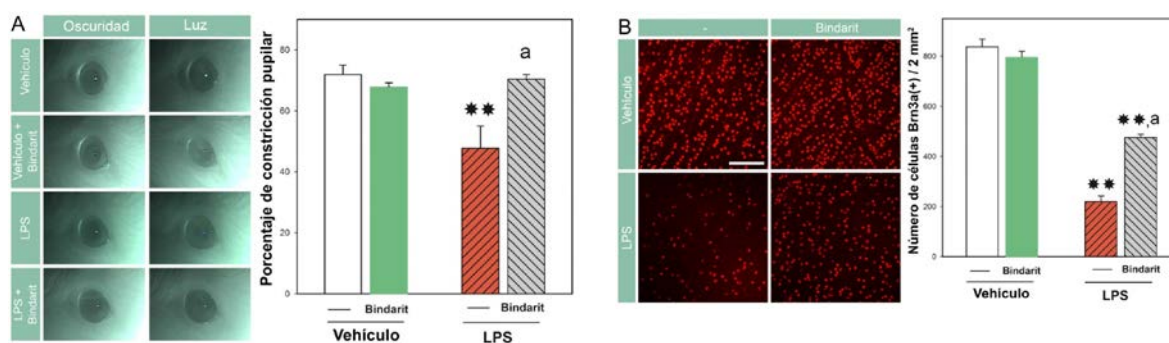


Figura 73. Efecto del bindarit sobre el daño visual inducido por NOE. Panel A: evaluación del RP de animales que fueron inyectados con vehículo, vehículo + bindarit, LPS o LPS + bindarit a los 21 días post-inyección. El bindarit preservó el RP en animales inyectados con LPS en comparación con animales inyectados con LPS en ausencia de bindarit. Panel derecho: cuantificación de CGRs a los 21 días post-inyección. El bindarit protegió significativamente el número de CGRs. Se muestran imágenes representativas de 5 animales/grupo. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ ojos/grupo), $**P < 0,01$ vs. NOps inyectados con vehículo en ausencia de bindarit, a: $P < 0,05$ vs. NOps inyectados con LPS en ausencia de bindarit, test de Tukey. Barra = 100 μ m.

4.5. Efecto de la depleción de monocitos de sangre periférica sobre la NOE

Por último, se analizó la contribución del reclutamiento de monocitos de sangre periférica en el desarrollo de la NOE. Para ello, se realizaron tratamientos con dos drogas

inmunosupresoras: etopósido y cloruro de gadolinio (GdCl_3), como se describe en la Figura 74.

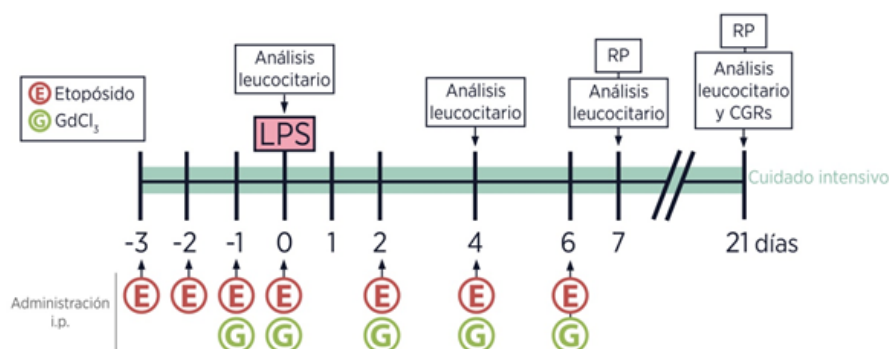


Figura 74. Esquemas del procedimiento experimental para los tratamientos con etopósido (E) y GdCl_3 (G).

En los días 0, 4 y 7 (pero no 21) post-LPS, el etopósido y el GdCl_3 disminuyeron significativamente el porcentaje de monocitos, pero no de neutrófilos o linfocitos en sangre (Tabla 3).

Parámetro	Tratamiento	Días después de la inyección			
		0	4	7	21
Linfocitos	Naïve	10.01 ± 0.78			
	Vehículo	9.90 ± 0.81			
	Irradiación	3.94 ± 1.91**			
	Etopósido	8.38 ± 2.45	14.92 ± 0.43	15.60 ± 2.18	6.88 ± 3.50
	GdCl_3	12.80 ± 0.05	16.95 ± 6.32	17.50 ± 6.91	15.23 ± 2.75
Monocitos	Naïve	3.21 ± 0.48			
	Vehículo	3.01 ± 0.30			
	Irradiación	0.77 ± 0.20**			
	Etopósido	0.55 ± 0.20**	0.75 ± 0.22**	1.80 ± 0.20*	5.66 ± 0.55**
	GdCl_3	0.24 ± 0.07**	1.50 ± 0.10*	1.60 ± 0.40*	5.68 ± 0.60**
Neutrófilos	Naïve	2.97 ± 0.32			
	Vehículo	3.10 ± 0.40			
	Irradiación	1.07 ± 0.40**			
	Etopósido	3.77 ± 1.82	2.10 ± 0.47	3.61 ± 1.47	1.51 ± 0.55
	GdCl_3	2.62 ± 1.37	1.92 ± 0.60	3.74 ± 1.13	1.99 ± 0.73

Tabla 3. Efecto de la irradiación, el etopósido y el GdCl_3 sobre el porcentaje de linfocitos, monocitos y neutrófilos en sangre. En animales irradiados, las muestras de sangre se obtuvieron 7 días después de la inyección de LPS, en tanto que el efecto del etopósido y el GdCl_3 se analizó en los días 0, 4, 7 y 21 días post-

LPS. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ animales/grupo), $*P < 0,05$; $**P < 0,01$ vs. animales intactos (naïve), test de Tukey.

El tratamiento con etopósido o $GdCl_3$ previno significativamente la disminución del RP y del número de CGRs a los 21 días post-LPS (Figura 75A y 75B, respectivamente).

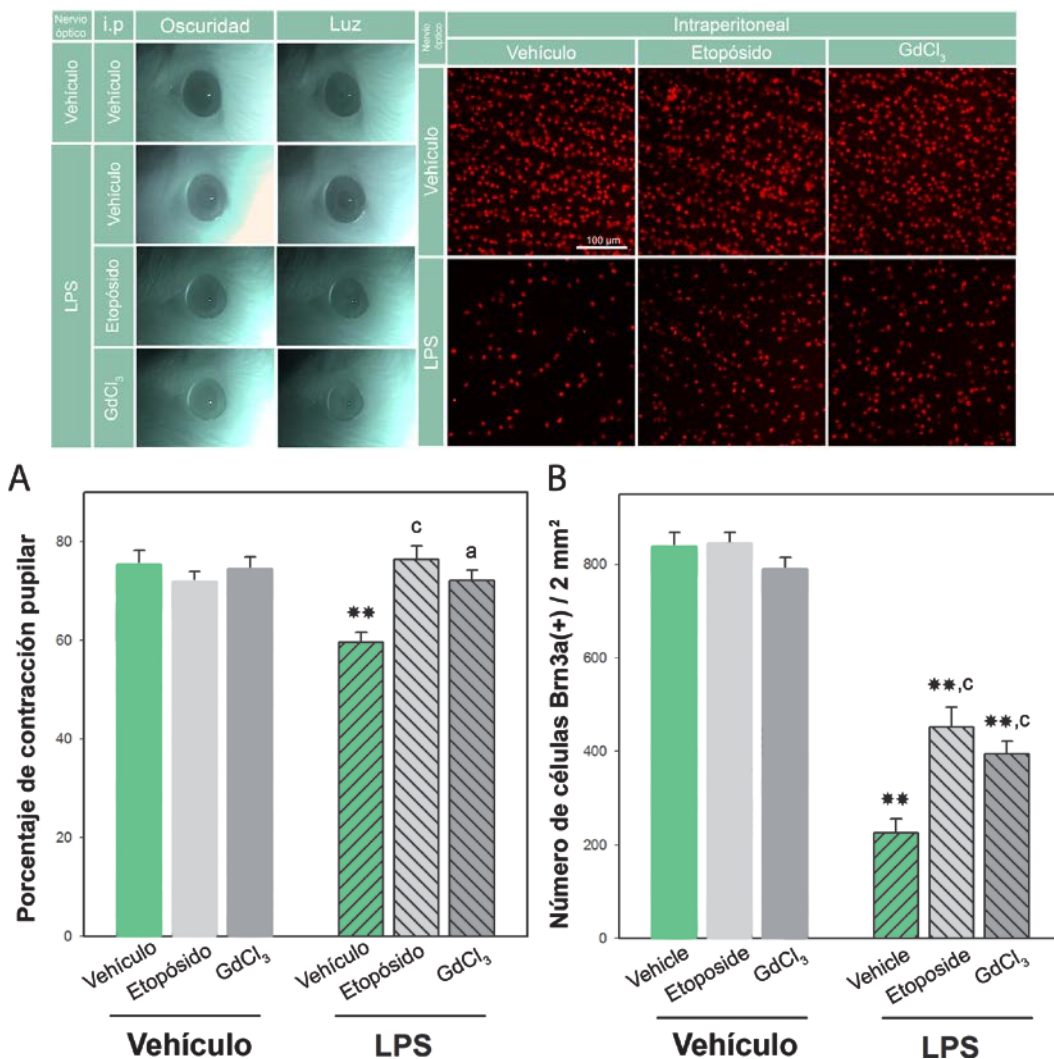


Figura 75. Efecto de etopósido y $GdCl_3$ sobre el daño visual inducido por NOE. Panel superior: Imágenes representativas del RP (izquierda) y de la inmunorreactividad para Brn3a(+) (derecha) de animales tratados con etopósido o $GdCl_3$ cuyos NOps fueron inyectados con vehículo o LPS. Panel A y B: cuantificación del RP y el número de CGRs a los 21 días post-inyección, respectivamente. Los tratamientos con etopósido y $GdCl_3$ previnieron significativamente la disminución del RP y del número de CGRs inducida por LPS. Se expresan los datos como media $\pm$ SEM ($n = 5$ animales/grupo), $**P < 0,01$ vs. animales inyectados con vehículo en el NOp y con vehículo intraperitoneal, a: $P < 0,05$; c: $P < 0,001$ vs. animales inyectados con LPS en el NOp y con vehículo intraperitoneal, test de Tukey.

En animales tratados con etopósido o $GdCl_3$ se observó una preservación significativa del RP ya a los 7 días post-LPS y una correlación negativa de este parámetro con el porcentaje de monocitos circulantes, pero no con el porcentaje de neutrófilos o linfocitos (Figura 76).

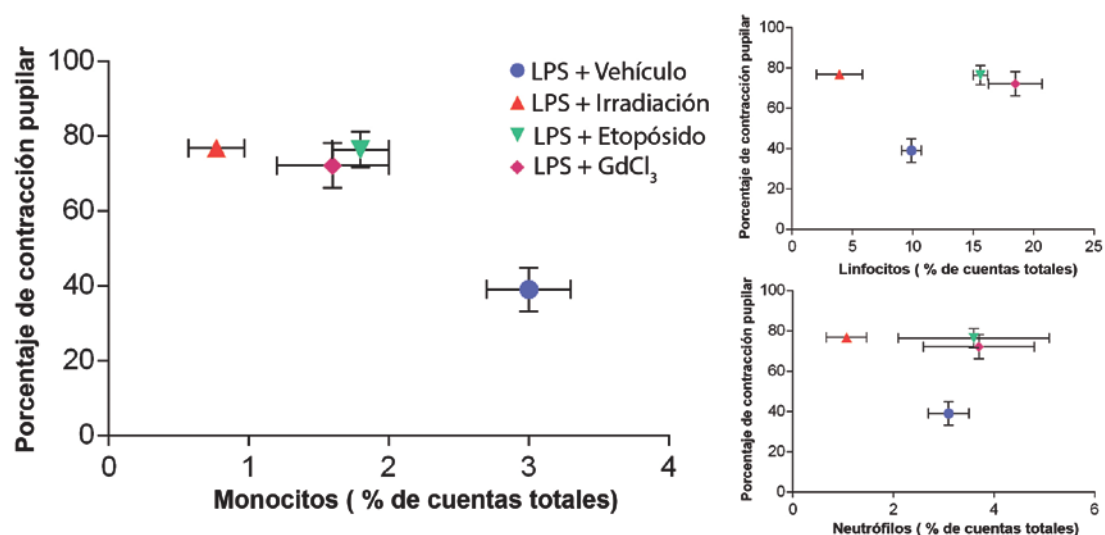


Figura 76. Correlación entre el porcentaje de monocitos, linfocitos y neutrófilos de sangre periférica y el RP a los 7 días post-inyección de LPS. Se evidenció una relación inversa entre el RP y el porcentaje de monocitos (pero no de linfocitos o neutrófilos). Se expresan los datos como media $\pm$ SEM (n= 5 animales/grupo).

DISCUSIÓN

La NO, una enfermedad inflamatoria y desmielinizante del NOp que puede provocar ceguera irreversible, es una de las neuropatías más frecuentes en la práctica oftalmológica. Al presente, no se dispone de estrategias terapéuticas suficientemente eficaces para el tratamiento de esta enfermedad. Muy posiblemente, uno de los factores que ha limitado el desarrollo de nuevos tratamientos es la falta de modelos animales que reproduzcan fidedignamente las características centrales de algunas de las formas frecuentes de la NO humana. Desde hace ya varias décadas la comunidad científica internacional ha reconocido la importancia de disponer de modelos animales para el estudio de las enfermedades humanas. La similitud de un proceso patológico en animales de experimentación, aun con diferencias respecto al humano, constituye una herramienta de valor indiscutible para la comprensión de un proceso en su contraparte humana y para la búsqueda de estrategias terapéuticas de nueva generación. A lo largo de este trabajo de tesis, hemos desarrollado un nuevo modelo de NOE primaria que aventaja considerablemente a los modelos pre-existentes. Asimismo, utilizando este nuevo modelo, evaluamos el potencial terapéutico de una estrategia farmacológica (tratamiento con melatonina), así como de un tratamiento no invasivo (el enriquecimiento ambiental) y analizamos la contribución de la pérdida de integridad de la BHE y la infiltración leucocitaria al daño de la vía visual inducida por NOE. A continuación, se discutirán los resultados obtenidos en función de los objetivos planteados.

