



Universidad de Valladolid



MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Afectación retiniana en un modelo murino experimental de esclerosis múltiple

Co-tutoras: M^a Carmen Martínez García y M^a Luisa Nieto Callejo

Trabajo realizado por **Sandra Jiménez Casares**, Licenciada en Biología y estudiante del Máster de Investigación Biomédica

Julio de 2015

ÍNDICE

NOMENCLATURA	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	11
<i>Evaluación del número de células ganglionares de la retina</i>	11
<i>Cuantificación del número de axones en el nervio óptico</i>	14
<i>Cuantificación del número de axones desmielinizados en el nervio óptico ..</i>	16
<i>Grosor de la vaina de mielina</i>	18
<i>Evaluación de apoptosis en la retina</i>	19
<i>Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	19
<i>Análisis de la neurodegeneración en nervio óptico</i>	22
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFÍA	27

NOMENCLATURA

AO: ácido oleanólico.

AT: azul de toluidina.

CFA: adyuvante completo de Freund.

CG: células ganglionares.

DCFH-DA: diclorofluoresceína diacetato.

DHE: dihydroethidium.

DMSO: dimetil sulfóxido.

d.p.i.: días post-inmunización.

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental.

EM: esclerosis múltiple.

H-E: hematoxilina-eosina.

i.p.: inyección intraperitoneal.

MBP: proteína de mielina básica.

MOG: glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos.

NO: neuritis óptica.

OCT: *TissueTeck*.

PBS: tampón fosfato salino.

PFA: paraformaldehido.

PLP: proteína proteolipídica de la mielina.

PP: primaria-progresiva.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RP: recurrente-progresiva.

RR: recurrente-reminente.

SD: desviación estándar.

SNC: sistema nervioso central.

SP: secundaria-progresiva.

TUNEL: *Terminal dUTP Nick-End Labeling*

INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa autoinmune adquirida, caracterizada por un proceso crónico de desmielinización inflamatoria que afecta de forma específica al sistema nervioso central (SNC) [1-6]. Es mediada por el ataque del sistema inmune a través de células T, contra antígenos del SNC. Hay destrucción o daño de la vaina de mielina (desmielinización), pérdida de oligodendrocitos y neuronas lo que lleva al aumento de la disfuncionalidad neurológica [6-9].

Es una enfermedad neurológica que afecta a adultos jóvenes entre los 20 y 40 años con doble incidencia en mujeres que varones. [10]. La patogénesis de la EM no es del todo conocida y aunque su etiología no está todavía establecida se relaciona con causas ambientales, genéticas y hormonales [4,7]. Por lo tanto es considerada una enfermedad multifactorial donde diversos factores pueden influir en el aumento de la susceptibilidad [11,12]. Los síntomas varían porque la localización de las lesiones desmielinizantes y magnitud de cada ataque puede ser diferente. Las lesiones desmielinizantes se encuentran con mayor frecuencia en el nervio óptico, tronco encefálico, médula espinal y en las regiones periventriculares del cerebro. Estas lesiones se manifiestan clínicamente con alteración de la visión, mareos, fatiga muscular, dolor y déficit sensorial y, en ocasiones también pueden darse síntomas psicológicos [13].

La EM clásicamente se considera como una enfermedad inflamatoria cuya principal característica fisiopatológica es la formación de placas desmielinizantes en el SNC. La combinación de factores ambientales con la predisposición genética de cada individuo lleva a la aparición de clones de linfocitos T autorreactivos en el torrente sanguíneo y a una desregulación de los procesos inflamatorios. Se produce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, que llegan al cerebro y acaban activando la microglía, acelerando así el deterioro neuronal [16,17]. La relación entre la inflamación y la desmielinización es muy estrecha, ya que son los mecanismos inflamatorios, como anticuerpos, células T, macrófagos y sus productos, los que conllevan al daño agudo axonal y a la desmielinización [18]. La formación de la placa desmielinizante es el estadio final de varios procesos patológicos que incluyen: disrupción de la barrera hematoencefálica, inflamación multifocal, desmielinización, remielinización, pérdida y depleción de oligodendrocitos, gliosis reactiva y degeneración axonal y neuronal [16, 17], que dan lugar a un aumento en la discapacidad neurológica [6-9]. La desmielinización y la inflamación provocan una disminución en la conductancia de los nervios, inducen la liberación de mediadores tóxicos inflamatorios y activan mecanismos de daño mitocondrial y oxidativo. El daño directo a las neuronas ocurre por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), producidas por la microglía al producirse la disfunción mitocondrial [4,18].

El curso de la enfermedad varía, pudiendo encontrarse diferentes formas de EM. La más habitual es la forma en brotes o recurrente-reminente (RR) la cual puede llegar a evolucionar a una forma secundaria-progresiva (SP). Cuando hay un deterioro gradual sin presencia de brotes hablamos de EM primaria-progresiva (PP), siendo ésta la forma más agresiva de EM. Está descrita una cuarta forma de la enfermedad defendida por varios autores cuyo curso está caracterizado por un inicio progresivo con presencia de brotes con o sin recuperación completa, la recurrente-progresiva (RP) [4, 10, 13, 14, 15].

A pesar de que en la actualidad no existe un tratamiento que cure definitivamente la enfermedad, existen tratamientos que se centran en características patológicas de la

EM tales como la inflamación, la desmielinización y el daño axonal, sin resultados definitivos, pero que ayudan a regular los síntomas, y enlentecer la progresión de la enfermedad, lo que hace mejorar la calidad de vida que el paciente pueda tener [19].

Con el objetivo de estudiar más a fondo los mecanismos de la EM y sus posibles tratamientos, se han desarrollado diversos modelos animales, fundamentalmente en ratones. La encefalitis autoinmune experimental (EAE) que se trata de un desorden autoinmune inflamatorio del sistema nervioso central cuyas características y evolución clínica se relacionan con lo descrito en los pacientes con EM [20]. La EAE puede ser inducida en algunas cepas de ratones por inmunización con péptidos que contienen secuencias concretas de derivados de la proteína de mielina básica (MBP), glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) y la proteína proteolípídica de la mielina (PLP) [21, 22]. De los diferentes tipos de inducción de EAE, los más comunes se basan en la inyección de un péptido, MOG₃₅₋₅₅, que es considerado el mejor antígeno causante de EAE, crónica y no remitente, ya que aproximadamente el 50% de los pacientes son positivos para el anticuerpo anti-MOG [23]. En la EAE al igual que en la EM, la edad, el género, los factores ambientales y cambios hormonales también influyen en la susceptibilidad, desarrollo y severidad de la enfermedad [24].

Está descrito que la disfunción visual es uno de los síntomas frecuentes en pacientes enfermos de EM [25]. Ya que se presenta en el 20% de los casos [26]. La atrofia e inflamación de la retina junto a la neuritis óptica son los responsables de las alteraciones oculares. Se denomina neuritis óptica (NO) a la inflamación del nervio óptico que puede alterar la transmisión de la señal luminosa, lo que conduce a alteraciones en la visión [25, 27]. En el modelo MOG-EAE está ampliamente descrito, alteraciones en el nervio óptico que se deben a la desmielinización y daño axonal, desembocando en la degeneración del nervio óptico [25].

Uno de los principales componentes de la retina son las células ganglionares (CG) que son neuronas cuyos axones se prolongan formando el nervio óptico y que se encuentran formando la capa más interna de la retina. La retina está formada por diferentes subcapas, bien diferenciadas, las cuales se componen de células receptoras de luz y células transmisoras del impulso nervioso, que es la capa nerviosa del globo ocular. Las células transmisoras del impulso lo mandan al cerebro a través del nervio óptico, por tanto la atrofia retiniana está relacionada con la disminución de CG. Esta disminución de CG produce el adelgazamiento del nervio óptico lo cual altera la transmisión de la señal luminosa produciéndose disfunciones en la visión. Está descrito que en el modelo animal de MOG-EAE existe una disminución significativa en el número de CG en individuos con EAE que presentan NO [28-30].

En los últimos años se ha demostrado que la naturaleza es una excelente fuente de recursos para el hallazgo de nuevos compuestos farmacológicos. El ácido oleanólico (AO) es uno de esos recursos. Este compuesto es un triterpeno pentacíclico que se puede encontrar en la oliva o aceite de oliva, empleado como principal fuente de grasa en la dieta mediterránea (Figura 1).

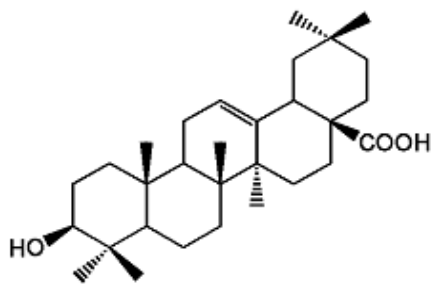


Figura 1. Estructura molecular del ácido oleanólico.

