



Universidad de Valladolid



**MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

# *Afectación nerviosa ocular en un modelo experimental de esclerosis múltiple*

Co-tutoras: M<sup>a</sup> Luisa Nieto Callejo y M<sup>a</sup> Carmen Martínez García

Trabajo realizado por **Elvira Lorenzo Martín**, Licenciada en Biología y estudiante del máster de investigación biomédica.

Julio de 2014



## ÍNDICE

Agradecimientos.....	4
Nomenclatura.....	5
Abstract.....	6
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Material y Métodos.....	11
Resultados.....	18
Discusión.....	31
Referencias.....	35

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar me gustaría agradecer a mis tutoras, la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Nieto Callejo y la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Martínez, por su gran esfuerzo, ayuda y dedicación en el seguimiento del trabajo.*

*Agradecer también a todas aquellas personas que han colaborado activamente en la realización del estudio: a Rober y Rubén, que con su gran paciencia y conocimiento me han ayudado, guiado y enseñado todo lo que estaba de su mano; a los compañeros del Departamento de Biología Celular e Histología (Patricia y Giselle) y del Instituto de Biología y Genética Molecular (Claudia, Bea e Isabel).*

*En último lugar, y no por ello menos importante, tengo que darle las gracias a mi gran familia, por estar siempre a mi lado. Y a Rober, la persona con la que comparto mi vida y a quien va dedicado este trabajo, por darme un empujoncito cuando lo he necesitado o ponerme el freno cuando mis energías se sobrepasan.*

## NOMENCLATURA

ALP: allopurinol

AO: ácido oleanólico

AT: azul de toluidina

CCG: capa de células ganglionares

CFA: adyuvante completo de Freund ("Complete Freund's adjuvant")

CFNO: capa de fibras del nervio óptico

CG: células ganglionares

DCFH-DA: diclorofluoresceína diacetato

DHE: dihydroethidium

DMEM: medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco ("Dulbecco's modified Eagle medium")

DMSO: dimetil sulfóxido

DPI: Difenileno-iodonio

d.p.i.: días post-inmunización

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EM: esclerosis múltiple

i.p.: inyección intraperitoneal

MOG: glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos ("Myelin oligodendrocyte glycoprotein")

NO: neuritis óptica

NAC: N-acetilcisteína

O/N: durante la noche ("over night")

OCT: tomografía de coherencia óptica ("Optical Coherence Tomography")

PS: fosfatidilserina

PE: ficoeritrina

ROS: especies reactivas de oxígeno ("Reactive oxygen species")

RTN: rotenona

SBF: suero bovino fetal

## **ABSTRACT**

### **"Ocular nerve involvement in an experimental model of multiple sclerosis"**

**Purpose:** To determine the effect on the retina of chronic experimental model of multiple sclerosis, as well as the efficacy of treatment with oleanolic acid. To analyze the ways of production of reactive oxygen species in the ganglion cell line RGC-5 and its involvement in apoptosis process.

**Methods:** In the *in vivo* studies, C57BL/J6 mice were divided into 3 groups: a control group, a group with experimental autoimmune encephalomyelitis induced by myelin glycoprotein of oligodendrocyte and another group of animals treated with oleanolic acid. They were sacrificed when they exhibited paralysis of the hind limbs or severe symptoms of the disease, the eyeball was removed and the samples were processed for subsequent histological study. In samples stained with toluidine blue were measured the number of ganglion cells and the thickness of the optic nerve layer. TUNEL technique was performed to count the apoptotic ganglion cells. In the *in vitro* studies, the RGC-5 cells were incubated with inhibitors of enzymes involved in the production of reactive oxygen species, with the antioxidant NAC and oleanolic acid, and subsequently stimulated with hydrogen peroxide. Flow cytometry were used to analyze the production of hydrogen peroxide with the probe DCFH-DA, of superoxide anion with DHE and the presence of apoptotic cells by Annexin-V.