1. Desarrollo de un modelo de neuritis óptica experimental primaria

Por primera vez, los resultados obtenidos demuestran que la microinyección de LPS en el NOp indujo alteraciones funcionales e histológicas que reproducen características centrales de la NO primaria humana. Las consecuencias de la inyección de LPS en el NOp podrían

dividirse en dos fases: una **fase temprana** (hasta el día 7 post-LPS) caracterizada por alteraciones funcionales patognomónicas de la NO (VEPs y RP) y en el transporte anterógrado, así como aumento en la reactividad de microglía/macrófagos en el NOp, seguida de una **fase tardía** en la que persistieron la reactividad de microglía/macrófagos y las alteraciones funcionales (VEPs, RP), y se evidenciaron cambios en estudios de IRMf y en la respuesta al estímulo *looming*, concomitantemente con gliosis reactiva, desmielinización, pérdida axonal y disminución en el número de CGRs. Esta secuencia de alteraciones difiere del perfil descrito en los modelos autoinmunes de NO (EAE-NO), en los que la desmielinización es un evento primario (Zhu y col., 1999). En este sentido, aunque los modelos de EAE reproducen características de la NO asociada a EM, la inyección de LPS en el NOp podría reproducir la forma primaria de la NO, para la que no se disponía previamente de un modelo experimental validado.

Los VEPs reflejan la actividad de todas las células de la vía visual desde los fotorreceptores hasta la corteza visual y como tales, su registro es considerado una herramienta no invasiva útil para analizar la función del sistema visual, particularmente en pacientes con NO (Halliday y col., 1972; Hood y col., 2000; Kupersmith y col., 1983). Como se demostró en esta tesis, la microinyección de LPS provocó una disminución significativa y persistente en la amplitud de los VEPs, que podría atribuirse a una alteración de la vía visual a nivel post-retiniano, dado que el LPS no afectó el ERG a lo largo del estudio. La amplitud de los VEPs refleja el número de fibras funcionales, mientras que un aumento en la latencia se considera un indicador de desmielinización del NOp (You y col., 2011). El hecho de que alteración de los VEPs fuera evidente ya al día 1 post-LPS (es decir, en forma previa a la pérdida de axones) indica que las alteraciones funcionales preceden a los cambios morfológicos. En la NO, el número de fibras aferentes funcionales está influenciado esencialmente por dos

factores: la severidad de la inflamación y la degeneración axonal (Klistorner y col., 2008; You y col., 2011). En este sentido, la disminución temprana en la amplitud de los VEPs inducida por la inyección de LPS podría reflejar el proceso inflamatorio agudo en el NOp, mientras que la atrofia axonal y la pérdida de CGRs podrían contribuir a la disminución tardía de este parámetro. Llamativamente, no se observaron cambios significativos en las latencias de los componentes de los VEPs incluso 21 días después de la inyección de LPS, período en el que histológicamente se observó desmielinización del NOp. En contraste con estos resultados, se ha descrito un aumento en la latencia del componente N1 en la desmielinización del NOp inducida por la inyección de lisolecitina en ratas (You y col., 2011), así como una mayor latencia de los VEPs en modelos de EAE-NO (Diem y col., 2008; Matsunaga y col., 2012). Las razones de esta discrepancia aún no son claras. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en los modelos de EAE-NO, la desmielinización y la inflamación son ubicuas en el SNC y por lo tanto, es difícil cuantificar la contribución particular de la desmielinización del NOp a la conducción global de la señal (You y col., 2011). Por otro lado, en el modelo inducido por lisolecitina se demostró que la prolongación de la latencia de los VEPs se correlaciona directamente con el tamaño del área de desmielinización en la vía visual (You y col., 2011). Por lo tanto, el tamaño del área desmielinizada en el NOp inyectado con LPS podría no ser suficiente para afectar la integridad de la mielina a lo largo de toda la vía visual.

En roedores, la mayoría de los axones de las CGRs proyectan al CS, al NGL y al NPO contralaterales (Kondo y col., 1993). La inyección de LPS indujo un “déficit” en la conexión entre la retina y estas áreas centrales (demostrado a través del transporte anterógrado de CTB). Se ha descrito un transporte axonal defectuoso en ratones con EAE-NO (Lin y col., 2014) que se atribuyó a la desmielinización y a la lesión axonal del NOp, mientras que en

nuestras condiciones experimentales, la disminución en el transporte anterógrado precedió a esas alteraciones estructurales, lo que avala adicionalmente que en este modelo experimental las alteraciones funcionales preceden a las estructurales. Con el fin de evaluar con mayor profundidad la comunicación retina-CS en la NOE, recientemente se puso a punto, por primera vez, el estudio de *looming* en ratas. Este estudio previamente validado en ratones, permite evaluar una respuesta refleja evocada por un estímulo exclusivamente visual (Yilmaz y Meister, 2013). En especies de presa como los roedores, evitar a los depredadores es clave para la supervivencia e impulsa conductas instintivas como la “congelación (*freezing*)” o “la huida” (Eilam, 2005; Tovote y col., 2015), guiadas por señales visuales que son procesadas en el CS y regulan el comportamiento defensivo. Frente a eventuales depredadores aéreos, sólo la visión proporciona información útil (Shang y col., 2018). En este trabajo de tesis demostramos que, análogamente a lo descrito en ratones, un pequeño disco en movimiento que simula el vuelo de un depredador por encima del animal, es suficiente para inducir una respuesta de *freezing* también en ratas *Wistar*, lo que sugiere que las ratas de laboratorio “toman decisiones” de comportamiento de forma innata, basándose sólo en la información visual (De Franceschi y col., 2016; Shang y col., 2018). La NOE bilateral inducida por LPS indujo un aumento en la latencia al comienzo del *freezing* en comparación con animales intactos, lo que avala una alteración funcional en la comunicación retina-CS en este modelo experimental.

El NPO es el núcleo primario en el circuito neuronal que controla la contracción de la pupila frente a un estímulo luminoso (Gamlin, 2006). Por lo tanto, la disminución significativa en la aferencia del RP inducida por LPS es consistente con la disminución en el transporte anterógrado desde la retina hasta este núcleo. En concordancia con estos resultados, se han descrito respuestas pupilares disminuidas en pacientes con NO y EM (de Seze y col., 2001;

Ellis, 1979; Moro y col., 2007), así como en un modelo de EAE en ratón, que también precedió a las alteraciones estructurales (Shindler y col., 2012). De hecho, además de los VEPs, el RP es probablemente el estudio más importante para el diagnóstico ante la sospecha de NO aguda (Shindler y col., 2012; Toosy y col., 2014).

La inyección de LPS indujo un aumento temprano (ya a las 24 h post-inyección) y persistente en la reactividad de microglía/macrófagos. En este mismo sentido, Herrera y colaboradores (2000) demostraron que la inyección de LPS en el cerebro de rata induce activación de células microgliales a los 2 días post-inyección. Howell y colaboradores (2010) han demostrado que en la EM y la EAE, la alteración de la asociación axón/oligodendrocito está involucrada en el daño axonal y se produce en paralelo con la activación de la microglía. En contraste, los resultados obtenidos indican que la reactividad de microglía/macrófagos (evaluada por aumento en la inmunorreactividad contra Iba-1 y ED1), ocurrió ya en los días 1 y 4 después de la inyección de LPS, respectivamente, es decir, considerablemente antes que las alteraciones de la estructura axón-mielina (evidentes a los 21 días post-inyección), lo que sugiere que la microgliosis y/o la infiltración leucocitaria (como se discutirá más adelante) podrían representar uno de los eventos más tempranos en la NOE inducida por LPS. Se ha demostrado que la respuesta de los astrocitos contribuye a la patología de la EAE (Brambilla y col., 2012); sin embargo, en los NOps inyectados con LPS, la gliosis reactiva (evaluada por inmunorreactividad para GFAP) también fue un evento tardío, que ocurrió concomitantemente con las alteraciones axonales y mielínicas. Dada la simultaneidad de los fenómenos descritos en la escala temporal analizada, aún no resulta posible determinar si las alteraciones macrogliales fueron causa o consecuencia de las alteraciones axonales.

A los 7 días luego de la inyección de LPS, se observó un aumento en el área de sección transversal del NOp, posiblemente como resultado de edema. Fairless y colaboradores (2012)

demonstraron un aumento similar en el tamaño de la sección transversal del NOp inducido por inmunización de ratas *Brown Norway* con MOG. Asimismo, en la región proximal del NOp se observó una disminución en la densidad axonal a los 7 (posiblemente como consecuencia del aumento en el área transversal) y a los 21 días (presumiblemente por la pérdida de axones), en tanto que en la porción distal al sitio de inyección, estas alteraciones fueron evidentes a los 21 días post-inducción de NEO. Estos resultados sugieren que el daño inducido por la microinyección de LPS podría propagarse más allá del sitio de la inyección en ambas direcciones, es decir, hacia la porción distal y hacia la retina. El daño axonal afectó en forma similar a axones de menor y mayor calibre. Esta susceptibilidad en función del calibre axonal no parece generalizable a otras disfunciones visuales, ya que en la retinopatía diabética (Fernandez y col., 2012) y el glaucoma experimental (Belforte y col., 2010) sólo se dañan los axones de mayor calibre aún en etapas avanzadas.

Frecuentemente, el daño axonal resulta en degeneración axonal y la pérdida permanente del cuerpo celular. Se ha sugerido que el déficit visual irreversible inducido por NO se debe a la pérdida de CGRs (Toosy y col., 2014). En la NOE inducida por LPS, el número de CGRs disminuyó aproximadamente un 50%, un porcentaje similar al descrito por otros autores usando diferentes estrategias para inducir NO autoinmune (Fairless y col., 2012; Khan y col., 2014; Maier y col., 2004; Shindler y col., 2006). Estos resultados avalan que la NOE inducida por LPS no es simplemente una afección inflamatoria, sino que también involucra un componente neurodegenerativo. Aunque la muerte de CGRs es un aspecto central de la NO, aún no existe consenso en cuanto a la temporalidad de este evento, tanto en la NO clínica como experimental. Análogamente a lo descrito en este trabajo, un número considerable de evidencias de otros grupos demuestran que la pérdida de CGRs es un evento tardío en la NO experimental (Guan y col., 2006; Horstmann y col., 2013; Quinn y col.,

2011; Shindler y col., 2006). Sin embargo, en ratas *Brown Norway* hembra adultas con EAE se ha demostrado que la pérdida de CGRs es un evento temprano (Meyer y col., 2001), y que la pérdida de CGRs precede el adelgazamiento de la capa de fibras en la retina de pacientes con NO (Huang-Link y col., 2015). El daño del NOP por transección o aplastamiento induce rápidamente una “respuesta de estrés” en las CGRs que finalmente provoca la muerte de las neuronas (Barron y col., 1986; Quigley y col., 1995; You y col., 2012). Por lo tanto, parece probable que el daño axonal sea responsable de la pérdida de CGRs inducida por la inyección de LPS en el NOP. Esta observación está en línea con un trabajo de Guan y colaboradores (2006), en el que se demostró que en un modelo transgénico de NO autoinmune, el número de CGRs en ojos con inflamación aguda del NOP fue significativamente menor en comparación a ojos con inflamación leve a moderada. También a nivel de la retina, se demostró un aumento en la reactividad de microglía/macrófagos más tempranamente que la pérdida de CGRs. Las causas de esta alteración no son claras, pero podría deberse, al menos, a dos alternativas no mutuamente excluyentes: 1) un efecto directo de la microglía/macrófagos del NOP sobre la microglía/macrófagos retiniana, y/o 2) un efecto indirecto en el que la “activación” microglial/macrofágica retiniana responde a un cambio temprano en los axones o cuerpos celulares de la retina, que no fueron evidentes en el ERG y que las herramientas de las que disponemos actualmente no nos permiten evaluar. En este mismo sentido, se han descrito alteraciones retinianas microgliales en estadios muy tempranos luego de una isquemia deletérea (Kambhampati y col., 2015) o de retinopatía diabética (Ibrahim y col., 2011), que preceden a la muerte de CGRs en ambos modelos experimentales.

En condiciones normales, la proteína GFAP sólo se expresa en astrocitos retinianos, pero no en las células de Müller (Sarthy, 2007). Sin embargo, frente a una considerable variedad de

injurias retinianas (Barnett y Osborne, 1995; Fernandez y col., 2009), se induce la expresión de GFAP en este tipo celular. De hecho, la expresión de GFAP en células de Müller es ampliamente reconocido como un indicador molecular de daño retiniano (Pekny y Nilsson, 2005). La inyección de LPS indujo un aumento tardío en los niveles de GFAP en las células de Müller (a los 21 días post-inyección), lo que sugiere que la neuroinflamación del NOp es reconocida como un evento deletéreo también a nivel retiniano.

Recientemente, las características de este modelo experimental despertaron interés en el grupo dirigido por el Dr. Luis Concha, UNAM, México, quien dirige un grupo experto en adquisición de IRMf e imágenes por resonancia magnética sensibles a difusión, y nos propuso realizar una colaboración en pos de analizar este modelo utilizando estas herramientas. Luego de una pasantía de 6 meses en ese laboratorio, adquirimos por resonancia magnética imágenes sensibles a difusión de NOps *ex vivo* de animales intactos o inyectados con LPS a los 21 días post-inyección. Se obtuvieron imágenes de alta resolución de la región peri-quiasmática y de los tractos ópticos, a las que se le aplicó el modelo del tensor (Basser y Pierpaoli, 1994) y se calcularon los FA de los NOps. A los 21 días post-inyección de LPS se observaron valores menores de FA en comparación con nervios intactos. Los resultados obtenidos a través del análisis de las imágenes de difusión son compatibles con los estudios histológicos. Si bien estos primeros resultados fueron obtenidos en un estudio *ex vivo*, esta estrategia experimental podría servir como una nueva técnica de alta sensibilidad para detectar *in vivo* eventos neurodegenerativos tempranos no sólo para la NO, sino también para otros trastornos neuro-oftalmológicos. Por otro lado, se estudió el efecto de la NOE sobre la función de diferentes estructuras centrales involucradas en el procesamiento de la información visual (CS, NGLd, NPO y V1m) por cambios de la señal BOLD en adquisiciones de IRMf. Se observó una tendencia temprana aunque no significativa a los 7

días post-LPS en la activación de estos núcleos visuales, que alcanzó significación estadística a los 21 días post-LPS.

La neuroinflamación es una característica común en los trastornos neurológicos, pero aún es controversial si este evento contribuye directamente al daño neuronal o glial *in vivo* o viceversa (Felts y col., 2005). Por lo tanto, la identificación de los mecanismos que inducen lesión neuronal y muerte celular es un área de investigación relevante que requiere modelos fidedignos. Los resultados discutidos hasta aquí, sugieren que la microinyección de LPS en el NOp podría constituir un nuevo paradigma para identificar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la pérdida de neuronas inducida por inflamación. Si bien este nuevo modelo difiere de la NO inducida por EAE, comparte con ésta la característica de recapitular los componentes inflamatorios, desmielinizantes y neurodegenerativos de la enfermedad.