Se ha demostrado que el ácido oleanólico puede presentar acciones inmunomoduladoras, y se ha empleado en el tratamiento de la hepatitis B, como terapia adjunta para la prevención de la hepatotoxicidad, y de la hipertensión, por su capacidad anti-diurética y sus efectos antioxidantes y antihiperlipidémicos [31, 32]. También se ha demostrado que el AO posee propiedades vasodepresoras, cardiotónicas y antidisrímicas [33]. Otros estudios con modelos animales de EM demostraron que el AO presenta acciones inhibitorias sobre el componente inflamatorio y humoral de la enfermedad [34]. Este compuesto que se encuentra al alcance de todos y que presenta acciones tan importantes y relevantes en varias patologías inflamatorias, podría tener una gran relevancia como profiláctico o terapéutico en patologías con componente inflamatorio

El objetivo del trabajo ha sido estudiar la afectación ocular en un modelo murino experimental de esclerosis múltiple, la encefalitis autoinmune experimental (EAE), y caracterizar el efecto protector del ácido oleanólico. Se intentará demostrar en un modelo *in vivo* EAE la existencia de la disminución en el número de CG, la pérdida y la desmielinización de axones, y se tratará de identificar en nervio óptico y retina: estrés oxidativo, muerte celular y neurodegeneración axonal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimentación animal: estudios in Vivo

Los ratones utilizados fueron hembras C57BL/J6 provenientes de los laboratorios del Dr. Charles River (Barcelona). Los animales se mantuvieron en el animalario del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, fueron alimentados con una dieta de pienso y cuidados según las directrices sobre el uso de animales en Investigación ocular de “Association for Research in Vision and Ophthalmology” (ARVO), y las normas de protección de los animales de investigación en vigor en España (RD 53/2013). Los protocolos del estudio fueron aprobados por el comité de Ética de investigación animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, cumpliendo la normativa 86/609/ECC de la comunidad Europea y la legislación que regula la investigación animal (BOE252/34367-91, 2005).

Modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE).

El modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE) fue inducida en ratones hembra del linaje C57Bl/6J de 6-8 semanas, que se caracteriza por una parálisis ascendente progresiva crónica. La enfermedad se indujo mediante una inyección bilateral en la base de la cola con un péptido de la mielina de oligodendrocitos de rata (MOG₃₅₋₅₅) - una mezcla de 100 µg de MOG₃₅₋₅₅ emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) y conteniendo 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (H37 RA). El péptido MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), fue sintetizado por el laboratorio del Dr. F. Barahona (CBM, Madrid). Los animales recibieron además dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 300ng de *toxina pertussis*, una administrada en el día de la inmunización y otra a las 48 horas post-inducción. Los animales se examinaron diariamente, monitorizándose la pérdida de peso y la aparición de los síntomas motores.

Los ratones fueron divididos en diferentes grupos experimentales: control sano, ratones EAE y ratones EAE tratados con ácido oleanólico.

Tratamiento con ácido oleanólico

El AO se disolvió en 2% w/v dimetilsulfóxido (DMSO) y en PBS para cada experimento, siendo la concentración final de DMSO de 0,2%. Los ratones fueron tratados diariamente con una inyección intraperitoneal de 0,2% de DMSO o 50mg/kg/día de AO durante 35 o 45 días antes del sacrificio.

Análisis diario de los síntomas

Fue realizado diariamente el examen del peso y aparición de los síntomas motores clasificándolos de la siguiente manera:

0	Sin síntomas aparentes.
0,5	Debilidad o pérdida del tono de la cola.
1,0	Atonía de la cola.
1,5	Paresia (debilidad o flaqueza motora) de patas traseras.
2,0	Parálisis moderada parcial de patas traseras.
2,5	Parálisis parcial de las extremidades traseras
3,0	Parálisis total de patas traseras.
3,5	Parálisis moderada de patas delanteras.

- 4 Parálisis total de patas delanteras. Tetraplejía.
- 5 Estado moribundo o de muerte.

Para el sacrificio, los ratones fueron anestesiados por inyección i.p. de una mezcla de Clorhidrato de Ketamina (100 mg/Kg; Ketolar Parke-Davis S.A., Barcelona, España) y de Clorhidrato de Xylacina (10 mg/kg; Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Alemania). El sacrificio se realizó a 35 o 45 días post-inmunización, momento en el cual los animales presentaban síntomas severos de la enfermedad.

Estudio histológico

Los animales se anestesiaron con Ketamina (100 mg/kg) y Xylacina (10 mg/kg), y se les abrió la cavidad torácica. Se les intubó la aorta para el lavado con suero salino. A continuación fueron perfundidos con paraformaldehído tamponado al 4%.

El nervio óptico y el globo ocular fueron extraídos inmediatamente después de la perfusión. Las muestras para microscopía óptica se fijaron en paraformaldehído (PFA) tamponado al 4% durante 24 horas, posteriormente se lavaron en tampón fosfato 0.1 M durante 24 horas a 4^o C.

El análisis histológico se realizó mediante la utilización de varias tinciones. Tras la fijación en PFA, los diferentes tejidos fueron incluidos en parafina o en *TissueTeck* (OCT) y se congelaron a -80^oC.

Antes de la inclusión en parafina, las muestras de tejido se procesaron realizando una deshidratación con alcoholes en orden creciente, y una primera inclusión en parafina utilizando un procesador de tejidos (Leica TP 1020, Cat.no- 0704 37101, LeicaMcosystems, Nussloch, Alemania). La inclusión definitiva se realizó en un dispensador de parafina (Oxford Trade, Casa Álvarez, Madrid)

Hematoxilina & Eosina (H-E):

Se obtuvieron cortes de 7 µm de espesor en un microtomo tipo Minot. Al realizar dichos cortes se fueron escogiendo los más próximos a la papila del nervio óptico, desechando los cortes más periféricos.

Para realización de la tinción H-E, las muestras de tejido fueron sumergidas en xilol para desparafinar, seguido de una batería de alcoholes de concentración decreciente para su hidratación. A continuación, para las secciones se tiñeron durante 10 minutos en Hematoxilina Caracci (tinción nuclear), se lavaron, y se tiñeron con Eosina (tinción citoplasmática) durante 2 minutos. Tras la coloración, se lavaron con agua, se deshidrataron con una batería de alcoholes de concentración creciente y por último, se aclararon con xilol. El montaje se realizó con Entellán, medio soluble en xilol (ref. 1.07961.0500, Merck, España).

Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio óptico Olympus BX-41 con una cámara Olympus DP-20 incorporada (Olympus optical Co. LTD, Tokio, Japón). Se escogieron para el análisis los cortes que incluían la papila del nervio óptico, o en su defecto, fueron seleccionados los cortes más próximos a la zona de la papila del nervio óptico. Se utilizó el software Cell^A (Diagnostic 14 Instruments, SterlingHeights, MI, USA) y se evaluó el número de células ganglionares. Las medidas del número de células ganglionares (CG) se tomaron en tres zonas de cada muestra, de modo bilateral a la papila: anterior (próxima a la ora serrata), medio y posterior (próximo a la papila del nervio óptico) como se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Globo ocular de un ratón sano donde se indican las zonas de contaje a un lado de la papila.

Histoquímica

Estrés oxidativo

Para medir los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) se emplearon dos sondas: el dihidroetidio (DHE) ($2 \times 10^{-6} \text{M}$) para el anión superóxido y la sonda 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFHDA) ($10 \mu\text{M}$) para el peróxido de hidrógeno. El DHE se oxida por el anión superóxido produciendo etidio, compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia. La sonda DCFHDA es permeable a la membrana y, una vez dentro de la célula, se oxida en presencia de ROS dando lugar al compuesto fluorescente 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) [35-37].

La detección de ROS en muestras de tejido, se realizó en tejido en parafina y OCT. Las muestras se lavaron con KHB-HEPES para retirar la parafina u OCT y se incubaron durante 30 minutos a 37°C , en KHB-HEPES. Tras secar las muestras, se incubaron con la respectiva sonda durante 30 minutos a 37°C , siempre en oscuridad. Las muestras se cubrieron con medio de montaje acuoso (gervatol) y se protegieron con un cubre-objetos.

Terminal deoxyribonucleotidyl Transferase-mediated dUTP-fluorescein 15 Nick-End Labeling (TUNEL)

La apoptosis o muerte celular programada de las células de la retina fue marcada mediante la técnica de TUNEL "Terminal deoxyribonucleotidyl Transferase-mediated dUTP-fluorescein 15 Nick-End Labeling" (ref.-G 3250, Promega, Barcelona, España). Esta técnica consiste en la unión, mediante enzimas transferasas, de nucleótidos marcados con fluorescencia en los extremos 3' OH libres del DNA fragmentado. Previamente hay que someter a las muestras a una digestión enzimática para permeabilizar la membrana plasmática y nuclear y así hacer accesible el DNA a las enzimas transferasas.

La técnica de TUNEL se realizó mediante un Kit comercial, en cortes en parafina de globo ocular, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se desparafinaron en xilol y se hidrataron en una serie de baños decrecientes de alcoholes, se incubaron con NaCl al 0,88% durante 5 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 minutos con proteinasa K ($20 \mu\text{g/ml}$) a temperatura ambiente.