**Results:** The ganglion cell count and the thickness of the layer of optic nerve fibers show no significant differences between the three experimental groups. However, an increase is observed in the number of apoptotic ganglion cells in diseased individuals, which correlates with the results obtained *in vitro*.

**Conclusions:** In the multiple sclerosis model used there isn't a nervous 21-23 dpi ocular involvement though there is an increase in the number of apoptotic ganglion cells that may be related to an increased production of reactive oxygen species.

## **RESUMEN**

### **“Afectación nerviosa ocular en un modelo experimental de esclerosis múltiple”**

**Objetivo:** Determinar la afectación en la retina del modelo experimental de esclerosis múltiple crónica, así como la eficacia del tratamiento con ácido oleanólico. Además se pretenden analizar las vías de producción de especies reactivas de oxígeno en la línea de células ganglionares RGC-5 y su implicación en la apoptosis.

**Métodos:** En los estudios *in vivo* se emplearon ratones C57BL/J6, divididos en 3 grupos: un grupo control, un grupo con encefalomiелitis autoinmune experimental inducida con la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos y otro grupo de animales enfermos tratados con ácido oleanólico. Se sacrificaron cuando presentaban parálisis de las extremidades traseras o síntomas severos de la enfermedad, se extrajo el globo ocular y se procesaron las muestras para su posterior estudio histológico. En muestras teñidas con azul de toluidina se realizó el conteo de las células ganglionares y del espesor de la capa de fibras del nervio óptico. También se realizó la técnica de TUNEL para contabilizar las células ganglionares apoptóticas. En los estudios *in vitro*, las células RGC-5 fueron incubadas con inhibidores de enzimas implicadas en la producción de ROS, con el antioxidante NAC y con ácido oleanólico, y posteriormente estimuladas con peróxido de hidrógeno. Mediante citometría de flujo se realizó el análisis de la producción de peróxido de hidrógeno con la sonda DCFH-DA, de anión superóxido con DHE y de la presencia de células apoptóticas mediante la técnica Anexina-V.

**Resultados:** El conteo de células ganglionares y del espesor de la capa de fibras del nervio óptico no muestran diferencias significativas entre los tres grupos experimentales. Sin embargo, se observa un aumento en el número de células ganglionares apoptóticas en los individuos enfermos, que se correlaciona con los resultados obtenidos *in vitro*.

**Conclusiones:** En el modelo de esclerosis múltiple utilizado no existe una gran afectación ocular nerviosa a los 21-23 d.p.i. aunque existe un aumento en el número de células ganglionares apoptóticas que podría estar relacionado con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.

## INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurodegenerativa autoinmune caracterizada por un proceso de desmielinización inflamatoria del sistema nervioso central. Está causada por daños en la vaina de mielina que recubre las fibras nerviosas y que impide el transcurso normal de las señales nerviosas (Powell *et al.*, 1983). Este daño es producido por procesos inflamatorios desencadenados por una respuesta autoinmune dirigida contra las células nerviosas propias.

A pesar de ser una patología descrita ya a finales del siglo XIX por Carswell, Cruveilhier y Charcot (Moreira *et al.*, 2002), su patogénesis no es del todo conocida, aunque se cree que pueden estar implicados tanto factores genéticos como ambientales. La enfermedad suele presentarse en adultos jóvenes, y con mayor prevalencia en mujeres que en hombres (Carretero *et al.*, 2001). No existe un patrón clínico común pero son frecuentes alteraciones de la sensibilidad, de la capacidad motora y de la articulación de las palabras, pérdida de fuerza, alteraciones emocionales, deterioro cognitivo, alteraciones visuales como pérdida de agudeza visual o visión doble, etc.

A pesar de no existir todavía una terapia para la cura de la enfermedad se utilizan tratamientos multidisciplinarios (Carretero *et al.*, 2001) que ralentizan la progresión de la misma, controlan los síntomas e intentan mantener una buena calidad de vida.