El desarrollo de este modelo planteó dos obstáculos inicialmente insoslayables; uno, debido al tamaño pequeño del NOp de la rata, y otro, dado a la posible lesión del nervio debida a la inserción de la aguja y la presión local durante la inyección. Sin embargo, después de un entrenamiento exhaustivo, se logró obtener resultados altamente reproducibles a nivel funcional e histológico y se demostró que la inyección *per se* fue inocua, como lo acredita el hecho de que los resultados funcionales e histológicos no difirieron entre NOps intactos e inyectados con vehículo. Aunque se debe tener precaución al extrapolar a humanos los datos obtenidos en roedores, estos resultados sugieren que en la forma primaria de NO, habría una ventana temporal en la que son detectables las alteraciones funcionales (VEPs y RP) en forma previa al daño axonal, mielínico y somático, y durante la cual sería posible iniciar terapias para prevenir la pérdida permanente de axones y CGRs. Por lo tanto, este nuevo

modelo podría allanar el camino para la identificación de estrategias terapéuticas potenciales para el tratamiento de la NO primaria, lo que constituyó el siguiente objetivo de esta tesis.

2. Efecto de la melatonina sobre la NOE

El siguiente objetivo de esta tesis fue analizar el efecto de la melatonina en la NOE. En una serie preliminar de experimentos se intentó una aplicación diaria de melatonina por vía subcutánea, que debió ser descartada por las lesiones dérmicas provocadas luego de inyecciones repetidas, tanto de melatonina como de vehículo. Por esta razón y en base a resultados previos del laboratorio (Belforte y col., 2010; Sande y col., 2008), se optó por la implantación de un *pellet* subcutáneo de melatonina el día previo a la inyección de LPS, que se reemplazó cada 10 días. Este abordaje requirió la incorporación de un grupo experimental adicional, en el que se realizó un procedimiento simulado (sin implantación del *pellet*), que no provocó *per se* ningún cambio funcional o histológico.

Para evaluar el efecto de la melatonina, se optó por esperar 21 días después de la inyección de LPS, con el fin de maximizar el daño funcional e histológico de la vía visual inducido por NOE (como se discutió más arriba) y descartar la posibilidad de una protección transitoria. Los resultados obtenidos indican que la melatonina mejoró la función visual, como lo demuestra la preservación de los VEPs y el RP. Esta protección funcional fue consistente con los resultados histopatológicos (diminución en la reactividad de microglía/macrófagos, y menor astrocitosis, desmielinización y pérdida de axones y CGRs). En estudios previos del laboratorio, se demostró que la melatonina previene la inflamación ocular en hámsteres y gatos inducida por uveítis experimental (Del Sole y col., 2012; Sande y col., 2008) y en perros sometidos a cirugía de cataratas (Sande y col., 2015). Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral avalan adicionalmente las propiedades anti-inflamatorias de la melatonina en la

vía visual, demostrada en este caso a través de la preservación de la función e histología del NOp y el número de CGRs frente al daño inducido por la inflamación del NOp. El glaucoma y la NO son las dos principales neuropatías ópticas (You y col., 2013) y una característica común a ambas es la pérdida de CGRs y el daño axonal. Por lo tanto, estos resultados también son consistentes con el efecto terapéutico de la melatonina frente al daño glaucomatoso experimental (Belforte y col., 2010). El tratamiento con melatonina también preservó el transporte anterógrado desde la retina al CS. Aunque no se detectaron cambios en el área Iba-1(+) en los NOps inyectados con LPS, la melatonina previno el aumento en la inmunorreactividad para ED-1. En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que la melatonina evita el aumento en la reactividad de microglía/macrófagos inducido por una lesión cerebral traumática (Ding y col., 2014) o por LPS en el cerebro de ratas neonatas (Wong y col., 2014). Asimismo, la melatonina previno significativamente la gliosis reactiva en los NOps inyectados con LPS. Se ha descrito un potente efecto de la melatonina sobre la sustancia blanca, que consiste en una mejora en la maduración oligodendroglial y la mielinización (Esposito y Cuzzocrea, 2010). En este mismo sentido, la melatonina previno la presencia de signos de desmielinización del NOp inducida por la inyección de LPS. Cabe aclarar que, desafortunadamente, la puesta a punto de los estudios de resonancia magnética y *looming* se realizó con posterioridad al estudio del efecto de la melatonina en la NOE y por lo tanto, aún no estamos en condiciones de afirmar que los beneficios del tratamiento con melatonina resulten también evidentes a través de estos abordajes experimentales. Asimismo, aunque no fue posible determinar si la protección inducida por melatonina se produjo principalmente en axones o elementos gliales, los resultados obtenidos podrían sugerir que las alteraciones en la comunicación bidireccional entre axones y células gliales inducidas por la NOE pueden ser positivamente afectadas por la melatonina, que también podría beneficiar

a los circuitos neuronales modulando la velocidad de la conductancia axonal. Además, dado que como ya se mencionó, el daño axonal a menudo provoca degeneración axonal y pérdida permanente del cuerpo celular, la preservación del número de CGRs es consistente con la prevención de la pérdida de axones inducida por melatonina. Quedan por establecer los mecanismos involucrados en el beneficio terapéutico de la melatonina. El aumento de señales inflamatorias como TNF- α , COX-2 y NOS-2 ha sido involucrado en la fisiopatología de la EAE-NO (Das y col., 2013). Además, se ha demostrado que el estrés oxidativo induce daño neuronal en la NO autoinmune (Qi y col., 2007). La melatonina previno el aumento en los niveles de NOS-2, COX-2 y TNF- α , lo que podría ser consistente con la reducida activación de microglía/macrófagos, así como en la peroxidación lipídica, que es compatible con su bien conocida actividad antioxidante (revisado por Reiter y col., 2016; 2017). Por lo tanto, parece probable que la melatonina pueda prevenir el daño inducido por NOE a través de sus efectos anti-inflamatorios y/o antioxidantes.

Las estrategias examinadas para el tratamiento de EAE-NO están principalmente dirigidas a regular la respuesta autoinmune mediante el uso de agentes anti-inflamatorios, inmunomoduladores e inmuno-supresores, pero ninguno de ellos tiene claras propiedades neuroprotectoras (Diem y col., 2003). De hecho, la terapia con corticoides, el tratamiento estándar para la NO, sólo puede acelerar la recuperación de la agudeza visual, pero no previene la degeneración de las CGRs, al igual que otros agentes anti-inflamatorios experimentales (por ejemplo, el 17 α -etinil-5-androsteno-3 β , 7 β , 17 β -triol), (Beck y Gal, 2008; Gal y col., 2015; Hickman y col., 2003; Khan y col., 2014). Por otro lado, algunas drogas con propiedades neuroprotectoras (por ejemplo, el resveratrol) carecen de propiedades anti-inflamatorias (Fonseca-Kelly y col., 2012). Dado que la pérdida de CGRs parece ser la causa principal del daño permanente de la función visual en modelos experimentales y

pacientes con NO, una estrategia terapéutica óptima debería requerir la combinación de un tratamiento inmuno-supresor y anti-inflamatorio junto con un agente neuroprotector (Li y col., 2014). Los resultados obtenidos sugieren que la melatonina podría cumplir todos estos requisitos, ya que previene el deterioro visual, las alteraciones estructurales del NOp y la pérdida de axones y CGRs, y disminuye los niveles de señales pro-inflamatorias y el daño oxidativo inducidos por NOE. A pesar del demostrado efecto preventivo de la melatonina en la NOE, la relevancia traslacional de estos resultados es limitada, dado que en estos experimentos la melatonina se administró antes de la inyección de LPS. Sin embargo, un tratamiento tardío con melatonina (iniciado 4 días post-LPS) redujo significativamente la disfunción visual (VEPs y RP) inducida por NOE, lo que respalda que la melatonina no sólo previene, sino que también reduce la progresión del daño del NOp. Cabe señalar que cuando la administración de melatonina se inició más tardíamente (es decir, a los 7 días post-LPS), no se evidenció protección del RP. Estos resultados sugieren la existencia de un período crítico (aparentemente entre los días 4 y 7 post-LPS) durante el cual, la melatonina (y eventualmente otros tratamientos, como se discutirá más adelante) es capaz de inducir protección de la función visual. En suma, estos resultados demuestran la capacidad de la melatonina para preservar significativamente las funciones visuales en la NOE, con reducción de la inflamación, la astrocitosis, la desmielinización, y la pérdida de axones y de CGRs. La neuroprotección inducida por melatonina podría involucrar efectos anti-inflamatorios, antioxidantes u otros mecanismos adicionales aún no elucidados. A través de alguno o de la suma de estos mecanismos, la melatonina, un compuesto muy seguro para uso humano incluso en altas dosis (Andersen y col., 2016), podría representar una terapia potencial prometedora para el tratamiento de la NO primaria.

3. Efecto de la exposición al ambiente enriquecido sobre la NEO

El siguiente objetivo fue examinar el efecto de la exposición a AE, una estimulación no invasiva y biológicamente significativa de las vías sensoriales y motoras, frente al daño inducido por NOE. Análogamente a lo descrito para el estudio con melatonina, para maximizar el daño de la vía visual y descartar la posibilidad de una protección transitoria, en una primera serie de experimentos, los animales se albergaron en AE durante 21 días después de la inyección de LPS. Los resultados obtenidos indican que la exposición a AE previno las consecuencias de la neuroinflamación incluso en un componente del SNC que originalmente fue considerado “menos plástico” que la corteza cerebral o el hipocampo (los sitios canónicos de plasticidad dependiente de la experiencia), como el NOP de ratas adultas. En estas condiciones experimentales, la exposición a AE previno completamente las alteraciones de los VEPs y el RP, y preservó el transporte anterógrado desde la retina al CS. Concomitantemente con la protección funcional, el AE protegió el NOP frente a las alteraciones histopatológicas inducidas por NOE. La fosforilación de NFH es un mecanismo de relevancia en la formación de puentes cruzados (*cross-bridges*) entre neurofilamentos y está involucrada en el mantenimiento de la morfología neuronal y el transporte axonal (Nixon y Sihag, 1991); por lo tanto, el efecto del AE sobre la inmunorreactividad para pNFH parece ser consistente con la preservación del transporte anterógrado retiniano. Aunque los efectos beneficiosos de AE se han centrado principalmente en cambios en la morfología neuronal, plasticidad sináptica y neurogénesis, se ha demostrado que el AE también induce cambios en componentes no neuronales del SNC como microglía, astrocitos y oligodendrocitos (Cho y col., 2016; Garofalo y col., 2015; 2017; Rahati y col., 2016; Zheng y col., 2017). En esta línea, se ha demostrado que el AE reduce la reactividad microglial y astrocitaria, así como la desmielinización del NOP en ratas diabéticas (Dorfman y col., 2015) y disminuye la microgliosis en el cerebro de ratones sometidos a encefalitis viral (de Sousa y col., 2011).

Además, el AE revierte la gliosis reactiva en el giro dentado del hipocampo en un modelo experimental de Alzheimer en ratones (Rodríguez y col., 2013) e induce un aumento en el número de axones mielinizados en la sustancia blanca de ratas viejas (Yang y col., 2013). En los NOps inyectados con LPS, la exposición a AE evitó el aumento en el área Iba-1(+) y ED1(+), lo que sugiere una reducción en la reactividad de la microglía y/o macrófagos, y/o cambios en su fenotipo. Además, el AE evitó la astrogliosis y la desmielinización inducida por microinyección de LPS en el NOP. Al igual que con la melatonina, también en este caso, es posible postular que la comunicación axón-glía, así como la velocidad de conducción del impulso nervioso podrían estar protegidas en animales con NOE expuestos a AE. También en este caso, se demostró que la exposición a AE previno significativamente la pérdida de CGRs inducida por la microinyección de LPS en el NOP, posiblemente a través de la protección de los axones del NOP. Asimismo, la exposición a AE previno el aumento en los niveles proteicos de NOS-2 y COX-2, los niveles de ARNm de Il-1b y TNF- α y la peroxidación lipídica.

Múltiples evidencias sugieren sólidamente que el BDNF es un mediador clave en los efectos beneficiosos en el cerebro inducidos por exposición a AE (revisado por Landi y col., 2007; Sale y col., 2014). En esta línea, los resultados obtenidos indican que el AE indujo un aumento significativo en los niveles de BDNF en NOps inyectados con vehículo o LPS. Con algunas excepciones (Campos y col., 2016; Nowacka-Chmielewska y col., 2017), se ha demostrado que la inyección sistémica de LPS induce una disminución en los niveles proteicos de BDNF en roedores (Guan y Fang, 2006; McGuinness y col., 2016; Tanaka y col., 2006), en tanto que en nuestras condiciones experimentales, la inyección de LPS no afectó a este parámetro en el NOP de animales albergados en AS. Al presente, no se dispone de ninguna explicación para esta discrepancia; sin embargo, no es posible descartar la

participación de efectos dependientes del tejido, la dosis o el intervalo post-inyección. En todo caso, estos resultados constituyen la primera demostración experimental de que el AE induce un aumento en los niveles de BDNF en el NOp de ratas adultas. Por lo tanto, aun sin descartar la participación de mecanismos adicionales, este conjunto de resultados indica que la exposición a AE se comportó como una terapia anti-inflamatoria, antioxidante y pro-BDNF en el contexto de la NOE.