Las muestras se lavaron con PBS, se aplicó la solución tampón de equilibrado durante 5 minutos y se incubó en la solución de trabajo de la enzima durante 1h a 37°C, parándose posteriormente la reacción con la solución SSC20x (1:10). A continuación se volvió a lavar con PBS y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con DAPI. Se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos, se cubrieron con el medio de montaje Vectashield. El objetivo de esta técnica fue el de evaluar la presencia de células apoptóticas tanto en la capa de células ganglionares como en el resto de las capas de la retina.

FluoroJade C

Mediante la técnica de FluoroJade C se determinó la neurodegeneración [38]. El marcador específico FluoroJade C es un fluorocromo aniónico que se generó con el fin de identificar las neuronas que mueren en el sistema nervioso central [45].

La tinción se realizó mediante un Kit comercial, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (AAT Bioquest). Una vez rehidratadas las muestras, fueron incubadas en una solución de permanganato de potasio al 0,06% durante 10 minutos y se lavaron en agua destilada durante 2 minutos. A continuación, las muestras se incubaron en la solución de 0,0001% de FluoroJade C disuelta en ácido acético al 0,1% y fueron lavadas en agua destilada tres veces durante 1 minuto. Tras secar las muestras en la estufa a 50°C, durante 5 minutos, se aclararon durante 1 minutos en xilol, fueron cubiertas con medio de montaje permanente (EUKITT®) y se protegieron con un cubreobjetos.

Tras las tinciones, los cortes se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i (Nikon Instruments, Inc., Amstelveen, the Netherlands) o en un Olympus B-H (Olympus optical Co. LTD, Tokio, Japan), donde se tomaron fotos con la cámara incorporada (Nikon Instruments Inc) en las mismas condiciones para los tres grupos experimentales.

Análisis en microscopio electrónico

Tras la fijación con PFA, las muestras fueron postfijadas con OsO₄ tamponado al 1% 0.1 M Ph= 7,4 de media hora a dos horas. Se lavaron con agua destilada y se procesaron realizando una deshidratación con acetonas en orden creciente. Para la infiltración se utilizó óxido de propileno. Después fueron incluidos en resina (SPURR). Posteriormente se obtuvieron cortes semifinos de nervio óptico (LKB ultramicrotomo) transversales correspondientes al nervio óptico en los que se diferenció zona proximal y distal teñidos con azul de toluidina (AT) al 1%-tetraborato sódico al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los cortes fueron visualizados en el microscopio óptico (Olympus BX-41) y se contaron las secciones axonales y el número de células presentes. Tras observar diferencias relacionadas con la enfermedad se eligieron los mejores cortes y se hicieron cortes ultrafinos de nervio óptico. Las preparaciones se visualizaron con el microscopio electrónico JEOL JEM-101HR (Jeol Ltd Tokyo, Japan). Las fotografías se realizaron con un dispositivo de carga acoplada (Gatan, Erlangshen ES1000W) y las fotografías digitales se realizaron con el programa *1.71 Digital Micrograph* de la Unidad de Microscopía del Parque Científico de la Universidad de Valladolid.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software *GraphpadPrismversion 4.0* (San Diego, CA, USA), utilizando el test de análisis de varianza (ANOVA). La comparación de los parámetros de los axones, los axones desmielinizados, el grosor

del nervio óptico y la comparación del número de células ganglionares en los diferentes grupos experimentales han sido realizadas por *One-way ANOVA*. Fue llevado a cabo un análisis posterior mediante la prueba Bonferroni de comparaciones múltiples. Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar (SD); los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

La primera parte del estudio se centró en el análisis de la capa de células ganglionares presentes en la retina, en el número de axones, grado de desmielinización axonal y grosor de la vaina de mielina que recubre los axones presentes en el nervio óptico. Todo ello estudiado en muestras de nervio óptico y retina.

Evaluación del número de células ganglionares de la retina

El estudio del número de células ganglionares de la retina se llevó a cabo en los tres grupos experimentales: ratones sanos (n = 5), ratones enfermos EAE (n = 6) y ratones tratados con AO (n = 5). El análisis se realizó en tres campos (anterior, medio y posterior) a cada lado de la papila en el globo ocular de cada uno de los muridos.

En las imágenes (Figura 3) se aprecia el aspecto de la retina y su capa de células ganglionares en animales sanos, enfermos y tratados con AO en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina.

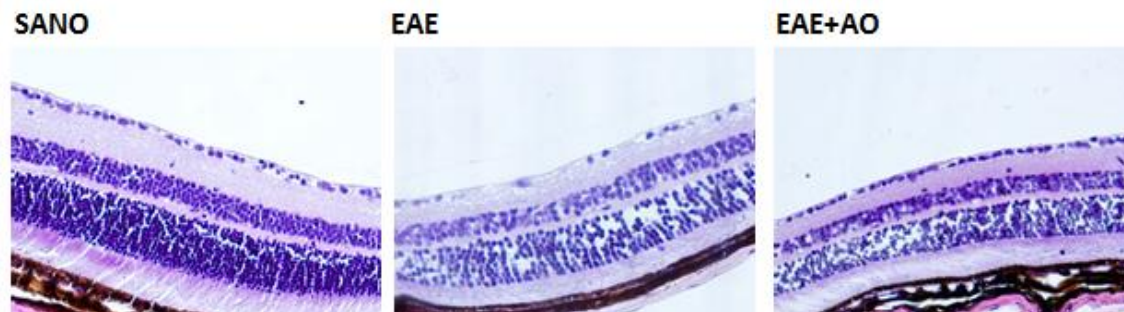


Figura 3. Capa de células ganglionares de la retina de ratón teñidas con hematoxilina-eosina visualizada con un microscopio óptico Olympus BX-41 a 20x.

Se observa una disminución en el número de CG en el animal enfermo, mientras que en los animales tratados con AO se puede observar que la capa de CG es similar a la de los animales control.

En la siguiente tabla (Tabla1) se muestran las medias de los datos obtenidos en la cuantificación en los diferentes grupos experimentales de forma bilateral a la papila y en tres campos diferentes.

	DERECHA			IZQUIERDA		
	ZONA A	ZONA B	ZONA C	ZONA A	ZONA B	ZONA C
SANO	31,27±9,16	40,27±6,66	41,09±5,29	26,5±0,7	30±1,41	33,5±0,7
EAE	18,09±7,97	19,31±8,68	18±8,47	19,52±6,08	25,34±7,08	25,05±6,5
EAE+AO	26,09±8,32	38,09±6,60	39,22±6,11	37±9,24	49,62±27,23	55,14±32,4

Tabla 1. Valores medios del número de células ganglionares ± desviación estándar (SD), obtenidas en los tres grupos experimentales, de forma bilateral a la papila y en tres campos: anterior (zona A), medio (Zona B) y posterior (zona C).

Se pueden observar diferencias entre los diferentes grupos de ratones en cada campo analizado. Los ratones enfermos (EAE) presentan una marcada disminución en cuanto al número de CG en las tres zonas examinadas en comparación a los animales sanos, mientras que las CG en los animales tratados con AO no disminuyen, de forma que tienen niveles similares que las CG observadas en ratones sanos. Además se unificaron los contajes (derecha + izquierda) y se realizó el análisis estadístico de los resultados por campos.

En la Figuras 4, 5 y 6 se muestra la representación gráfica de los datos correspondiente a la Tabla 1 en la que se han agrupado los valores de la zona izquierda y derecha de la papila.

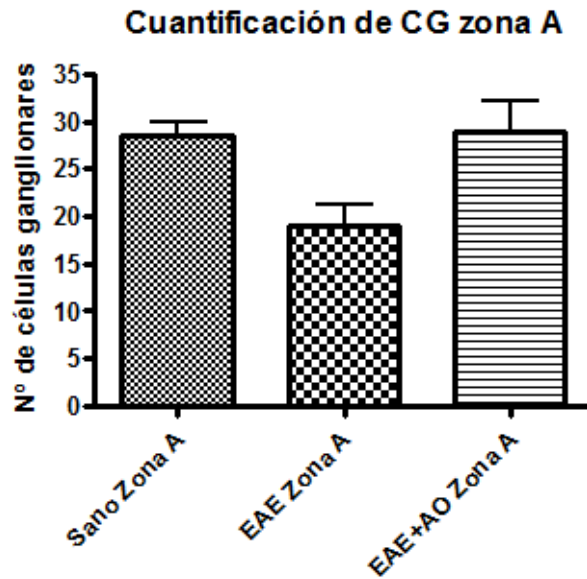


Figura 4. Número de células ganglionares en la zona anterior (zona A).

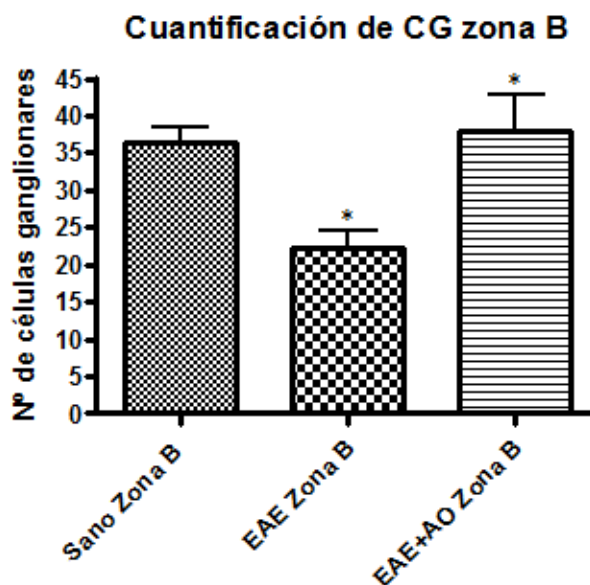


Figura 5. Número de células ganglionares en la zona media (zona B). Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por * $p \leq 0,05$.

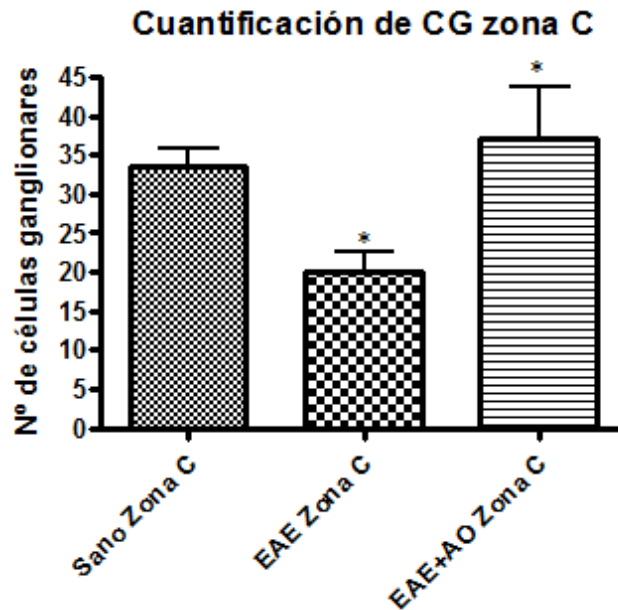


Figura 6. Número de células ganglionares en la zona posterior (zona C). Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por * $p \leq 0,05$.

Se observaron diferencias significativas en la zona media de la papila, existiendo significación estadística en la disminución de CG en animales EAE con respecto al grupo de animales sanos ($p \leq 0,05$) y alta significación en la no disminución de células ganglionares del grupo EAE tratado con AO frente al grupo EAE ($p \leq 0,01$). Algo similar ocurrió en la zona posterior donde se pudo observar que el número de CG es menor en los individuos enfermos que en los sanos y que en los enfermos tratados con AO ($p \leq 0,05$). Además, se apreció que el número de CG en los individuos tratados se asemeja al de los sanos ($p \leq 0,01$). En la zona anterior de la retina aunque se observó un perfil similar: disminución de CG en los animales EAE en comparación con los sanos y con los EAE tratados con AO, los valores obtenidos no alcanzaron una significación estadística ($p \geq 0,05$).

En conjunto, unificando las tres zonas, se observó que el número de CG es menor en los individuos EAE que en los sanos o tratados con AO. Por otro lado, se pudo ver que el número de CG en los individuos tratados se asemejaba al de los sanos (Figura 7).

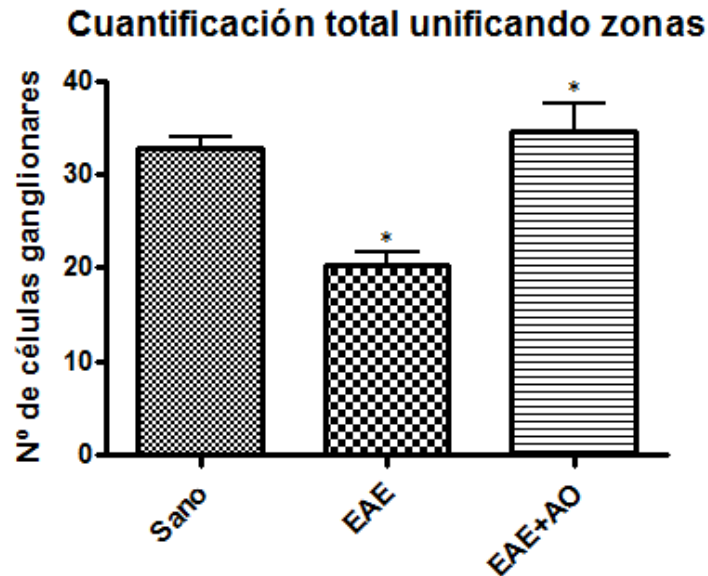


Figura 7. Número total de células ganglionares para cada grupo experimental. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por * $p \leq 0,05$.

Agrupando los datos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tres grupos experimentales. La disminución del número de CG en individuos EAE es estadísticamente significativa en comparación al grupo de animales sanos ($p \geq 0,01$) y en los animales tratados con AO también se observó significación estadística en comparación al grupo de animales EAE ($p \geq 0,01$).

Cuantificación del número de axones en el nervio óptico

En fotografías de corte transversal de nervio óptico a microscopía electrónica de transición (MET) se realizó el análisis del número de axones en una superficie determinada de $1142,64 \mu\text{m}^2$ en individuos sanos e individuos enfermos para evaluar el impacto de la enfermedad.

En las siguientes imágenes (Figura 8) se puede observar a simple vista la pérdida axonal y la disminución del grosor de la vaina de mielina en el grupo EAE no tratado.

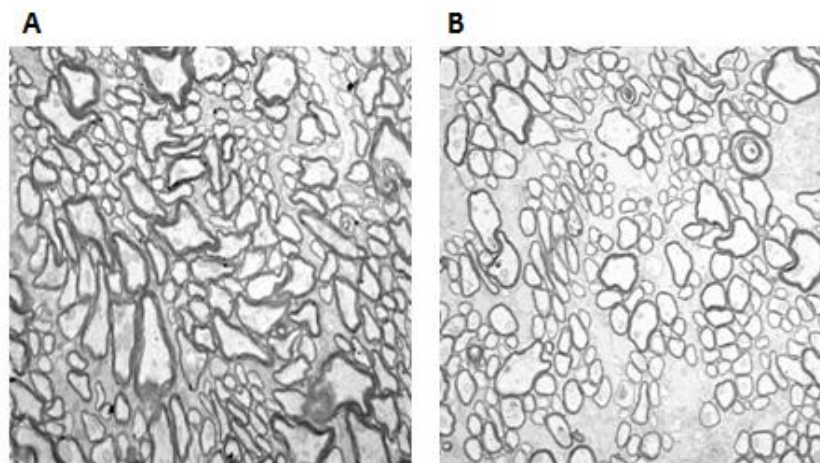


Figura 8. Imágenes representativas de cortes transversales de nervio óptico visualizadas con microscopio electrónico. A) de control sano. B) EAE no tratado. Objetivo 5.000x.

Se procedió a cuantificar el número total de axones en 8 cortes de ratón sano ($n = 1$) y 5 cortes de ratón EAE ($n = 1$) en el nervio óptico. No se encontraron diferencias entre animales control y ratones EAE.

A continuación, se realizó el análisis diferenciando entre la porción proximal del nervio óptico, que es la zona más cercana al globo ocular y la porción distal, siendo esta la zona más alejada del globo ocular. Se compararon ambas zonas en un ratón del grupo de animales sanos y un ratón EAE mediante cuantificaciones realizadas en 5 imágenes tomadas de cada zona con un objetivo de 20.000x y referidas a un área de $114,24 \mu\text{m}^2$.

Los datos obtenidos de la cuantificación del número de axones quedan reflejados en la Tabla 2 y en la Figura 9.

Cuantificación de axones

Sano Proximal	EAE Proximal	Sano Distal	EAE Distal
$51,5 \pm 6,89$	$67,6 \pm 8,41$	$62,6 \pm 10,3$	$61,6 \pm 9,96$

Tabla 2. Valores medios del número de axones obtenidos de los cortes transversales de nervio óptico visualizados al microscopio electrónico \pm SD.

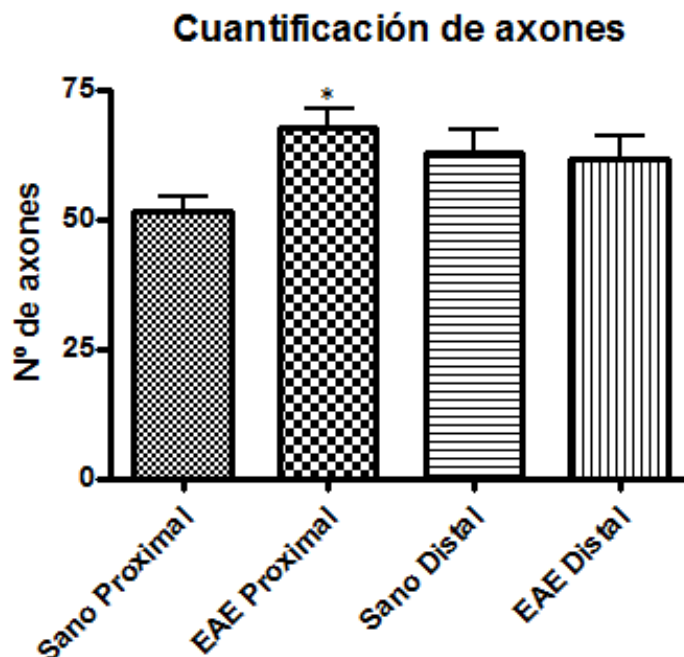


Figura 9. Representación gráfica del número de axones en cortes transversales de nervio óptico diferenciando entre porción distal y proximal. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $*p \leq 0,05$.