Como ya se mencionó, una estrategia terapéutica óptima para la NO debería incluir una combinación de compuestos anti-inflamatorios con agentes neuroprotectores, requisitos que, en función de los resultados obtenidos, podrían lograrse a través de la exposición a AE. Otros candidatos analizados como posibles estrategias terapéuticas para la NOE, como eritropoyetina (Sättler y col., 2004), acetato de galatimer (Maier y col., 2006) o reducción del estrés oxidativo (Qi y col., 2007) sólo son efectivos cuando se administran antes o simultáneamente con la inducción de NO. Dado que los pacientes con NO no presentan síntomas hasta el inicio de la inflamación, el beneficio terapéutico de estas estrategias puede tener aplicaciones clínicas limitadas. En este contexto, se analizó el efecto de la exposición a AE a los 4 días post-LPS, intervalo en el cual las alteraciones funcionales inducidas por NOE ya son evidentes. Esta exposición retrasada a AE redujo significativamente el efecto de la NOE sobre el RP, lo que sugiere que análogamente a lo descrito para el efecto de la melatonina, el AE no sólo previno, sino que también redujo la progresión de la disfunción visual. Con sólo 3 días de exposición a AE (es decir, entre el día 4 y 7 post-LPS), el RP ya resultó protegido. Cabe remarcar que, tal como sucedió con el tratamiento con melatonina, la exposición a AE fue ineficaz cuando se inició a los 7 días post-LPS, lo que refuerza la idea de la existencia de un período crítico (entre 4 y 7 días post-LPS) durante el cual es posible una intervención terapéutica exitosa. A favor de esta hipótesis, un tratamiento diario con ANA-12

(antagonista del receptor TrkB) durante este período, abolió por completo el efecto protector de AE sobre el RP evaluado a los 21 post-LPS. Estos resultados, además de avalar adicionalmente el período crítico, sugieren que la vía BDNF/TrkB podría jugar un papel clave en el efecto protector del AE. En concordancia, se ha demostrado que el bloqueo de receptores TrkB evita el efecto beneficioso de la exposición a AE sobre el deterioro de la memoria inducida por hipoxia hipobárica (Jain y col., 2013), y que el ANA-12 bloquea los efectos del AE en la disfunción cognitiva post-operatoria (Fan y col., 2016). Aún no se dispone de datos adicionales que permitan elucidar los eventos particulares que se desarrollan en este período crítico en términos terapéuticos (tanto para la melatonina como para el AE), aspecto que se analizará en un futuro próximo. También queda por establecer el efecto de la exposición a AE en cuanto a la resonancia magnética y el *looming* (herramientas que como ya se mencionó, fueron puestas a punto recientemente). La determinación de los niveles de BDNF en el paradigma del AE se fundamentó en múltiples antecedentes ya mencionados. De hecho, aunque no analizamos el efecto de la melatonina sobre los niveles de esta neurotrofina en el NOP (otro de los aspectos que se analizarán en el futuro), se ha demostrado que la melatonina aumenta los niveles hipocámpales de BDNF en un modelo de Alzheimer en ratas (Rudnitskaya y col., 2015), y los niveles séricos de BDNF en ratas neonatas (Luo y col., 2017).

El ejercicio físico voluntario protege a la retina en un modelo de degeneración retiniana hereditaria en ratón (Hanif y col., 2015). El hecho de que en nuestras condiciones experimentales el bloqueo de las ruedas de ejercicio no afectara el efecto beneficioso del AE sobre las funciones visuales, no descarta por completo la participación de la actividad física que, a pesar de esta manipulación, podría estar aumentada debido al tamaño mayor de las jaulas de AE respecto a las jaulas de AS. Como ya se mencionó, el AE involucra un conjunto

de estímulos multisensoriales, motores y sociales. Al presente, se desconocen cuál/es de esto/s componente/s es/son responsable/s de la protección de la vía visual frente a la NOE. La evidencia sugiere que al menos en términos del cerebro, los mayores beneficios se logran a partir de efectos aditivos o sinérgicos del repertorio completo del AE (Faherty y col., 2003; Jurgens y Johnson, 2012; Sozda, 2010). Sin embargo, la elucidación de la contribución de los componentes particulares del AE en el beneficio terapéutico podría permitir la implementación de intervenciones más específicas destinadas a proteger el sistema visual frente a la NOE. Una aproximación “intuitiva” podría sugerir que la reparación de circuitos neurales en sistemas sensoriales específicos depende de *inputs* de la misma modalidad sensorial. En este contexto, con el objetivo de estudiar la participación del estímulo visual, se realizaron inyecciones bilaterales de vehículo o LPS y se expuso a los animales a AE luego de las inyecciones. En estas condiciones, el AE no previno el daño funcional inducido por NOE. Estos resultados sugieren que para una protección efectiva, es necesario la funcionalidad de al menos una vía visual y que el estímulo visual podría constituir un componente central en el repertorio del AE, al menos para la protección frente a la NOE.

Un objetivo fundamental de las Neurociencias es desarrollar estrategias capaces de promover la plasticidad del SNC en la edad adulta, particularmente cuando la recuperación de la lesión es pobre y la rehabilitación funcional es difícil. El AE ha sido ampliamente utilizado en estudios experimentales con el fin de inducir plasticidad y neuroprotección. Una de las críticas más frecuentes al paradigma de AE es que éste podría ser meramente el resultado de una forma particular de criar a los animales en un entorno semi-natural, más cercano a la vida silvestre, y por ende, sus efectos beneficiosos podrían no ser mejoras reales en la plasticidad y función cerebral, sino la restauración a una condición fisiológica a partir del déficit causado por el ambiente “empobrecido” que es impuesto a los animales de laboratorio. Sin embargo,

diversas líneas de evidencia desafían sólidamente esta objeción: 1) como señala M.R. Rosenzweig (el “pionero” del AE), para animales de laboratorio endogámicamente criados no resulta claro cuál es exactamente su entorno natural, ya que los roedores de laboratorio se han mantenido durante muchas generaciones en recintos artificiales, lo que podría redundar en diferencias en su genotipo y fenotipo respecto a las poblaciones silvestres (Rosenzweig, 2007); 2) los animales albergados en AE son totalmente libres de elegir cuándo y cuánto experimentar el enriquecimiento ambiental, sin las contingencias y los riesgos típicamente asociados a la vida silvestre (Sale y col., 2009; 2014), es decir, mientras la vida silvestre de los animales se encuentra regida, al menos en parte, por la “necesidad”, las condiciones de vida provistas por el AE se relacionan con la “novedad”, la “curiosidad” y el “juego” (Sale y col., 2009; 2014); y 3) se ha demostrado que el aumento de la calidad e intensidad de estímulos ambientales tiene efectos beneficiosos incluso en humanos (Cioni y col., 2016; Janssen y col., 2010) que normalmente no experimentan condiciones de vida “empobrecidas”. En este sentido, se demostró que el masaje multisensorial precoz acelera la maduración de la actividad electroencefalográfica, los VEPs y la agudeza visual en lactantes pre-término (Guzzetta y col., 2009) y estimula la maduración del sistema visual en niños con síndrome de Down (Purpura y col., 2014). Asimismo, diversas evidencias sugieren que la estimulación ambiental puede proveer resistencia al envejecimiento cognitivo en humanos (Cassarino y col., 2016). Sin dudas, la traslación del AE desde el laboratorio a humanos no es inmediata, ya que los seres humanos vivimos en ambientes complejos y habitualmente estamos expuestos a la novedad. Al presente, aunque las evidencias obtenidas sugieren una participación relevante del componente visual, continuamos realizando experimentos destinados a desentrañar más exhaustivamente la contribución de los componentes motor, sensorial, cognitivo o social del AE responsables de la protección de la vía visual frente a los

efectos deletéreos de la NOE. En todo caso, la mayoría de estos componentes puede ser sobre-estimulada en humanos. Por lo tanto, en el caso de identificar el/los componente/s que es/son responsable/s de los efectos beneficiosos del AE, se podría sugerir a pacientes con NO, cambios en varios aspectos del estilo de vida, como el ejercicio físico regular y/o la interacción social, a menudo sacrificados en pacientes con pérdida visual. De esta manera, la preservación de la función visual a través de un mayor uso de los sistemas sensoriales (particularmente visual), motores, y/o la interacción social podría ser una nueva estrategia no invasiva para promover la recuperación del sistema visual frente a la NO. En este contexto, los resultados obtenidos en este trabajo podrían formar parte del marco teórico necesario para alentar la exploración de estrategias de AE en humanos como una herramienta para proteger la visión frente a la inflamación del NOp, en vista de una cura definitiva. La utilización de paradigmas de AE podría dar inicio a una nueva era de “farmacoterapia endógena”, en la que la activación de vías moleculares clave en la plasticidad neuronal no se induzca a través de la administración de principios activos exógenos, sino mediante la utilización de estrategias no invasivas de estímulo ambiental, con el objeto de estimular la capacidad cerebral innata de reparación espontánea (Sale y col., 2014). En este sentido, los resultados de este trabajo constituyen sólo los primeros pasos de un largo camino a recorrer para cumplimentar este objetivo, lo que eventualmente podría redundar en la posibilidad de disponer de nuevas y mejores herramientas frente a las enormes consecuencias para la calidad de vida que provoca la ceguera.

4. Estudio de la integridad de la barrera hematoencefálica y el reclutamiento de células periféricas en la NEO

En este trabajo se ha demostrado que el reclutamiento de monocitos en el NOp desempeña un rol crítico en el daño de la vía visual inducida por NOE. La inyección de LPS indujo la pérdida de la integridad de la BHE y un aumento en la celularidad ya evidente a las 6 h post-inyección. En el SNC, la vigilancia inmunitaria innata está coordinada principalmente por la microglía. Estas células mieloides residentes contribuyen a “organizar” la respuesta inmune frente a infecciones cerebrales (Prinz y Priller, 2017). En la NEO inducida por LPS, el aumento en la inmunorreactividad para Iba-1 comenzó a las 24 (pero no a las 6) h y persistió hasta el día 21 post-inyección. La proteína Iba-1 se expresa en microglía y macrófagos derivados de monocitos que son morfológicamente indistinguibles entre sí. Un abordaje no genético comúnmente utilizado para discernir la microglía de las células derivadas de monocitos reclutadas durante la enfermedad consiste en generar quimeras a partir de animales cuyas células circulantes GFP(+) provienen de la médula ósea de animales transgénicos (*Wistar-TgN* (CAG-GFP) 184ys). Los resultados obtenidos indican la presencia de neutrófilos GFP(+) y monocitos GFP(+) a las 24 h post-LPS, intervalo en cual también se demostró un aumento en el número de células $CD11b^+CD45^{low}$ (microglía) y $CD11b^+CD45^{high}$ (macrófagos) mediante estudios de citometría de flujo en ratas ^{WT}*Wistar*. En conjunto, estos resultados sugieren que a las 6 h después de la inyección, el aumento en la celularidad podría atribuirse a la infiltración de neutrófilos, mientras que a las 24 h post-LPS, una contribución mixta de neutrófilos, macrófagos derivados de monocitos y proliferación de células microgliales podría aumentar el número de células en el NOp. En la médula espinal de ratones con EAE, los neutrófilos se encuentran entre las primeras células inmunes reclutadas en el SNC (Aubé y col., 2014) y los macrófagos derivados de monocitos constituyen la mayor proporción de células identificadas en infiltrados inflamatorios en el NOp durante todas las etapas de EAE-ON (Hu y col., 1998). Además, se ha demostrado que

el LPS induce un reclutamiento temprano de neutrófilos en el SNC (Park y col., 2015) y que la depleción de monocitos de sangre periférica atenúa la neuroinflamación inducida por inyección de LPS (Liu y col., 2017). En contraste con nuestros resultados, Brown y Sawchenko (2007) demostraron que en la EAE-ON, la activación de las células microgliales ocurre mucho antes que la infiltración de leucocitos, lo que sugiere que el curso de la NOE puede variar dependiendo del mecanismo de inducción de la enfermedad. La EAE-ON, que involucra un proceso de desmielinización inmuno-mediada, difiere de la NO inducida por LPS en varios aspectos. Por lo tanto, no parece sorprendente encontrar también diferencias entre estos modelos experimentales con respecto a los eventos involucrados en el curso de la enfermedad experimental.

La hipótesis de que el reclutamiento de células periféricas inducido por LPS contribuyó críticamente al daño de la vía visual, es avalada por el hecho de que una dosis única de irradiación gamma antes de la microinyección de LPS, que disminuyó significativamente el porcentaje de monocitos, neutrófilos y linfocitos periféricos, previno en forma robusta el efecto de la NOE sobre el RP y el número de CGRs. Se ha demostrado que la depleción de neutrófilos previene la fuga vascular en la médula espinal de ratones con EAE (Aubé y col., 2014). En contraste, en nuestras condiciones experimentales, el LPS provocó un aumento en la permeabilidad de la BHE incluso en animales irradiados, lo que indica que la pérdida de integridad de la BHE *per se* no fue suficiente para inducir daño visual, y que la interrupción temprana de la BHE a nivel de NOp inducida por el LPS no dependió de la infiltración de células periféricas, sino probablemente de procesos locales. Los factores responsables de la pérdida de integridad de la BHE en NOps inyectados con LPS aún no se han establecido y serán objeto de estudios futuros. La participación de la pérdida de integridad de la BHE y el reclutamiento de leucocitos en el daño del NOp también se demostró a través de una única

microinyección de rtPA en el NOp. El rtPA es una serina proteasa bien conocida por su capacidad de promover fibrinólisis. Independientemente de la trombólisis, el rtPA puede degradar la BHE, probablemente a través de un aumento en la actividad de metaloproteinasas de la matriz extracelular, sin degradación de la membrana basal vascular, y como tal, el rtPA ha sido utilizado para inducir una ruptura “estéril” de la BHE y la subsecuente infiltración de células periféricas (Dong y col., 2016; Fredriksson y col., 2017; Reijerkerk y col., 2008; Yepes y col., 2003). Consistentemente con el efecto del LPS, la microinyección de rtPA en el NOp indujo una disminución significativa del RP y el número de CGRs a los 21 días post-inyección. Si bien se ha demostrado que el rtPA activa la microglía (Siao y col., 2003; Villarán y col., 2009) e induce degeneración neuronal excitotóxica (Baron y col., 2010; Tsirka y col., 1995; Villarán y col., 2009), los resultados obtenidos respaldan que el efecto del rtPA en la vía visual podría ser atribuible no sólo a la alteración de la BHE, sino también a la infiltración de leucocitos, como lo demuestra el hecho de que la irradiación previno significativamente el efecto del rtPA sobre el RP y el número de CGRs a los 21 días post-inyección.

El glaucoma y la NO son las dos principales causas de degeneración del NOp (You y col., 2013), y como ya se mencionó, una característica común de estas neuropatías ópticas es la pérdida de CGRs y el daño axonal. Se ha demostrado que la radiación, al prevenir la entrada de monocitos en el ojo, protege del daño glaucomatoso (Howell y col., 2012), lo que sugiere otra característica en común para estas neuropatías.

La quimiocina CCL2 (anteriormente llamada proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)) es un mediador crítico de la inflamación en varias enfermedades neuroinflamatorias, tales como la EM, la EAE (Mahad y col., 2003) y la enfermedad de Alzheimer (Hickman y El Khoury, 2010) entre muchas otras. Aunque su preciso mecanismo de acción aún no se ha

elucidado, se ha demostrado que CCL2 estimula la migración de monocitos al SNC (Babcock y col., 2003; Fuentes y col., 1995; Ge y col., 2012; Yadav y col., 2010) e induce proliferación de células microgliales (Zhang y col., 2018). El LPS aumenta la expresión de CCL2 en cerebro (Chang y col., 2017; Davis y col., 2017), hipotálamo (Le Thuc y col., 2016) y retina de rata (Van Hove y col., 2016), así como la secreción de CCL2 en neutrófilos (Arruda-Silva y col., 2017). En esta línea, se observó un aumento en la inmunorreactividad para CCL2 co-localizada con neutrófilos, pero no con células Iba-1(+) o astrocitos a las 6 h post-LPS, en tanto que a las 24 h, resultó evidente la co-localización de CCL2 con células Iba-1(+) (microglía/macrófagos).

Se ha demostrado que el *knockout* para CCL2 o su eliminación mediante el uso de anticuerpos específicos disminuyen la inducción y la progresión de la EAE al reducir la infiltración de monocitos en la médula espinal (Fife y col., 2000; Huang y col., 2001), y que el receptor de CCL2, CCR2, que se expresa en un subconjunto de monocitos inflamatorios reclutados a sitios de inflamación, desempeña un papel clave en modelos animales de infección y aterosclerosis (Geissmann y col., 2003; Serbina y col., 2006; Tacke y col., 2007). Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que el bloqueo de la expresión de CCL2 podría proteger la vía visual del daño inducido por NOE. El bindarit es un derivado indazólico sintético pequeño que inhibe preferentemente la transcripción de la subfamilia de quimiocinas CC quimioattractantes de monocitos (Mirolo y col., 2008). A través de su capacidad para interferir con el reclutamiento de monocitos, el bindarit ha demostrado eficacia terapéutica en una amplia gama de trastornos inflamatorios, autoinmunes y vasculares experimentales (Bhatia y col., 2005; Grassia y col., 2009; Guglielmotti y col., 1998; 2002; Lin y col., 2009). El bindarit bloquea la expresión de CCL2 inducida por LPS en el cerebro y la médula espinal (Ge y col., 2012). Como se muestra en este trabajo, una dosis

única de bindarit co-inyectada con LPS, que disminuyó la inducción en la expresión de CCL2 a las 6 h post-inyección, redujo las consecuencias funcionales (RP) y estructurales (número de CGRs) de la NOE a los 21 días. Estos resultados sugieren que CCL2 desempeña un papel clave en el daño del NOp. Sin embargo, dado que el bindarit también bloquea la expresión de CCL7 y CCL8 (Mirolo y col., 2008), no se puede descartar formalmente la participación de estas últimas en el daño inducido por NOE.

Un tratamiento relativamente temprano con etopósido o cloruro de gadolinio, que redujo el porcentaje de monocitos periféricos hasta 7 días después de la inyección, también protegió el RP y el número de CGRs del daño inducido por el NOE a los 21 días post-LPS. Además, una correlación inversa entre el RP en el día 7 post-LPS y el porcentaje de monocitos (pero no de linfocitos o neutrófilos) periféricos en animales irradiados o tratados con etopósido o cloruro de gadolinio, avala adicionalmente un papel clave de este tipo celular en las alteraciones de la vía visual inducidas por NOE. Actualmente, no disponemos de ninguna explicación para el aumento en el porcentaje de neutrófilos inducido por etopósido y cloruro de gadolinio a los 21 días. Sin embargo, no se puede descartar un mecanismo compensatorio que se haga efectivo 2 semanas después de suspender estos tratamientos. En conjunto, estos resultados sugieren la siguiente secuencia de eventos en etapas tempranas de NO inducida por LPS: disrupción de la BHE, reclutamiento de neutrófilos, aumento de CCL2 en neutrófilos (posteriormente en microglía/macrófagos) y en consecuencia, reclutamiento de monocitos, que parecen ser actores clave en el daño visual, como se demostró en este trabajo a través de cuatro estrategias experimentales diferentes (irradiación, y tratamientos con bindarit, etopósido o cloruro de gadolinio). Aunque los eventos que ocurren antes y después de estas etapas deben examinarse en detalle, estos resultados apoyan el paradigma de que la NO primaria es desencadenada por eventos inflamatorios asociados con una infiltración temprana

de monocitos. En caso de ser correcta esta hipótesis, la manipulación de la expresión de CCL2 u otras estrategias destinadas a reducir el reclutamiento de monocitos en el NOp podrían resultar efectivas contra la pérdida visual inducida por NO primaria.

Reveses y victorias de esta tesis

A lo largo de esta tesis hemos logrado cumplimentar considerablemente los objetivos que nos propusimos en su inicio. En este sentido, desarrollamos un nuevo modelo experimental cuyas ventajas ya han sido discutidas, y hemos demostrado la efectividad de dos estrategias, diferentes en su esencia, que mostraron una efectividad comparable para el tratamiento de la NOE y que comparten la característica común de carecer de efectos adversos y ser mínimamente (la melatonina) o no invasivos (el AE). Asimismo, hemos obtenido resultados novedosos respecto a la contribución del componente periférico en la NOE, que podrían ser relevantes en el contexto de otros procesos neuroinflamatorios, incluso más allá de la neuritis óptica.

La finalización de una tesis doctoral ofrece la oportunidad única de analizar la tarea desarrollada a lo largo de mucho tiempo y es precisamente en esta instancia, donde salen a la luz múltiples aspectos que hubiéramos debido analizar y no lo hicimos, en gran parte por la secuencia temporal de los experimentos y por la disponibilidad limitada de recursos y de tiempo. En este sentido, han quedado abiertos diversos interrogantes, tales como el efecto de la melatonina y el AE sobre la BHE y la infiltración de monocitos, el efecto de la melatonina sobre los niveles de BDNF y los eventos moleculares que ocurren durante el período crítico, entre tantos otros. Quizás estas “deudas pendientes” sean un revés, pero también una victoria de este trabajo, que además de habernos permitido obtener muchas respuestas, ha tenido la

gran ventaja adicional de generar nuevas preguntas, como corresponde a todo trabajo que se precie de transcurrir el camino de “La Ciencia”.

Epílogo

Existen muchas formas de clasificar a los habitantes del mundo (razones etarias, religiosas, económicas, etc.). Solicito amablemente al lector que nos conceda la licencia de una clasificación no canónica, que nos permite dividir a todos los individuos en un grupo “A” (aquellos para quienes “el amor es ciego” y “lo esencial es invisible a los ojos”) y un grupo “B” (aquellos para los que “la comida entra por los ojos” y “una imagen vale más que mil palabras”). Considerando la larga trayectoria del laboratorio en general y este trabajo de tesis en particular, resulta casi innecesario expresar mi ferviente pertenencia al grupo “B”. En todo caso, a lo largo de esta tesis he intentado proveer a mi grupo “B” de una herramienta fundamental para transitar por la vida, que es la función visual, sobre todo para aquellos que padecen por no tenerla y particularmente a los pacientes con neuritis óptica. Quizás con el tiempo, junto a cocineros, fotógrafos y pintores (entre muchos otros), logremos convencer a los del grupo “A” de que, parafraseando al poeta español Ramón de Campoamor: *“Y es que en este mundo traidor, no hay verdad ni hay mentira: todo es según el color del cristal con que se mira”*.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:41-53.

Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*. 2013;339:156-161.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007a;100:158-173.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007b;100:174-190.

Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci*. 2011;34:76-87.

Alvarado JC, Stanford TR, Rowland BA, Vaughan JW, Stein BE. Multisensory integration in the superior colliculus requires synergy among corticocollicular inputs. *J Neurosci*. 2009;29:6580-6592.

Andersen LP, Gögenur I, Rosenberg J, Reiter RJ. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig*. 2016;36:169-175.

Andriezen WL. The neuroglia elements in the human brain. *Br Med J*. 1893;2:227-230.

Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011;21:193-215.

Arruda-Silva F, Bianchetto-Aguilera F, Gasperini S, Polletti S, Cosentino E, Tamassia N, Cassatella MA. Human Neutrophils Produce CCL23 in Response to Various TLR-Agonists and TNF α . *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:176.

Attwell D, Buchan AM, Chrapak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*. 2010;468:232-243.

Aubé B, Lévesque SA, Paré A, Chamma É, Kébir H, Gorina R, Lécuyer MA, Alvarez JI, De Koninck Y, Engelhardt B, Prat A, Côté D, Lacroix S. Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. *J Immunol*. 2014;193:2438-2454.

Axelrod J. The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*. 1974;184:1341-1348.

- Ayuso T, Aliseda D, Ajuria I, Zandío B, Mayor S, Navarro MC. Inflammatory optic neuritis. *Anales Sis San Navarra*. 2009;32:2.
- Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci*. 2003;23:7922-7930.
- Baden T, Berens P, Franke K, Román Rosón M, Bethge M, Euler T. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*. 2016;529:345-350.
- Baker GE. Prechiasmatic reordering of fibre diameter classes in the retinofugal pathway of the ferret. *Eur J Neurosci*. 1990;2:24-33.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;1:549-553.
- Barnett NL, Osborne NN. Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage. *Exp Eye Res*. 1995;61:83-90.
- Baron A, Montagne A, Cassé F, Launay S, Maubert E, Ali C, Vivien D. NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ*. 2010;17:860-871.
- Barrett GL. The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*. 2000;61:205-229.
- Barron KD, Dentinger MP, Krohel G, Easton SK., Mankes, R. Qualitative and quantitative ultrastructural observations on retinal ganglion cell layer of rat after intraorbital optic nerve crush. *J. Neurocytol*. 1986;15:345-362.
- Bartoletti A, Medini P, Berardi N, Maffei L. Environmental enrichment prevents effects of dark-rearing in the rat visual cortex. *Nat Neurosci*. 2004;7:215-216.
- Basser PJ, Pierpaoli C. Microstructural and physiological features of tissues elucidated by quantitative-diffusion-tensor MRI. *J Magn Reson B*. 1996;111:209-219.
- Beck RW, Cleary PA, Anderson MM, Keltner JL, Shults WT, Kaufman DI, Buckley EG, Corbett JJ, Kupersmith M., Miller NR, Savino PJ, Guy JR, Trobe JD, McCrary JA, Smith CH, Chrousos GA, Thompson HS, Katz BJ, Brodsky MC, Goodwin JA, Atwell CW, and the Optic Neuritis Study Group. A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. *N Engl J Med*. 1992;326:581-588.
- Beck RW, Gal RL. Treatment of acute optic neuritis: a summary of findings from the optic neuritis treatment trial. *Arch Ophthalmol*. 2008;126:994-995.

Belforte NA, Moreno MC, de Zavalía N, Sande PH, Chianelli MS, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *Journal of Pineal Research*. 2010;48:353- 364.

Belforte NA, Sande PH, de Zavalía N, Fernandez DC, Silberman DM, Chianelli MS, Rosenstein RE. Ischemic tolerance protects the rat retina from glaucomatous damage. *PLoS One*. 2011;6:e23763.

Benevento LA, Rezak M, Santos-Anderson. An autoradiographic study of the projections of the pretectum in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*): evidence for sensorimotor links to the thalamus and oculomotor nuclei. *Brain Res*. 1977;127:197-218.

Bennett EL, Diamond MC, Krech D, Rosenzweig MR. Chemical and anatomical plasticity of brain. 1964. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 1996;8:459-470.

Bennett EL, Krech D, Rosenzweig MR. Reliability and regional specificity of cerebral effects of environmental complexity and training. *J Comp Physiol Psychol*. 1964;57:440-441.

Bennett MR, Lagopoulos J. Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. *Prog Neurobiol*. 2014;112:80-99.

Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. Critical periods during sensory development. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10:138-145.

Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295:1070-1073.

Bettelli E, Pagany M, Weiner, H., Linington, C., Sobel, R., Kuchroo, V., Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med*. 2003;197:1073-1081.

Betz AL, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science*. 1978;202:225-227.

Betz AL, Goldstein GW. The basis for active transport at the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol*. 1980;131:5-16.

Bhatia M, Ramath RD, Chevali L, Guglielmotti A. Treatment with bindarit, ablocker of MCP-1 synthesis, protects mice against acute pancreatitis. *Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G1259-G1265.

Biesmans S, Meert TF, Bouwknecht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R. Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:271359.

Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004;22:123-131.

Bondi CO, Klitsch KC, Leary JB, Kline AE. Environmental enrichment as a viable neurorehabilitation strategy for experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014;31:873-888.

Bourdiol F, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Scatton B. Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res*. 1991;543:194-200.

Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia*. 2003;43:281-291.

Boycott BB, Wassle H. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol (Lond)*. 1974;240: 397-419.

Brambilla R, Dvorianchikova G, Barakat D, Ivanov D, Bethea JR, Shestopalov VI. Transgenic inhibition of astroglial NF- κ B protects from optic nerve damage and retinal ganglion cell loss in experimental optic neuritis. *J. Neuroinflammation*. 2012;9:213.

Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, Klug C, Huginin M, Yasuda K, Teng M, Saper CB. Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:11393-11397.

Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*. 1969;40:648-677.

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25:397-424.

Brown DA, Sawchenko PE. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol*. 2007;502:236-260.

Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2002;61:1013-1021.

Bubenik GA, Brown GM, Uhler I, Grota LJ. Immunohistological localization of N-acetylindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Res*. 1974 6;81:233-242.

- Bubenik GA, Purtil RA, Brown GM, Grota LJ. Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Exp Eye Res.* 1978;27:323-333.
- Campos AC, Rocha NP, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM, Teixeira AL. Absence of gut microbiota influences lipopolysaccharide-induced behavioral changes in mice. *Behav Brain Res.* 2016;312:186-194.
- Cardinali DP, Rosner JM. Retinal localization of the hydroxyindole-O-methyl transferase (HIOMT) in the rat. *Endocrinology.* 1971;89:301-303.
- Carpentier PA, Begolka WS, Olson JK, Elhofy A, Karpus WJ, Miller SD. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia.* 2005;49:360-374.
- Cassarino M, O'Sullivan V, Kenny RA, Setti A. Environment and cognitive aging: A cross-sectional study of place of residence and cognitive performance in the Irish longitudinal study on aging. *Neuropsychology.* 2016;30:543-557.
- Cassone VM, Warren WS, Brooks DS, Lu J. Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *J Biol Rhythms.* 1993;8 Suppl:S73-81.
- Cazorla M, Prémont J, Mann A, Girard N, Kellendonk C, Rognan D. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:1846-1857.
- Chang SL, Huang W, Mao X, Sarkar S. NLRP12 Inflammasome Expression in the Rat Brain in Response to LPS during Morphine Tolerance. *Brain Sci.* 2017;7. pii: E14.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation.* 2014;11:98.
- Cho SR, Suh H, Yu JH, Kim HH, Seo JH, Seo CH. Astroglial Activation by an Enriched Environment after Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Enhances Angiogenesis after Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Int J Mol Sci.* 2016;17.
- Cioni G, Inguaggiato E, Sgandurra G. Early intervention in neurodevelopmental disorders: underlying neural mechanisms. *Dev Med Child Neurol.* 2016;4:61-66.
- Ciucci F, Putignano E, Baroncelli L, Landi S, Berardi N, Maffei L. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mediates the effects of enriched environment (EE) on visual cortical development. *PLoS One.* 2007;2:e475.
- Consiglio AR, Lucion AB. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2000;5:109-114.
- Coomber BL, Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res.* 1985;30:99-115.

- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:695-698.
- Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ. Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:5196-201.
- Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. 2013;61:71-90.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res*. 1997;23:106-116.
- Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012;72:648-672.
- Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7:a020412.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010;468:562-566.
- Danias J, Shen F, Goldblum D, Chen B, Ramos-Esteban J, Podos SM, Mittag T. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:587-594.
- Darwin C. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*, 1871, John Murray, Albermarle Street, London.
- Das A, Guyton MK, Sith A. Calpain inhibitor attenuated optic nerve damage in acute optic neuritis in rats. *J Neurochem*. 2013;124:133-146.
- Davis RL, Stevens CW, Thomas Curtis J. The opioid antagonist, β -funaltrexamine, inhibits lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and reduces sickness behavior in mice. *PhysiolBehav*. 2017;173:52-60.
- De Franceschi G, Vivattanasarn T, Saleem AB, Solomon SG. Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. *Curr Biol*. 2016;26:2150-2154.
- de Seze J, Arndt C, Stojkovic T, Ayachi M, Gauthier JY, Bughin M, Saint Michel T, Pruvo JP, Hache JC, Vermersch P. Pupillary disturbances in multiple sclerosis: correlation with MRI findings. *J Neurol Sci*. 2001;188:37-41.
- de Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, Trévia N, Lins NA, Passos A, Santos Z, Diniz JA, Vasconcelos PF, Cunningham C, Perry VH, Diniz CW. Influence of enriched environment on

viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PLoS One*. 2011;6:e15597.

Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci*. 2002;5:1131-1136.

Del Sole MJ, Sande PH, Fernandez DC, Sarmiento MI, Aba MA, Rosenstein RE. Therapeutic benefit of melatonin in experimental feline uveitis. *J Pineal Res*. 2012;52:29-37.

Dhande OS, Stafford BK, Lim JA, Huberman AD. Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. *Annu Rev Vis Sci*. 2015;1:291-328.

Diamond MC, Rosenzweig MR, Bennett EL, Lindner B, Lyon L. Effects of environmental enrichment and impoverishment on rat cerebral cortex. *J Neurobiol*. 1972;3:47-64.

Diem R, Hobom M, Maier K. Methylprednisolone increases neuronal apoptosis during autoimmune CNS inflammation by inhibition of an endogenous neuroprotective pathway. *J Neurosci*. 2003;23:6993-7000.

Diem R, Demmer I, Boretius S, Merkler D, Schmelting B, Williams SK, Sättler MB, Bähr M, Michaelis T, Frahm J, Brück W, Fuchs E. Autoimmune optic neuritis in the common marmoset monkey: comparison of visual evoked potentials with MRI and histopathology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2008;49:3707-3714.

Ding K, Wang H, Xu J, Li T, Zhang L, Ding Y, Zhu L, He J, Zhou M. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism. *Free Radic Biol Med*. 2014;73:1-11.

Domínguez Rubio AP, Correa F, Aisemberg J, Dorfman D, Bariani MV, Rosenstein RE, Zorrilla Zubilete M, Franchi AM. Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice. *J Pineal Res*. 2017;63.

Dong MX, Hu QC, Shen P, Pan JX, Wei YD, Liu YY, Ren YF, Liang ZH, Wang HY, Zhao LB, Xie P. Recombinant Tissue Plasminogen Activator Induces Neurological Side Effects Independent on Thrombolysis in Mechanical Animal Models of Focal Cerebral Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11:e0158848.

Dorfman, D, Aranda ML, González Fleitas MF, Chianelli MS, Fernandez DC, Sande, PH, Rosenstein, RE. Environmental enrichment protects the retina from early diabetic damage in adult rats. *PLoS One*. 2014;9:e101829.

Dorfman, D, Aranda ML, Rosenstein RE. Enriched Environment Protects the Optic Nerve from Early Diabetes-Induced Damage in Adult Rats. *PLoS One*. 2015;10:e0136637.

- Dorfman D, Fernandez DC, Chianelli M, Miranda M, Aranda ML, Rosenstein RE. Post-ischemic environmental enrichment protects the retina from ischemic damage in adult rats. *Exp. Neurol.* 2013;240:146-156.
- Dräger UC, Hubel DH. Responses to visual stimulation and relationship between visual, auditory, and somatosensory inputs in mouse superior colliculus. *J Neurophysiol.* 1976;38:690-713.
- Dubocovich ML, Masana MI, Benloucif S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol.* 1999;460:181-90.
- Ebadi M, Govitrapong P. Neural pathways and neurotransmitters affecting melatonin synthesis. *J Neural Transm Suppl.* 1986;21:125-55.
- Eilam D. Die hard: a blend of freezing and fleeing as a dynamic defense--implications for the control of defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29:1181-1191.
- Ellis EM, Gauvain G, Sivyer B, Murphy GJ. Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol.* 2016;116:602-610.
- Ellis CJ. The afferent pupillary defect in acute optic neuritis. *J. Neurol. Neurosurg.* 1979;42:1008-1017.
- Esen N, Tanga FY, DeLeo JA, Kielian T. Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates astrocyte activation in response to the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*. *J Neurochem.* 2004;88:746-758.
- Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010;8:228-242.
- Faherty CJ, Kerley D, Smeyne RJ. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2003;141:55-61.
- Faillace MP, Cutrera R, Sarmiento MI, Rosenstein RE. Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuroreport.* 1995;6:2093-2095.
- Faillace MP, Sarmiento MI, Siri LN, Rosenstein RE. Diurnal variations in cyclic AMP and melatonin content of golden hamster retina. *J Neurochem.* 1994;62(5):1995-2000.
- Fairless R, Williams SK, Hoffmann DB, Stojic A, Hochmeister S, Schmitz F, Storch MK, Diem R. Preclinical retinal neurodegeneration in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2012;32:5585-5597.
- Fan D, Li J, Zheng B, Hua L, Zuo Z. Enriched Environment Attenuates Surgery-Induced Impairment of Learning, Memory, and Neurogenesis Possibly by Preserving BDNF Expression. *Mol Neurobiol.* 2016;53:344-354.

- Fawcett, DW. Tratado de histología. Interamericana. McGraw-Hill. Buenos Aires, 1995.
- Felts PA, Woolston AM, Fernando HB, Asquith S, Gregson NA, Mizzi OJ, Smith KJ. Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain*. 2005;128:1649-1666.
- Fernandez DC, Bordone MP, Chianelli MS, Rosenstein RE. Retinal neuroprotection against ischemia-reperfusion damage induced by postconditioning. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3922-3930.
- Fernandez DC, Fogerson PM, Lazzerini Osprei L, Thomsen MB, Layne RM, Severin D, Zhan J, Singer JH, Kirkwood A, Zhao H, Berson DM, Hattar S. Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell*. 2018;175:71-84.e18.
- Fernandez DC, Pasquini LA, Dorfman D, Aldana Marcos HJ, Rosenstein RE. Early distal axonopathy of the visual pathway in experimental diabetes. *Am J Pathol*. 2012;180:303-313.
- Fife BT, Huffnagle GB, Kuziel WA, Karpus WJ. CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2000;192:899-905.
- Fonseca-Kelly Z, Nassrallah M, Uribe J, Khan RS, Dine K, Dutt M, Shindler KS. Resveratrol neuroprotection in a chronic mouse model of multiple sclerosis. *Front Neurol*. 2012;3:84.
- Franklin TB, Murphy JA, Myers TL, Clarke DB, Currie RW. Enriched environment during adolescence changes brain-derived neurotrophic factor and TrkB levels in the rat visual system but does not offer neuroprotection to retinal ganglion cells following axotomy. *Brain Res*. 2006;1095:1-11.
- Fredriksson L, Lawrence DA, Medcalf RL. tPA Modulation of the Blood-Brain Barrier: A Unifying Explanation for the Pleiotropic Effects of tPA in the CNS. *Semin Thromb Hemost*. 2017;43:154-168.
- Fuentes ME, Durham SK, Swerdel MR, Lewin AC, Barton DS, Megill JR, Bravo R, Lira SA. Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Immunol*. 1995;155:5769-5776.
- Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. Expression of MT1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience*. 1999;93:793-799.
- Furlan R, Cuomo C, Martino G. Animal models of multiple sclerosis. *Methods Mol. Biol*. 2009; 549:157-173.
- Gal RL, Vedula SS, Beck R. Corticosteroids for treating optic neuritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;8:CD001430.

- Gamlin PD. The pretectum: connections and oculomotor-related roles. *Prog Brain Res*. 2006; 151:379-405.
- Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MI, Brocco MA, Panzetta P, Rosenstein RE, Caputto BL, Guido ME. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J Biol Chem*. 2004;279:51172-51181.
- Garofalo S, D'Alessandro G, Chece G, Brau F, Maggi L, Rosa A, Porzia A, Mainiero F, Esposito V, Lauro C, Benigni G, Bernardini G, Santoni A, Limatola C. Enriched environment reduces glioma growth through immune and non-immune mechanisms in mice. *Nat Commun*. 2015;6:6623.
- Garofalo S, Porzia A, Mainiero F, Di Angelantonio S, Cortese B, Basilico B, Pagani F, Cignitti G, Chece G, Maggio R, Tremblay ME, Savage J, Bisht K, Esposito V, Bernardini G, Seyfried T, Mieczkowski J, Stepniak K, Kaminska B, Santoni A, Limatola C. Environmental stimuli shape microglial plasticity in glioma. *Elife*. 2017;6:e33415.
- Garthe A, Roeder I, Kempermann G. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 2016;26:261-271.
- Gatti S, Bartfai T. Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. *Brain Res*. 1993;624:291-294.
- Ge S, Shrestha B, Paul D, Keating C, Cone R, Guglielmotti A, Pachter JS. The CCL2 synthesis inhibitor bindarit targets cells of the neurovascular unit, and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2012;9:171.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
- Gern WA, Ralph CL. Melatonin synthesis by the retina. *Science*. 1979;204:183-184.
- Gilbert ME, Lasley SM. Developmental thyroid hormone insufficiency and brain development: a role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF)? *Neuroscience*. 2013;239:253-270.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330:841-845.
- Gordon GR, Howarth C, MacVicar BA. Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Exp Physiol*. 2011;96:393-399.

- Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119:89-105.
- Grassia G, Maddaluno M, Guglielmotti A, Mangano G, Biondi G, Maffia P, Ialenti A. The anti-inflammatory agent bindarit inhibits neointimaformation in both rats and hyperlipodaemic mice. *Cardiovasc Res.* 2009;84:485-493.
- Grishanin RN, Yang H, Liu X, Donohue-Rolfe K, Nune GC, Zang K, Xu B, Duncan JL, Lavail MM, Copenhagen DR, Reichardt LF. Retinal TrkB receptors regulate neural development in the inner, but not outer, retina. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38:431-443.
- Guan Y, Shindler KS, Tabuela P, Rostami AM. Retinal ganglion cell damage induced by spontaneous autoimmune optic neuritis in MOG-specific TCR transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* 2006;178:40-48.
- Guan Z, Fang, J. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav. Immun.* 2006;20:64-71.
- Guglielmotti A, Aquilini L, D'Onofrio F, Rosignoli MT, Milanese C, Pinza M. Bindarit prolongs survival and reduces renal damage in NZB/W lupusmice. *Clini Exp Rheumatol* 1998;16:149-154.
- Guglielmotti A, D'Onofrio E, Coletta I, Aquilini L, Milanese C, Pinza M. Amelioration of rat adjuvant arthritis by therapeutic treatment with bindarit, an inhibitor of MCP-1 and TNF-alpha production. *Inflamm Res.* 2002;51:252-258.
- Guillery RW, Walsh C. Changing glial organization relates to changing fiber order in the developing optic nerve of ferrets. *J Comp Neurol.* 1987; 265:203-217.
- Guzzetta A, Baldini S, Bancalè A, Baroncelli L, Ciucci F, Ghirri P, Putignano E, Sale A, Viegì A, Berardi N, Boldrini A, Cioni G, Maffei L. Massage accelerates brain development and the maturation of visual function. *J Neurosci.* 2009;29:6042-6051.
- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 2014;508:55-60.
- Halliday A, McDonald W, Mushin J,. Delayed visual evoked response in optic neuritis. *Lancet.* 1972;1:982-985.
- Hanif AM, Lawson EC, Prunty M, Gogniat M, Aung MH, Chakraborty R, Boatright, J.H., Pardue, M.T.,. Neuroprotective Effects of Voluntary Exercise in an Inherited Retinal Degeneration Mouse Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015;56:6839-6846.
- Hanisch UK. Proteins in microglial activation--inputs and outputs by subsets. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;14:3-15.

Hannan, AJ. Environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2014; 40:13-25.

Harada C, Guo X, Namekata K, Kimura A, Nakamura K, Tanaka K, Parada LF, Harada T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration. *Nat Commun.* 2011;2:189.

Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005;27:119-130.

Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau KW, Berson DM. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* 2006;497:326-349.

Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 2002;295:1065-1070.

Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:185-193.

Hellwig S, Heinrich A, Biber K. The brain's best friend: microglial neurotoxicity revisited. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:71.

Henle J, Merkel F. Über die sogenannte Binde substanz der Centralorgane des Nervensystems. *Z Med,* 1869;34:49-82.

Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol.* 1997;158:1825-1832.

Herrera AJ, Castaño A, Venero JL, Cano J, Machado A. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis.* 2000;7:429-447.

Hickman SE, El Khoury J. Mechanisms of mononuclear phagocyte recruitment in Alzheimer's disease. *CNS NeurolDisord Drug Targets.* 2010;9:168-173.

Hickman SJ, Dalton CM, Miller DH, Plant GT. Management of acute optic neuritis. *Lancet.* 2002;360:1953-1962.