No se observaron diferencias en la porción distal, mientras que en la porción proximal existen diferencias estadísticamente significativas entre la media de las cuantificaciones.

Cuantificación del número de axones desmielinizados en el nervio óptico

Axón desmielinizado es aquél en el que la capa de mielina se encuentra casi totalmente deshecha y despegada del axón. Siguiendo este criterio las cuantificaciones del número de axones desmielinizados se realizó en las mismas imágenes y condiciones en las que se realizó el estudio de la pérdida axonal (Figura 10).

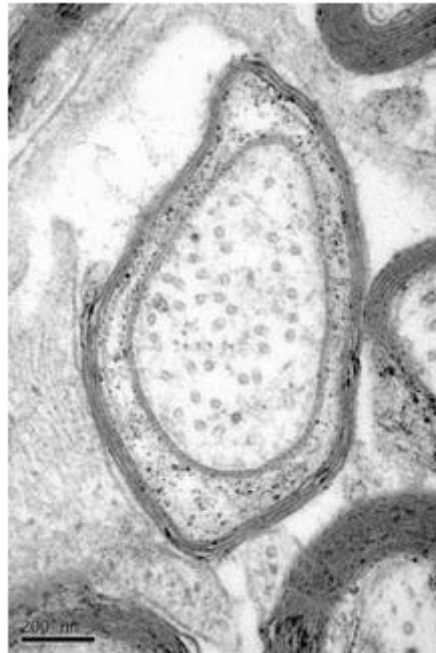


Figura 10. Aspecto que presenta un axón en proceso de desmielinización. Objetivo 120.000x.

Los resultados obtenidos en la cuantificación del número de axones desmielinizados quedan reflejados en la Tabla 3 y la Figura 11.

Cuantificación de axones desmielinizados

Sano Proximal	EAE Proximal	Sano Distal	EAE Distal
2 ± 0,63	4 ± 1,87	1,2 ± 1,1	3,4 ± 1,94

Tabla 3. Valores medios del número de axones desmielinizados obtenidos de los cortes transversales de nervio óptico visualizados al microscopio electrónico ± SD.

Quantificación de axones desmielinizados

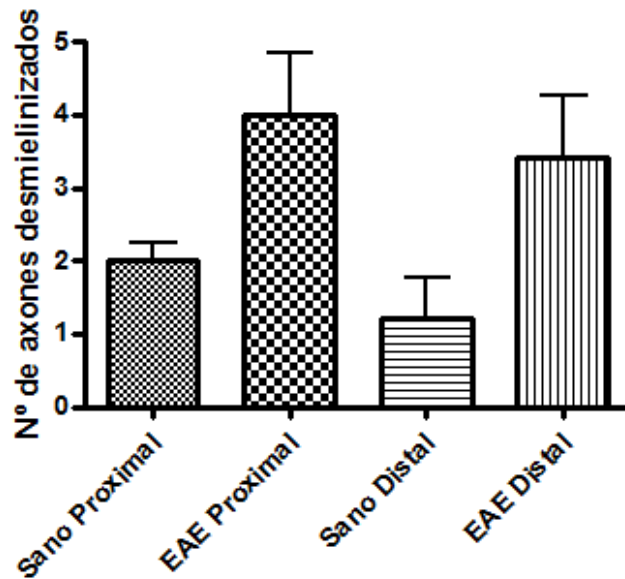


Figura 11. Representación gráfica del número de axones desmielinizados en cortes transversales de nervio óptico diferenciando entre porción distal y proximal.

El análisis de datos no reflejó diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los datos. Sin embargo, en la Figura 11 se puede observar la tendencia a la desmielinización en el grupo de animales EAE en comparación al grupo de animales control tanto en la porción distal como en la proximal.

Cuando se unificaron los datos obtenidos de las dos zonas del nervio óptico, las diferencias observadas alcanzaron significación estadística (Figura 12).

Total de axones desmielinizados

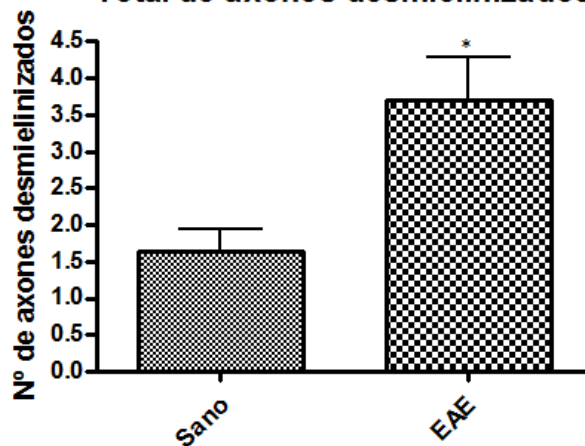


Figura 12. Representación gráfica del número de axones desmielinizados en cortes transversales de nervio óptico. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $*p \leq 0,05$

Se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en el número total de axones desmielinizados ($p \geq 0,05$).

Grosor de la vaina de mielina

Se realizaron estudios sobre la medida del grosor de la vaina de mielina que rodea los axones del nervio óptico para analizar la existencia de una disminución en el espesor de la vaina de mielina en los individuos con EAE, como plantea la hipótesis de partida.

Para llevar a cabo este estudio las medidas fueron tomadas en imágenes realizadas a 100.000x referidas a un área de 4,569 μm^2 en cada una de las porciones del nervio óptico. Se comparó entre el grupo de ratones sanos y el de ratones EAE.

En la Tabla 4 y Figura 13 quedan reflejados los datos obtenidos de la toma de medidas de la vaina de mielina en la porción proximal y la porción distal.

Grosor de la vaina de mielina

Sano Proximal	EAE Proximal	Sano Distal	EAE Distal
83,01 \pm 21,46	79,93 \pm 28,84	127,22 \pm 32,31	79,82 \pm 24,27

Tabla 4. Valores medios del grosor (nm) de la vaina de mielina que recubre los axones que forman el nervio óptico \pm SD.

Los datos reflejaron la diferencia de grosor de la vaina de mielina entre la porción proximal y la porción distal, lo que confirma la validez del criterio tomado a la hora de realizar este estudio, ya que el nervio óptico se mieliniza a la salida del globo ocular. Además, se observa una marcada disminución del grosor de la vaina de mielina en individuos EAE en comparación con el grupo sano en la zona distal.

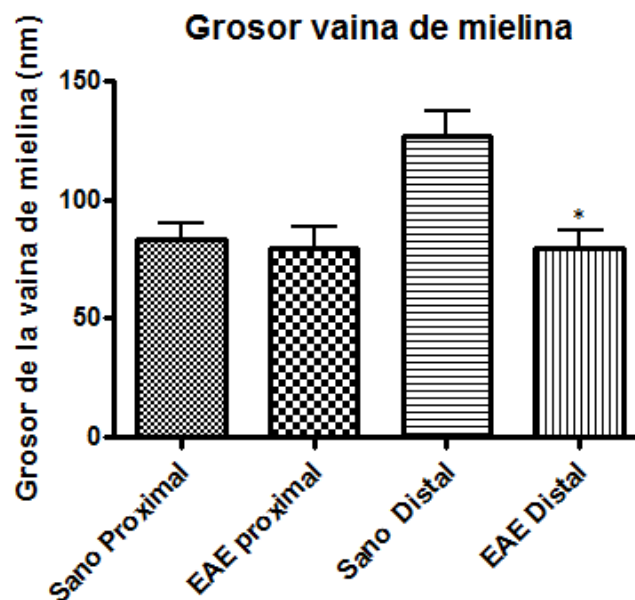


Figura 13. Representación gráfica del grosor de la vaina de mielina que recubre los axones que forman el nervio óptico, en cortes transversales de nervio óptico diferenciando entre porción proximal y distal. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por $*p \leq 0,05$.

Tras el análisis de datos se pudo comprobar que las diferencias reflejadas por los datos en la porción distal eran significativas ($p \leq 0,05$). Esto indica que en el modelo experimental de esclerosis múltiple existe una afectación en el grosor de la vaina de mielina en la porción distal del nervio óptico. En la porción proximal no se encontraron diferencias entre las medias de las medidas tomadas.

Evaluación de apoptosis en la retina

Se quiso evaluar el número de células apoptóticas existentes tanto en la capa de células ganglionares como en el resto de capas que forman la retina, para ello se realizó la técnica de TUNEL en cortes de tejido ocular.

No se obtuvieron resultados positivos tras la aplicación de la técnica del TUNEL. La muerte celular por apoptosis debe de ser un proceso que acontece antes de los 45 días, de ahí que únicamente seamos capaces de detectar la disminución del número de células.