Hickman SJ, Kapoor R, Jones SJ. Corticosteroids do not prevent optic nerve atrophy following optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:1139-1141.

Hood DC, Odel JG, Zhang X. Tracking the recovery of local optic nerve function after optic neuritis: a multifocal VEP study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:4032-4038.

- Horstmann L, Schmid H, Heinen AP, Kurschus FC, Dick HB, Joachim SC. Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J. Neuroinflammation*. 2013;10:120.
- Horwitz H, Friis T, Modvig S, et al. Differential diagnoses to MS: experiences from an optic neuritis clinic. *J Neurol*. 2014;261:98-105.
- Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SW. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J Cell Biol*. 2007;179:1523-1537.
- Howell GR, Soto I, Zhu X, Ryan M, Macalinao DG, Sousa GL, Caddle LB, MacNicol KH, Barbay JM, Porciatti V, Anderson MG, Smith RS, Clark AF, Libby RT, John SW. Radiation treatment inhibits monocyte entry into the optic nerve head and prevents neuronal damage in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest*. 2012;122:1246-1261.
- Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69:1017-1033.
- Hu P, Pollard J, Hunt N, Chan-Ling T. Microvascular and cellular responses in the retina of rats with acute experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Brain Pathol*. 1998;8:487-498.
- Hu YS, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O. Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice. *FASEB J*. 2010;24:1667-1681.
- Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001;193:713-726.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677-736.
- Huang-Link YM, Al-Hawasi A, Lindehammar H. Acute optic neuritis: retinal ganglion cell loss precedes retinal nerve fiber thinning. *Neurol Sci*. 2015;36:617-620.
- Hunt DM, Carvalho LS, Cowing JA, Davies WL. Evolution and spectral tuning of visual pigments in birds and mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364:2941-2955.
- Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 2007;10:1369-1376.

Ibrahim AS, El-Remessy AB, Matragoon S, Zhang W, Patel Y, Khan S, Al-Gayyar MM, El-Shishtawy MM, Liou GI. Retinal microglial activation and inflammation induced by amadori-glycated albumin in a rat model of diabetes. *Diabetes*. 2011;60:1122-1133.

Iuvone PM. Development of melatonin synthesis in chicken retina: regulation of serotonin N-acetyltransferase activity by light, circadian oscillators, and cyclic AMP. *J Neurochem*. 1990;54:1562-1568.

Jain V, Baitharu I, Prasad D, Ilavazhagan G. Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced memory impairment and neurodegeneration: role of BDNF/PI3K/GSK3 β pathway coupled with CREB activation. *PLoS One*. 2013;21;8:e62235.

Janssen H, Bernhardt J, Collier JM, Sena ES, McElduff P, Attia J, Pollack M, Howells DW, Nilsson M, Calford MB, Spratt NJ. An enriched environment improves sensorimotor function post-ischemic stroke. *Neurorehabil Neural Repair*. 2010;24:802-813.

Jarius S, Wildemann B, Paul F. Neuromyelitis optica: clinical features, immunopathogenesis and treatment. *Clin Exp Immunol*. 2014;176:149-164.

Jeffery G. Architecture of the optic chiasm and the mechanisms that sculpt its development. *Physiol Rev*. 2001;81:1393-1414.

Jones TA, Hawrylak N, Greenough WT. Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment. *Psychoneuroendocrinology*. 1996;21:189-201.

Jurgens HA, Johnson RW. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain Behav. Immun*. 2012;26:1006-1016.

Kale N. Management of optic neuritis as a clinically first event of multiple sclerosis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2012;23:472-476.

Kambhampati SP, Clunies-Ross AJ, Bhutto I, Mishra MK, Edwards M, McLeod DS, Kannan RM, Luty G. Systemic and Intravitreal Delivery of Dendrimers to Activated Microglia/Macrophage in Ischemia/Reperfusion Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:4413-4424.

Karlstetter M, Ebert S, Langmann T. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology*. 2010;215:685-691.

Karpova NN. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology*. 2014;76:709-718.

Kaufman DI, Trobe JD, Eggenberger ER, Whitaker JN. Practice parameter: the role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. Report of the

Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology. 2000;54:2039-2044.

Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91:461-553.

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*. 2013;77:10-18.

Kezuka T, Ishikawa H. Diagnosis and treatment of anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody positive optic neuritis. *Jpn J Ophthalmol*. 2018;62:101-108.

Khaleeli Z, Tucker WR, Del Porto L, Virgo JD, Plant GT. Remember the retina: retinal disorders presenting to neurologists. *Pract Neurol*. 2018;18:84-96.

Khan RS, Dine K, Luna E, Ahlem C, Shindler KS. HE3286 reduces axonal loss and preserves retinal ganglion cell function in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:5744-5751.

Kielian T, Esen N, Bearden ED. Toll-like receptor 2 (TLR2) is pivotal for recognition of *S. aureus* peptidoglycan but not intact bacteria by microglia. *Glia*. 2005;49:567-576.

Kielian T, Mayes P, Kielian M. Characterization of microglial responses to *Staphylococcus aureus*: effects on cytokine, costimulatory molecule, and Toll-like receptor expression. *J Neuroimmunol*. 2002;130:86-99.

Kielian T. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res*. 2006;83:711-730.

Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Hölscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*. 2013;16:273-280.

Kline AE, McAloon RL, Henderson KA, Bansal UK, Ganti BM, Ahmed RH, Gibbs RB, Sozda CN. Evaluation of a combined therapeutic regimen of 8-OH-DPAT and environmental enrichment after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010;27:2021-2032.

Klistorner A, Arvind H, Nguyen T, Garrick R, Paine M, Graham S, O'Day J, Grigg J, Billson F, Yiannikas C. Axonal loss and myelin in early ON loss in post acute optic neuritis. *Ann Neurol*. 2008;64:325-331.

Klooster J, Vrensen GF, Müller LJ, van der Want JJ. Efferent projections of the olivary pretectal nucleus in the albino rat subserving the pupillary light reflex and related reflexes. A light microscopic tracing study. *Brain Res*. 1995;688:34-46.

- Ko HM, Lee SH, Kim KC, Joo SH, Choi WS, Shin CY. The Role of TLR4 and Fyn Interaction on Lipopolysaccharide-Stimulated PAI-1 Expression in Astrocytes. *Mol Neurobiol*. 2015;52:8-25.
- Koch PC, Hess M. Topographic mapping of retinal neurons in the European anchovy by nuclear staining and immunohistochemistry. *J Neurosci Res*. 2011;89:1316-1330.
- Kölliker A. Handbuch der Gewebelehre des Menschen. *J Anat Physiol*. 1889;2:1-898.
- Kondo Y, Takada M, Honda Y, Mizuno, N. Bilateral projections of single retinal ganglion cells to the lateral geniculate nuclei and superior colliculi in the albino rat. *Brain Res*. 1993;608:204-215.
- Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J Comp Physiol Psychol*. 1960;53:509-519.
- Krech D, Rosenzweig MR, Bennett EL. Effects of complex environment and blindness on rat brain. An experiment in replicate. *Arch Neurol*. 1963;8:402-412.
- Krstić, RV. Human microscopic anatomy. Springer-Verlag. 1997.
- Kupersmith MJ, Nelson JJ, Seiple WH, Carr RE, Weiss PA. The 20/20 eye in multiple sclerosis. *Neurology*. 1983;33:1015-1020.
- Lachapelle F, Bachelin C, Moissonnier P, Nait-Oumesmar B, Hidalgo A, Fontaine D, Baron-Van Evercooren A. Failure of remyelination in the nonhuman primate optic nerve. *Brain Pathol*. 2005;15:198-207.
- Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J*. 2001;15:155-163.
- Landi S, Sale A, Berardi N, Viegi A, Maffei L, Cenni MC. Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. *FASEB J*. 2007;21:130-139.
- Larsen JM, Martin DR, Byrne ME. Recent advances in delivery through the blood-brain barrier. *Curr Top Med Chem*. 2014;14:1148-1160.
- Layé S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994;27:157-162.
- Le Marrec-Croq F, Drago F, Vizioli J, Sautière PE, Lefebvre C. The leech nervous system: a valuable model to study the microglia involvement in regenerative processes. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:274019.

- Le Thuc O, Cansell C, Bourourou M, Denis RG, Stobbe K, Devaux N, Guyon A, Cazareth J, Heurteaux C, Rostène W, Luquet S, Blondeau N, Nahon JL, Rovère C. Central CCL2 signaling onto MCH neurons mediates metabolic and behavioral adaptation to inflammation. *EMBO Rep.* 2016;17:1738-1752.
- Leal G, Comprido D, Duarte CB. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76:639-656.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci.* 2002;22:2478-2486.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8514-8519.
- Lerner AB, Case JD, Moeri W, Wright MR. Melatonin in peripheral nerve. *Nature.* 1959;183:1821.
- Lenhossék Mv. Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschung. Berlin: Fisher's Medicinische Buchhandlung H. Kornfield; 1893.
- Li K, Du Y, Fan Q, et al. Gypenosides might have neuroprotective and immunomodulatory effects on optic neuritis. *Med Hypotheses.* 2014;82: 636-638.
- Lin J, Zhu X, Chade A, Jordan KL, Lavi R, Daghini E, Gibson ME, Guglielmotti A, Lerman A, Lerman LO. Monocyte chemoattractant proteins mediate microvascular dysfunction in swine renovascular hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1810-1816.
- Lin TH, Kim JH, Perez-Torres C, Chiang CW, Trinkaus K, Cross AH, Song SK. Axonal transport rate decreased at the onset of optic neuritis in EAE mice. *Neuroimage.* 2014;100:244-253.
- Liu Y, Xie X, Xia LP, Lv H, Lou F, Ren Y, He ZY, Luo XG. Peripheral immune tolerance alleviates the intracranial lipopolysaccharide injection-induced neuroinflammation and protects the dopaminergic neurons from neuroinflammation-related neurotoxicity. *J Neuroinflammation.* 2017;14:223.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)). *Method Methods.* 2001;25:402-408.
- London A, Cohen M, Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:34.

- Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:591-602.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
- Lund RD, Land PW, Boles J. Normal and abnormal uncrossed retinotectal pathways in rats: an HRP study in adults. *J Comp Neurol.* 1980;189:711-720.
- Luo Y, Peng M, Wei H. Melatonin Promotes Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression and Anti-Apoptotic Effects in Neonatal Hemolytic Hyperbilirubinemia via a Phospholipase (PLC)-Mediated Mechanism. *Med Sci Monit.* 2017;23:5951-5959.
- Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol.* 2006;209:2304-2311.
- Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of (MCP-1) CCL2 and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) *SemImmunol.* 2003;15:23-32.
- Maier K, Kuhnert AV, Taheri N, Sättler MB, Storch MK, Williams SK, Bähr M, Diem R. Effects of glatiramer acetate and interferon-beta on neurodegeneration in a model of multiple sclerosis: a comparative study. *Am. J. Pathol.* 2006;169:1353-1364.
- Maier K, Rau CR, Storch MK, Sättler MB, Demmer I, Weissert R, Taheri N, Kuhnert AV, Bähr M, Diem R. Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from secondary cell death during acute autoimmune optic neuritis in rats. *Brain Pathol.* 2004;14:378-387.
- Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25:89-98.
- Marques IB, Matias F, Silva ED, Cunha L, Sousa L. Risk of multiple sclerosis after optic neuritis in patients with normal baseline brain MRI. *J Clin Neurosci.* 2014;21:583-586.
- Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci.* 2001;4:877-886.
- Masland RH. The neuronal organization of the retina. *Neuron.* 2012;76:266-280.
- Matsunaga Y, Kezuka T, An X, Fujita K, Matsuyama N, Matsuda R, Usui Y, Yamakawa N, Kuroda M, Goto H. Visual functional and histopathological correlation in experimental autoimmune optic neuritis. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:6964-6971.
- McGuinness B, Gibney SM, Beumer W, Versnel MA, Sillaber I, Harkin A, Drexhage HA. Exaggerated Increases in Microglia Proliferation, Brain Inflammatory Response and Sickness Behaviour upon Lipopolysaccharide Stimulation in Non-Obese Diabetic Mice. *Neuroimmunomodulation.* 2016;23:137-150.

- Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, De Graaf KL, Kramer B, Bahr M. Acute Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Multiple Sclerosis. *J of Neurosc.* 2001;21:6214-6220.
- Mirollo M, Fabbri M, Sironi M, Vecchi A, Guglielmotti A, Mangano G, Biondi G, Locati M, Mantovani A. Impact of the anti-inflammatory agent bindariton on the chemokine: selective inhibition of the monocyte chemoattractant proteins. *Eur Cytokine Netw.* 2008;19:119-122.
- Miron VE, Kuhlmann T, Antel JP. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:184-193.
- Mittapalli RK, Manda VK, Adkins CE, Geldenhuys WJ, Lockman PR. Exploiting nutrient transporters at the blood-brain barrier to improve brain distribution of small molecules. *Ther Deliv.* 2010;1:775-784.
- Monteiro BM, Moreira FA, Massensini AR, Moraes MF, Pereira GS. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus.* 2014;24:239-248.
- Mora F, Segovia G, Del Arco A. Glutamate-dopamine-GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Res Rev.* 2008;58:340-353.
- Moreno MC, Campanelli J, Sande P, Sáñez DA, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic Biol Med.* 2004;15:803-812.
- Morgan JE. Circulation and axonal transport in the optic nerve. *Eye (Lond).* 2004;18:1089-1095.
- Morin LP, Studholme KM. Retinofugal projections in the mouse. *J Comp Neurol.* 2014;522:3733-3753.
- Moro SI, Rodriguez-Carmona ML, Frost EC, Plant GT, Barbur JL. 2007. Recovery of vision and pupil responses in optic neuritis and multiple sclerosis. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2007;27:451-460.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna WO, Funk RH. Microvasculature of the rat optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:1702-1709.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003;26:523-530.
- Newman EA. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2003;26:536-542.
- Nixon RA, Sihag RK. Neurofilament phosphorylation, a new look at regulation and function. *Trends Neurosci.* 1991;14:501-506.