Análisis de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La desregulación de especies las reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) contribuyen a la desmielinización y al daño axonal en pacientes con EM y en el modelo EAE [13, 35]. Varios estudios han demostrado la afectación de las células ganglionares de la retina y del nervio óptico, por un aumento de actividad de ROS [4, 18]. Por ello esta parte del estudio se centró en identificar ROS en nervio óptico y retina.

El estrés oxidativo fue evaluado mediante las sondas específicas para el anión superóxido (O_2^-), el dihidroetidio (DHE), y para el peróxido de hidrógeno, la diclorodihidro-fluoresceína (DCFHDA).

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos en nervio óptico tras la evaluación con la sonda específica para el anión superóxido (O_2^-) DHE.

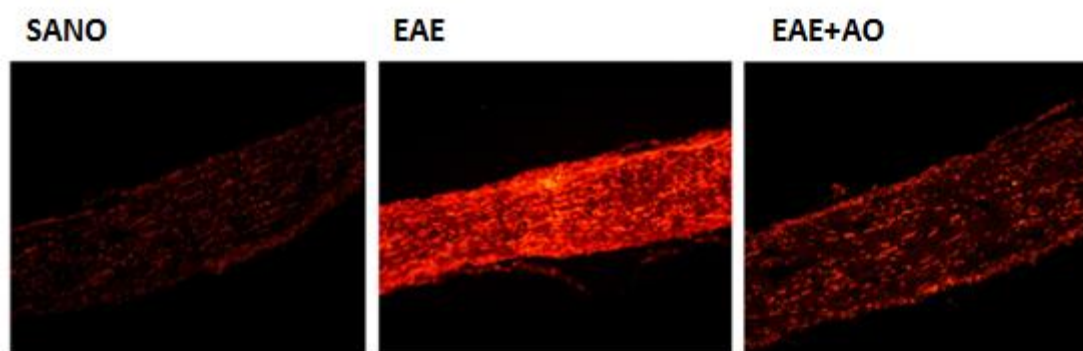


Figura 14. Acumulación de ROS en el nervio óptico de ratones EAE y efecto protector del AO. Secciones de nervio óptico en OCT fueron marcadas con DHE para evaluar el anión superóxido en cada uno de los diferentes grupos experimentales (n=5). Objetivo de 10x.

En las secciones de nervio óptico del grupo de animales EAE se observa un aumento de células positivas para DHE en comparación con los animales del grupo sano. Los

animales enfermos tratados con AO presentaron una disminución de esta fluorescencia, siendo muy similar a la observada en los animales control sanos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en nervio óptico (Figura 15) tras la evaluación con la sonda específica para el peróxido de hidrógeno (DCFHDA).

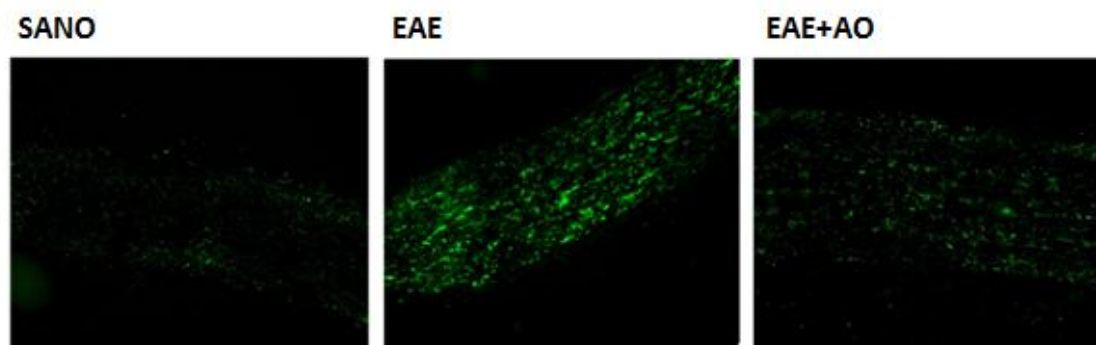


Figura 15. Acumulación de ROS en el nervio óptico de ratones EAE y efecto protector del AO. Secciones de nervio óptico en OCT marcadas con DCFHDA para evaluar la presencia de peróxido de hidrógeno en cada uno de los diferentes grupos experimentales (n=5). Objetivo de 10x.

En consonancia con los resultados obtenidos con la sonda DHE, en el nervio óptico de los animales enfermos tratados con AO se observó una menor fluorescencia con respecto al grupo de animales EAE, y un pequeño aumento de esta misma con respecto a los animales control sanos para la sonda específica del peróxido de hidrógeno DCFHDA.

Las mismas técnicas fueron aplicadas para identificar ROS en retina, las tinciones se realizaron en cortes de globo ocular en OCT, pero debido a la escasez de retina en dichos cortes se probó a realizar las tinciones en cortes de globo ocular en parafina, ya que eran cortes más logrados y con abundancia de retina. Se realizó la tinción con DHE en muestras de los diferentes grupos experimentales en animales de 35 y 45 días post-inducción (Figuras 16,17, 18 y 19).

En las Figuras 16 y 17 correspondientes a retinas de animales a los 35 días post-inducción, no se observaron diferencias entre los distintos grupos experimentales.

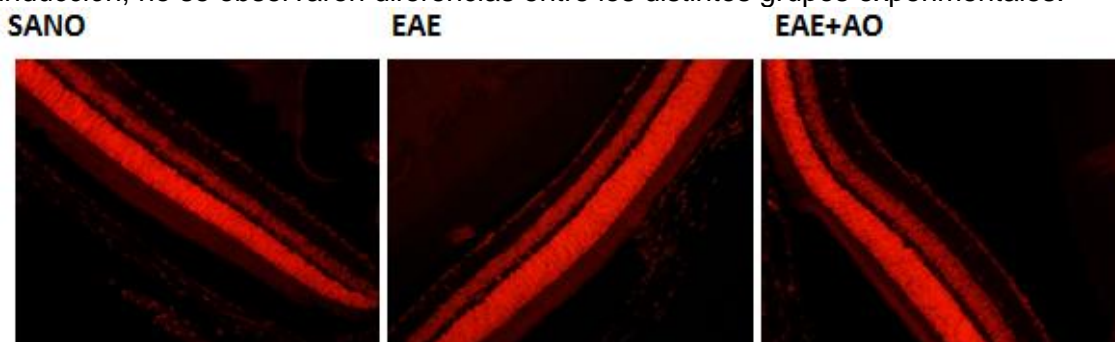


Figura 16. Acumulación de ROS en retina a los 35 días post-inducción. Secciones de retina marcadas con DHE para evaluar el anión superóxido en cada uno de los diferentes grupos experimentales (n=2). Objetivo de 20x.

En la Figura 17 se muestran las capas interiores de la retina, que es la zona donde deberían observarse diferencias.

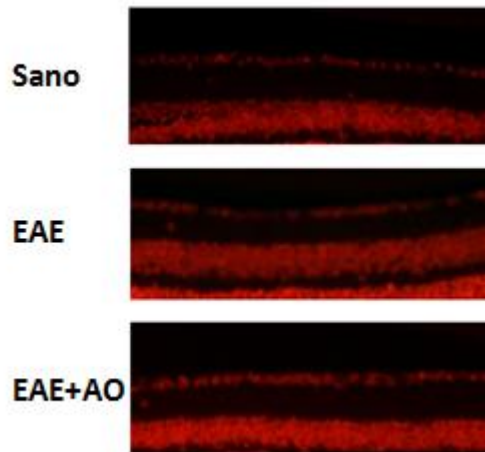


Figura 17. Acumulación de ROS en retina a los 35 días post-inducción. Secciones de interés de retina marcadas con DHE para evaluar el anión superóxido en cada uno de los diferentes grupos experimentales (n=2). Objetivo de 20x

Al no obtener resultados visibles a los 35 días post-inducción, se realizó el mismo estudio a los 45 días post-inducción en todos los grupos experimentales (Figuras 18 y 19).

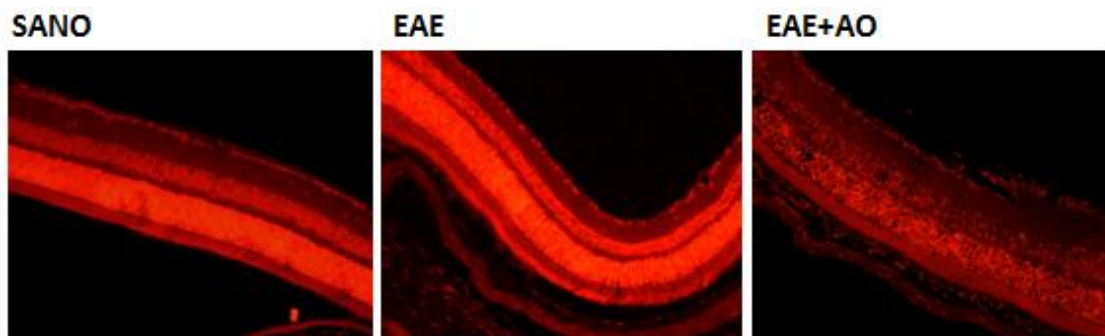


Figura 18. Acumulación de ROS en retina a los 45 días post-inducción. Secciones de retina marcadas con DHE para evaluar el anión superóxido en cada uno de los diferentes grupos experimentales (n=2). Objetivo de 20x.

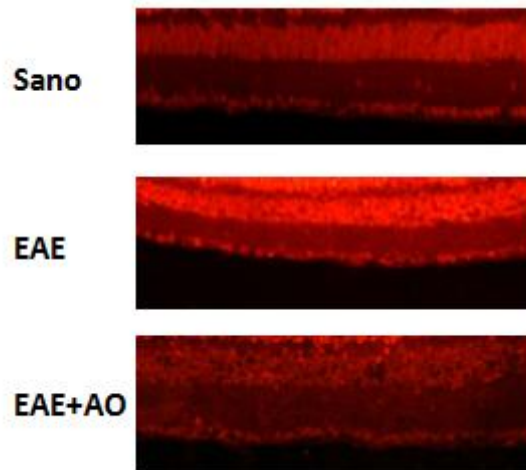


Figura 19. Acumulación de ROS en retina a los 45 días post-inducción. Secciones de interés de retina marcadas con DHE para evaluar el anión superóxido en cada uno de los diferentes grupos experimentales (n=2). Objetivo de 20x.

En el estudio de ROS en la retina de estos ratones sí que se obtuvieron resultados visibles, apareciendo acumulación de ROS en retina de animales EAE no tratados en comparación con el control. En animales tratados con AO se apreció una disminución de la fluorescencia, por lo que se puede decir que el AO aporta un efecto protector en este grupo de animales.

Hay diferencias entre la tinción realizada al grupo de ratones de 35 días post-inducción y la realizada a los ratones de 45 días post-inducción. Se aprecia que la intensidad de la fluorescencia es mayor en el grupo de 45 días post-inducción, lo que indica mayor acumulación de ROS en estos ratones, que se encuentran en un estadio más avanzado de la enfermedad.

En conclusión, se puso de manifiesto un aumento de ROS en el grupo de animales EAE, mientras que en el grupo de animales EAE tratados con AO se percibe una disminución de estas especies reactivas lo que indica el efecto protector que ejerce el AO en la EAE en retina en el grupo de animales de 45 días post-inducción.

Análisis de la neurodegeneración en nervio óptico

Se hizo un análisis para identificar el grado de neurodegeneración axonal mediante el marcaje con FluoroJade C, en nervio óptico.

Los resultados se muestran en la Figura 20.

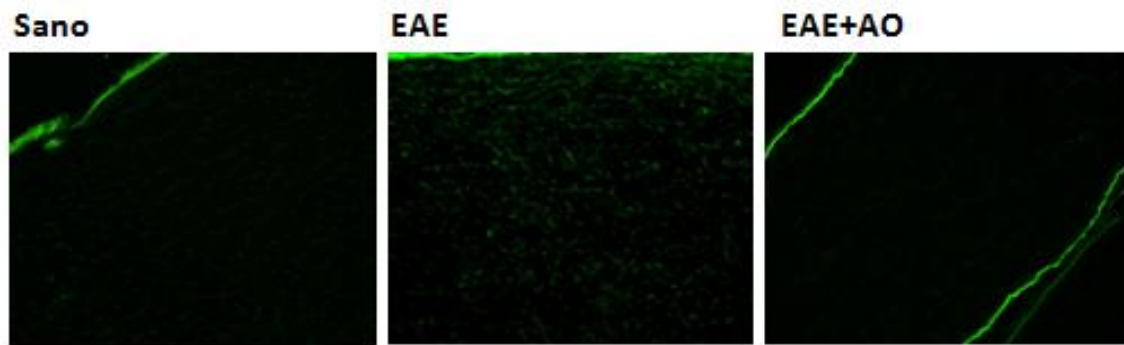


Figura 20. Neurodegeneración en EAE y tratamiento protector con AO.
Visualización de la neurodegeneración en nervio óptico marcado con FluoroJade C.
40x.

En el nervio óptico de los animales enfermos sin tratamiento se observó un aumento del marcaje con FluoroJade C, con respecto a los animales sanos. Este marcaje no se apreció en los animales EAE tratados con AO.

DISCUSIÓN

Este estudio se ha llevado a cabo en un modelo animal murino en el que se ha inducido la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y se ha dirigido a estudiar la afectación ocular de dicha enfermedad. En el globo ocular se ha descrito la disminución en el número de CG, así como la pérdida y la desmielinización de axones en el nervio óptico. Además en el nervio óptico y la retina se ha estudiado: estrés oxidativo, muerte celular y neurodegeneración.

La EM es una enfermedad neurodegenerativa autoinmune considerada como un proceso inflamatorio cuya principal característica fisiopatológica es la formación de placas desmielinizantes en el SNC. Los mecanismos inflamatorios tales como anticuerpos, células T, macrófagos y sus productos es lo que produce el daño axonal y desmielinización. La formación de la placa desmielinizante es el estadio final de varios procesos patológicos, que da lugar a un aumento de la discapacidad neurológica. Además la inflamación y la desmielinización provocan una disminución en la conductancia de los nervios, inducen la liberación de mediadores tóxicos inflamatorios y activan mecanismos de daño mitocondrial y oxidativo. Una de las manifestaciones más observadas en pacientes con esclerosis múltiple es la neuritis óptica, que se debe a un desorden inflamatorio, con pérdida de la visión y dolor ocular[39].

Nuestro trabajo pone de manifiesto que existe una disminución en el número de CG en los individuos con EAE y se puede afirmar que el tratamiento con AO posee un efector protector frente a la pérdida de CG de la retina. Los resultados no se contraponen a lo descrito por otros autores que observan una disminución en el número de CG cuando realizan el estudio en las mismas condiciones experimentales [28, 30].

Por otro lado, el daño axonal y la degeneración neuronal son muy frecuentes en las áreas desmielinizadas y están correlacionadas con el grado de inflamación, siendo la pérdida axonal considerada el principal contribuyente para la no remisión de la discapacidad en EM [40]. En este estudio se ha pretendido poner a punto las aproximaciones experimentales adecuadas para evaluar dichos parámetros. Hemos analizado el grado de daño axonal y desmielinización en un ratón EAE y un animal control. Los resultados obtenidos apuntan que no existen diferencias en cuanto al número de axones presentes en la porción distal del nervio óptico entre animales control y animales EAE y señalan un aumento axonal en la porción proximal contraponiéndose a lo descrito sobre la EM. Sin embargo, los resultados obtenidos del análisis del grado de desmielinización axonal evidencian la existencia de axones desmielinizados solo en individuos EAE a lo largo de todo el nervio óptico, así como una disminución del grosor de la vaina de mielina en la porción distal, lo que concuerda con la anatomía del nervio óptico. Pero no se puede decir que los resultados sean concluyentes debido a la utilización de un tamaño muestral pequeño (n=1), por lo que se debería continuar con el estudio analizando un grupo mayor de animales (incluyendo incluso un grupo de animales EAE tratados con AO) para llegar a resultados definitivos.

Algunos autores afirman que en el modelo de EAE de rata la pérdida neuronal ocurre por dos mecanismos, uno secundario al proceso inflamatorio que ocurre en el nervio óptico, y otro independiente del proceso inflamatorio [41]. Además han demostrado que la inflamación del nervio óptico conduce a la apoptosis de las CG lo que hace pensar que la determinación del grado de inflamación del nervio óptico podría ser un buen indicador del momento en el que comienza el proceso de pérdida de CG,

pudiéndose así establecer el punto ideal en los estudios dirigidos a caracterizar la presencia de células apoptóticas.

Se podría concluir que existe una disminución en el número de CG, así como cierto grado de desmielinización axonal en los individuos con EAE respecto a los sanos, y una prevención en los animales tratados con AO. Las diferencias observadas en cuanto al daño axonal podrían estar asociadas a la presencia de inflamación. Estos resultados indican que probablemente nos encontramos en un estadio cercano al óptimo para el estudio del proceso de afectación retiniana que ocurre en el modelo EAE.

Hay que tener en cuenta además que este estudio es la primera aproximación a la caracterización de la afectación ocular en individuos con el modelo murino de esclerosis múltiple citado y del efecto del AO. Se ha utilizado un tamaño muestral pequeño, por lo que se deberían realizar los experimentos en un mayor número de muestras e insertar nuevas técnicas o métodos de estudio de los diferentes parámetros. También podría ser interesante realizar los experimentos en individuos sacrificados a otros tiempos post-inmunización para determinar el momento en el que comienza la afectación ocular.

Por otra parte, se identificó en nervio óptico y retina: estrés oxidativo, muerte celular y neurodegeneración. De acuerdo con algunos autores, hay múltiples evidencias que indican que el estrés oxidativo es uno de los factores que está implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [43]. Está establecido que el estrés oxidativo es causado por el desequilibrio entre la producción y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden perturbar el equilibrio redóx dentro de las células. Así la producción de ROS por los macrófagos infiltrados y microglía activada contribuye a la vulnerabilidad de la desmielinización axonal [3]. Nuestros resultados muestran una mayor acumulación de ROS en nervios ópticos y también, aparentemente, en retina de animales EAE a los 45 días post-inducción.