- Nowacka-Chmielewska MM, Kasprowska D, Paul-Samojedny M, Bielecka-Wajdman AM, Barski JJ, Małecki A, Obuchowicz E. The effects of desipramine, fluoxetine, or tianeptine on changes in bulbar BDNF levels induced by chronic social instability stress and inflammation. *Pharmacol Rep.* 2017;69:520-525.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol.* 2012;814:23-45.
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013;19:1584-1596.
- Oldendorf WH. The blood-brain barrier. *Exp Eye Res.* 1977;25:177-190.
- Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol.* 2004;173:3916-3924.
- Osborne NN, Block F, Sontag KH. Reduction in ocular blood flow results in glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in rat Muller cells. *Vis Neurosci.* 1991;7:637- 639.
- Pang SF, Dubocovich ML, Brown GM. Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research. *Biol Signals.* 1993;2:177-180.
- Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:7-23.
- Park HJ, Shin JY, Kim HN, Oh SH, Song SK, Lee PH. Mesenchymal stem cells stabilize the blood-brain barrier through regulation of astrocytes. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:187.
- Patapoutian A, Reichardt LF. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11:272-280.
- Patterson SL, Goglin SE. Neuromyelitis Optica. *Rheum Dis Clin North Am.* 2017;43:579-591.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Elsevier; Amsterdam: 1997
- Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005;50:427- 434.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature.* 2006;443:700-704.
- Perry VH, Cowey A. Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience.* 1984;12:1125-1137.
- Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2001;50:389-400.

- Porcher C, Hatchett C, Longbottom RE, McAinch K, Sihra TS, Moss SJ, Thomson AM, Jovanovic JN. Positive feedback regulation between gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor signaling and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) release in developing neurons. *J Biol Chem*. 2011;286:21667-21677.
- Prasad S. A Window to the Brain: Neuro-Ophthalmology for the Primary Care Practitioner. *Am J Med*. 2018;131:120-128.
- Prinz M, Mildner A. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*. 2011;59:177-187.
- Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci*. 2017;20:136-144.
- Prusky GT, Reidel C, Douglas RM. Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behav Brain Res*. 2000;114:11-15.
- Purpura G, Tinelli F, Bargagna S, Bozza M, Bastiani L, Cioni G. Effect of early multisensory massage intervention on visual functions in infants with Down syndrome. *Early Hum Dev*. 2014;90:809-813.
- Qi X, Lewin AS, Sun L. Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:681-691.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007;55:453-462.
- Quan N, Stern EL, Whiteside MB, Herkenham M. Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J Neuroimmunol*. 1999;93:72-80.
- Quay WB. Retinal and pineal hydroxyindole-o-methyl transferase activity in vertebrates. *Life Sci*. 1965;4:983-991.
- Quigley, HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;3:6774-6786.
- Quinn, TA, Dutt M, Shindler KS. Optic neuritis and retinal ganglion cell loss in a chronic murine model of multiple sclerosis. *Front. Neurol*. 2011;2:50.
- Rada JA, Wiechmann AF. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:25-33.

- Rahati M, Nozari M, Eslami H, Shabani M, Basiri M. Effects of enriched environment on alterations in the prefrontal cortex GFAP- and S100B-immunopositive astrocytes and behavioral deficits in MK-801-treated rats. *Neuroscience*. 2016;326:105-116.
- Rangachari M, Kuchroo VK. Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun*. 2013;45:31-39.
- Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016;353:777-783.
- Rasley A, Bost KL, Olson JK, Miller SD, Marriott I. Expression of functional NK-1 receptors in murine microglia. *Glia*. 2002;37:258-267.
- Reese BE. The distribution of axons according to diameter in the optic nerve and optic tract of the rat. *Neuroscience*. 1987;22:1015-1024.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 1967;34:207-217.
- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, van HetHof B, Couraud PO, Vivien D, Dijkstra CD, de Vries HE. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *J Immunol*. 2008;181:3567-3574.
- Reiter RJ. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Front Neuroendocrinol*. 1995;16:383-415.
- Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Pappolla MA, Acuña-Castroviejo D. Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;825:70-78.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*. 2016;61:253-278.
- Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:3863-3881.
- Rivest S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun*. 2003;17:13-19.
- Rodríguez JJ, Terzieva S, Olabarria M, Lanza RG, Verkhratsky A. Enriched environment and physical activity reverse astrogliodegeneration in the hippocampus of AD transgenic mice. *Cell Death Dis*. 2013;20:4.
- Rosenzweig MR. Modification of Brain Circuits through Experience. *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Front in Neurosc. 2007;4.

Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res.* 1996;78:57-65.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL, Diamond MC. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol Psychol.* 1962;55:429-437.

Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci.* 2007;10:1377-1386.

Rudnitskaya EA, Muraleva NA, Maksimova KY, Kiseleva E, Kolosova NG, Stefanova NA. Melatonin Attenuates Memory Impairment, Amyloid- β Accumulation, and Neurodegeneration in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;47:103-116.

Sáenz DA, Goldin AP, Minces L, Chianelli M, Sarmiento MI, Rosenstein RE. Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina. *FASEB J.* 2004;18:1912-1913.

Sale A, Berardi N, Maffei L. Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 2009;32:233-239.

Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiol Rev.* 2014;94:189-234.

Sale A, Cenni MC, Ciucci F, Putignano E, Chierzi S, Maffei L. Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. *PLoS One.* 2007;2:e116.

Salido EM, Dorfman D, Bordone M, Chianelli MS, Sarmiento MI, Aranda M, Rosenstein RE. Ischemic conditioning protects the rat retina in an experimental model of early type 2 diabetes. *Exp Neurol.* 2013;240:1-8.

Salinas-Navarro M, Mayor-Torroglosa S, Jiménez-López M, Avilés-Trigueros M, Holmes TM, Lund RD, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res.* 2009;49:115-126.

Sande PH, Álvarez J, Calcagno J, Rosenstein RE. Preliminary findings on the effect of melatonin on the clinical outcome of cataract surgery in dogs. *Vet Ophthalmol.* 2016;19:184-194.

Sande PH, Fernandez DC, Aldana Marcos HJ, Chianelli MS, Aisemberg J, Silberman DM, Sáenz DA, Rosenstein RE. Therapeutic effect of melatonin in experimental uveitis. *Am J Pathol.* 2008;173:1702-1713.

Sarthy V. Focus on molecules: glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Exp Eye Res.* 2007;84:381-382.

- Sättler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bähr M, Diem R. Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ.* 2004;11:S181-192.
- Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, Pache M, Krauchi K, Brydon L, Jockers R, Muller-Spahn F, Meyer P. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:519-526.
- Scalia F. Retinal projections to the olivary pretectal nucleus in the tree shrew and comparison with the rat. *Brain Behav Evol.* 1972;6:237-252.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:889-897.
- Schmidt TM, Chen SK, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci.* 2011;34:572-580.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science.* 2012;336:86-90.
- Seabrook TA, Burbidge TJ, Crair MC, Huberman AD. Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System. *Annu Rev Neurosci.* 2017;40:499-538.
- Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol.* 2006;7:311-317.
- Shang C, Chen Z, Liu A, Li Y, Zhang J, Qu B, Yan F, Zhang Y, Liu W, Liu Z, Guo X, Li D, Wang Y, Cao P. Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. *Nat Commun.* 2018;9:1232.
- Shea TB, Chan WK. Regulation of neurofilament dynamics by phosphorylation. *Eur J Neurosci.* 2008;27:1893-1901.
- Shindler KS, Guan Y, Ventura E, Bennett J, Rostami A,. Retinal ganglion cell loss induced by acute optic neuritis in a relapsing model of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2006;12:526-532.
- Shindler KS, Revere K, Dutt M, Ying GS, Chung DC. In vivo detection of experimental optic neuritis by pupillometry. *Exp. Eye Res.* 2012;100:1-6.
- Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci.* 2003;23:3234-3242.
- Simmons SB, Pierson ER, Lee SY, Goverman JM. Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol.* 2013;34:410-422.

- Sims DE. The pericyte--a review. *Tissue Cell*. 1986;18:153-174.
- Siu AW, Maldonado M, Sanchez-Hidalgo M, Tan DX, Reiter RJ. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res*. 2006;40:101-109.
- Sonetti D, Ottaviani E, Bianchi F, Rodriguez M, Stefano ML, Scharrer B, Stefano GB. Microglia in invertebrate ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:9180-9184.
- Sozda RB. Evaluation of a combined therapeutic regimen of 8-OH-DPAT and environmental enrichment after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010;27:2021-2032.
- Sun D, Lye-Barthel M, Masland RH, Jakobs TC. The morphology and spatial arrangement of astrocytes in the optic nerve head of the mouse. *J Comp Neurol*. 2009;516:1-19.
- Szabadfi K, Atlasz T, Horváth G, Kiss P, Hamza L, Farkas J, Tamás A, Lubics A, Gábel R, Reglodi D. Early postnatal enriched environment decreases retinal degeneration induced by monosodium glutamate treatment in rats. *Brain Res*. 2009;1259:107-112.
- Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185-194.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*. 2006;9:260-267.
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T. Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J. Neurosci Res*. 2006;83:557-566.
- Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53:1181-1194
- Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol*. 2000;165:5780-5787.
- Teng KK, Hempstead BL. Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:35-48.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem*. 1989;37:159-164.

- Tognini P, Manno I, Bonaccorsi J, Cenni MC, Sale A, Maffei L. Environmental enrichment promotes plasticity and visual acuity recovery in adult monocular amblyopic rats. *PLoS One*. 2012;7:e34815.
- Toosy AT, Mason DF, Miller DH. Optic neuritis. *Lancet Neurol*. 2014;13:83-99.
- Tosini G, Menaker M. Circadian rhythm in cultured mammalian retina. *Science*. 1996;272:419-421.
- Tovote P, Fadok JP, Lüthi A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16:317-331.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338:278-285.
- Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*. 2011;31:16064-16069.
- Tropea D, Majewska AK, Garcia R, Sur M. Structural dynamics of synapses in vivo correlate with functional changes during experience-dependent plasticity in visual cortex. *J Neurosci*. 2010;30:11086-11095.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature*. 1995;377:340-344.
- Turjanski AG, Rosenstein RE, Estrin DA. Reactions of melatonin and related indoles with free radicals: a computational study. *J Med Chem*. 1998;41:3684-3689.
- Ufnal M, Skrzypecki J. Blood borne hormones in a cross-talk between peripheral and brain mechanisms regulating blood pressure, the role of circumventricular organs. *Neuropeptides*. 2014;48:65-73.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science*. 2001;291:657-661.
- Van Dam AM, Brouns M, Louisse S, Berkenbosch F. Appearance of interleukin-1 in macrophages and in ramified microglia in the brain of endotoxin-treated rats: a pathway for the induction of non-specific symptoms of sickness? *Brain Res*. 1992;588:291-296.
- Van Hove I, Lefevre E, De Groef L, Sergeys J, Salinas-Navarro M, Libert C, Vandenbroucke R, Moons L. MMP-3 Deficiency Alleviates Endotoxin-Induced Acute Inflammation in the Posterior Eye Segment. *Int J Mol Sci*. 2016;17.
- Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000;1:191-198.

- Verkman AS, Smith AJ, Phuan PW, Tradtrantip L, Anderson MO. The aquaporin-4 water channel as a potential drug target in neurological disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21:1161-1170.
- Villarán RF, de Pablos RM, Argüelles S, Espinosa-Oliva AM, Tomás-Camardiel M, Herrera AJ, Cano J, Machado A. The intranigral injection of tissue plasminogen activator induced blood-brain barrier disruption, inflammatory process and degeneration of the dopaminergic system of the rat. *Neurotoxicology*. 2009;30:403-413.
- Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29:423-440.
- Westergaard E, Brightman MW. Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J Comp Neurol*. 1973;152:17-44.
- Wiechmann AF, Smith AR. Melatonin receptor RNA is expressed in photoreceptors and displays a diurnal rhythm in *Xenopus* retina. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;91:104-111.
- Wiechmann AF. Differential distribution of Mel1a and Mel1c melatonin receptors in *Xenopus laevis* retina. *Exp Eye Research*. 2003;76:99-106.
- Wilhelm H, Schabet M. The Diagnosis and Treatment of Optic Neuritis. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112:616-625.
- Williams PL, Warwick R. *Anatomía de Gray*. Churchill Livingstone. 1992.
- Wong CS, Jow GM, Kaizaki A, Fan LW, Tien LT. Melatonin ameliorates brain injury induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats. *Neuroscience*. 2014;267:147-156.
- Wu KH, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL. Differential expression of GFAP in early vs. late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1159-1166.
- Yadav A, Saini V, Avora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1570-1579.
- Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990;10:3469-3478.
- Yang S, Li C, Qiu X, Zhang L, Lu W, Chen L, Zhao YY, Shi XY, Huang CX, Cheng GH, Tang Y. Effects of an enriched environment on myelin sheaths in the white matter of rats during normal aging: A stereological study. *Neuroscience*. 2013;234:13-21.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest*. 2003;112:1533-1540.

- Yi CX, Habegger KM, Chowen JA, Stern J, Tschöp MH. A role for astrocytes in the central control of metabolism. *Neuroendocrinology*. 2011;93:143-149.
- Yilmaz M, Meister M. Rapid innate defensive responses of mice to looming visual stimuli. *Curr Biol*. 2013;23:2011-2015.
- You Y, Gupta VK, Li JC, Klistorner A, Graham SL. Optic neuropathies: characteristic features and mechanisms of retinal ganglion cell loss. *Rev Neurosci*. 2013;24:301-321.
- You Y, Klistorner A, Thie J, Graham SL. Latency delay of visual evoked potential is a real measurement of demyelination in a rat model of optic neuritis. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci*. 2011;52:6911-6918.
- You Y, Gupta VK, Graham SL, Klistorner A. Anterograde degeneration along the visual pathway after optic nerve injury. *PLoS ONE*. 2012;7.
- Zekki H, Feinstein DL, Rivest S. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a profound and sustained transcriptional activation of the genes encoding toll-like receptor 2 and CD14 in the mouse CNS. *Brain Pathol*. 2002;12:308-319.
- Zhang G, Ghosh S. Molecular mechanisms of NF-kappa B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*. 2000;6:453-457.
- Zhang L, Ma P, Guan Q, Meng L, Su L, Wang L, Yuan B. Effect of chemokine CC ligand 2 (CCL2) on α -synuclein-induced microglia proliferation and neuronal apoptosis. *Mol Med Rep*. 2018 Sep 10. doi: 10.3892/mmr.2018.9468.
- Zheng J, Ding W, Li B, Yang Y. Enriched environment promotes remyelination and motor function recovery through modulation of HDAC1/2 in mice. *Neurosci Lett*. 2017;655:121-130.
- Zhu B, Moore GR, Zwimpfer TJ, Kastrukoff LF, Dyer JK, Steeves JD, Paty DW, Cynader MS. Axonal cytoskeleton changes in experimental optic neuritis. *Brain Res*. 1999;824:204-217.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 2008;57:178-201.