En la literatura, está descrito que pacientes y modelos animales con EM presentan muerte celular por apoptosis y neurodegeneración. La técnica de TUNEL es un método sensible a la degradación del DNA asociada a la muerte celular por apoptosis. Diferentes estudios en cerebros de pacientes con EM describen un aumento significativo del número de células apoptóticas - células positivas para TUNEL [44]. En nuestro trabajo no se obtuvieron resultados debido a que la muerte celular debe de ser un proceso que acontece antes de los 45 días.

Otro marcador específico de la degeneración neuronal es el FluoroJade C (FJC). Según *G. Chidlow et al* y *Cardoso et al* es un fluorocromo aniónico que se generó con el fin de identificar las neuronas que mueren en el sistema nervioso central [45, 46]. En nuestro estudio se observó un aumento de la tinción con FluoroJade C en los animales EAE no tratados en muestras de nervio óptico con respecto a los diferentes grupos en experimentación, confirmando un aumento de la degeneración neuronal en los animales EAE. El tratamiento con AO ejerció un efecto protector frente a la neurodegeneración axonal.

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran el papel protector del AO en las manifestaciones degenerativas que afectan al globo ocular quedando evidenciado por la menor producción de ROS, la protección frente a la pérdida de CG y la menor presencia de neurodegeneración axonal.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de la afectación ocular en el modelo experimental EAE y de caracterizar el efecto protector del AO se han elaborado las siguientes conclusiones:

- La capa de CG disminuye en individuos EAE.
- Se produce pérdida del grosor de la vaina de mielina en los axones que forman el nervio óptico llevando a la desmielinización.
- Existe acumulación de ROS en nervio óptico y en células ganglionares de la retina.
- Existe neurodegeneración axonal en el nervio óptico.

Estos síntomas se ven disminuidos en el grupo tratado con AO por lo que se puede concluir que el AO ejerce un efecto protector en la afectación ocular en el modelo experimental EAE y podría ser considerado como una alternativa en terapias frente a la EM.

Estas conclusiones deberán ser validadas realizando los estudios precisos en un número mayor de animales para cada grupo experimental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bahamonde, C., et al., *Elevated melatonin levels in natalizumab-treated female patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Relationship to oxidative stress*. Eur J Pharmacol, 2014. 730C: p. 26-30.
2. Marrie, R.A., *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology*. Lancet Neurol, 2004. 3(12): p. 709-18.
3. Witte, M.E., et al., *Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis*. Trends Mol Med, 2014. 20(3): p. 179-187.
4. Ellwardt, E. and F. Zipp, *Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS*. Exp Neurol, 2014.
5. van Waesberghe, J.H., et al., *Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability*. Ann Neurol, 1999. 46(5): p. 747-54.
6. Lassmann, H., W. Bruck, and C. Lucchinetti, *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends Mol Med, 2001. 7(3): p. 115-21.
7. Singh, V., et al., *Proteomics technologies for biomarker discovery in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2012. 248(1-2): p. 40-7.
8. Lee, D.H., R. Gold, and R.A. Linker, *Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters*. Int J Mol Sci, 2012. 13(9): p. 11783-803.
9. Hernandez-Pedro, N.Y., et al., *Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response*. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 413465.
10. de Andres, C., *[The interest of multiple sclerosis attacks. Physiopathology and therapy]*. Rev Neurol, 2003. 36(11): p. 1058-64.
11. Hedstrom, A.K., et al., *Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis*. Neurology, 2014. 82(10): p. 865-72.
12. Ghezzi, A., *Therapeutic strategies in childhood multiple sclerosis*. Ther Adv Neurol Disord, 2010. 3(4): p. 217-28.
13. Ferreira, B., et al., *Glutathione in multiple sclerosis*. Br J Biomed Sci, 2013. 70(2): p. 75-9.
14. Trapp, B.D. and K.A. Nave, *Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?* Annu Rev Neurosci, 2008. 31: p. 247-69.
15. Lublin, F.D. and S.C. Reingold, *Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*. Neurology, 1996. 46(4): p. 907-11.
16. Boulanger, J.J. and C. Messier, *From precursors to myelinating oligodendrocytes: Contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain*. Neuroscience, 2014. 269C: p. 343-366.
17. Clemente, D., et al., *The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases*. Front Cell Neurosci, 2013. 7: p. 268.
18. 18.31. Hauser, S.L. and J.R. Oksenberg, *The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration*. Neuron, 2006. 52(1): p. 61-76.
19. Carretero JL, Bowakim W, Acebes JM. Multiple sclerosis. Medifam 2001; 11:516-529.
20. 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: 2-50.
21. Denic, A., et al., *The relevance of animal models in multiple sclerosis research*. Pathophysiology, 2011. 18(1): p. 21-9.

22. Ransohoff, R.M., *Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line*. Nat Neurosci, 2012. 15(8): p. 1074-7.
23. Kezuka T, Usui Y, Goto H. Analysis of the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Optic Neuritis. J Biomedic and Biotechnol 2001.
24. Slavin, A., et al., *Induction of a multiple sclerosis-like disease in mice with an immunodominant epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein*. Autoimmunity, 1998. 28(2): p. 109-20.
25. Sakai RE, Feller DJ, Galetta KM, Galetta SL, Balcer LJ. *Vision in Multiple Sclerosis (MS): The Story, Structure-Function Correlations, and Models for Neuroprotection*. J Neuroophthalmol 2011; 31(4):373-362
26. Balcer LJ: *Clinical practice. Optic neuritis*. N Engl J Med 2006; 354:1280-1273.
27. Arnold, A.C. *Evolving management of optic neuritis and multiple sclerosis*. Am. J. Ophthalmol 2005; 139:1108-1101.
28. Meyer R, Weissert R, Diem R, Storch MK, de Graaf KL, Bähr M. *Acute Neuronal Apoptosis in a Rat Model of Multiple Sclerosis*. The Journal of Neurosciencie 2001; 21(16): 6220-6214.
29. Guan Y, Shindler KS, Tabuena P, Rostami AM. *Retinal ganglion cell damage induced by spontaneous autoimmune optic neuritis in MOG-specific TCR transgenic mice*. J Neuroimmunol 2006; 178:48-40
30. Horstmann L, Schmid H, Heinen AP, Kurschus F, Dick HB, Joachim SC. *Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model*. Journal of Neuroinflammation 2013; 10:120.
31. Raphael TJ, Kuttan G. *Effect of naturally occurring triterpenoids glycyrrhizic acid, ursolic acid, oleanolic acid and nomilin on the immune system*. Phytomedicine 2003; Vol. 10:483-9.
32. Hsu^a H.Y. et al., *Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice*. In Elsevier, Ed. Cancer letters 1997, Vol 111: 7-13
33. Somova L.I., *Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol*. In Elsevier, Ed. Phytomedicine. 2004; Vol11:121-129.
34. Martín R, Carvalho-Tavares J, Hernández M, Arnes M, Ruiz-Gutierrez V, Nieto ML, *Beneficial Actions of Oleanolic Acid in an Experimental Model of Multiple Sclerosis: a Potential Therapeutic Role*, Biochemical Pharmacology 2008, doi:10.1016/j.bcp.2009.08.002
35. Xu, J., et al., *Imaging of reactive oxygen species burst from mitochondria using laser scanning confocal microscopy*. Microsc Res Tech, 2013. 76(6): p. 612-7.
36. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, and S.C. Bondy, *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. Chem Res Toxicol, 1992. 5(2): p. 227-31.
37. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. 27(5-6): p. 612-6.
38. Schmued, L.C., et al., *Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons*. Brain Res, 2005. 1035(1): p. 24-31.
39. Pueyo, V., et al., *Axonal loss in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis*. Mult Scler, 2008. 14(5): p. 609-14.
40. Black, J.A. and S.G. Waxman, *Phenytoin protects central axons in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurol Sci, 2008. 274(1-2): p. 57-63.
41. Hobom M, Storch MK, Weissert R, Maier K, Radhakrishnan A, Kramer B, Bähr M, Diem R. *Mechanisms and time course of neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Pathol 2004; April:14(2):148-57.

42. 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*. MultScler 2006, 12:526–532. Shindler KS, Ventura E, Dutt M, Rostami A. *Inflammatory Demyelination Induces Axonal Injury and Retinal Ganglion Cell Apoptosis in Experimental Optic Neuritis*. Exp Eye Res 2008; 87(3): 208-213.
43. Melo, A., et al., *Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives*. Oxid Med Cell Longev, 2011. 2011: p. 467180.
44. Peterson, J.W., et al., *Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions*. Ann Neurol, 2001. 50(3): p. 389-400.
45. Chidlow, G., et al., *Evaluation of Fluoro-Jade C as a marker of degenerating neurons in the rat retina and optic nerve*. Exp Eye Res, 2009. 88(3): p. 426-37.
46. Cardoso, H.D., et al., *Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids*. Front Hum Neurosci, 2012. 6: p. 249.