Un modelo experimental ampliamente utilizado para el estudio de la EM es la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) ya 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 (Quinn *et al.*, 2011). La glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) es considerada 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 (Kezuka *et al.*, 2010). Sin embargo, también se utilizan otras proteínas mielínicas que causan diferentes cursos clínicos de EAE (Wujek *et al.*, 2002; Mendel *et al.*, 1995; Storch *et al.*, 1998).

La disfunción visual está reconocida como uno de las manifestaciones clínicas más comunes en los pacientes con EM (Sakai *et al.*, 2011). Esta alteración es el resultado de diferentes procesos fisiopatológicos, entre ellos, la neuritis óptica y la atrofia e inflamación retiniana. **La neuritis óptica** (NO; Arnold, 2005), que ocurre aproximadamente en el 20% de los pacientes (Blacer, 2006) y está ampliamente descrita en el modelo de MOG-EAE. Consiste en la inflamación del



nervio óptico caracterizada por daño axonal asociado con desmielinización, que conduce a la degeneración e inflamación del nervio óptico (Sakai et al., 2011).

La **atrofia e inflamación de la retina**, capa nerviosa del globo ocular que está formado por células receptores de luz y células transmisoras del impulso, que forman diez subcapas bien diferenciadas; las señales lumínicas se transformarán en señales químicas que se mandan al cerebro a través del nervio óptico. Uno de los componentes principales de la retina son las células ganglionares, neuronas cuyo axón formarán el nervio óptico. Dichas células forman la capa de células ganglionares (CCG) junto con la neuroglia y las ramas de los vasos retinianos. En el modelo animal de MOG-EAE está descrita la existencia de una disminución significativa en el número de CG en individuos con EAE que presentan NO (Meyer et al., 2001; Guan et al., 2006; Horstmann et al., 2013). La disminución de CG produce el adelgazamiento lo cual altera la transmisión de la señal luminosa y con ello se produce alteración de la visión (Frisen y Hoyt, 1974; Fisher et al., 2006; Shindler et al., 2009; Sakai et al., 2011).

En los últimos años, numerosos estudios han descrito las propiedades terapéuticas de los extractos vegetales utilizados en la medicina tradicional (Newman et al., 2007). Teniendo en cuenta los efectos adversos de los tratamientos utilizados en la EM se aprecia la necesidad de indagar en productos terapéuticos alternativos. El ácido oleanólico (AO), triterpeno natural presente en *Olea europea* y en el recurso principal de la dieta Mediterránea: el aceite de oliva, posee numerosas propiedades biológicas con potencial terapéutico (Dzubak et al., 2006) entre las que cabe destacar su carácter antiinflamatorio, antitumorogénico, inmunomodulador o antiviral. A pesar de no estar ampliamente descrito el efecto del AO en las enfermedades neuroinflamatorias se le ha considerado un candidato excelente como agente inmunomodulador para el tratamiento de la EM (Martín et al., 2010). Los estudios realizados por Martín et al. demuestran la habilidad del AO para disminuir los signos neurológicos presentes en el modelo animal de EAE.

Nuestro primer objetivo será demostrar en el modelo *in vivo* MOG-EAE la existencia de la disminución en el número de CG y del adelgazamiento de la CFNO, así como la efectividad del tratamiento con AO en la reversión de la enfermedad.

Los mecanismos que conducen a la pérdida neuronal y axonal presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas como la EM no son muy conocidos, sin embargo, estudios

previos realizados en el laboratorio de IBGM o Dra Nieto muestran la existencia de un incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los individuos con EAE. Los estudios realizados por Liven *et al.*, 2006, han relacionado el daño en las CG y en el nervio óptico con un incremento en la actividad de ROS.

Teniendo en cuenta estos resultados, nuestro segundo objetivo será realizar un estudio *in vitro* con la línea de células ganglionares RGC-5 en el que se analice la presencia de ROS, sus posibles vías de producción y la relación con la apoptosis de las CG.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **ESTUDIOS *IN VIVO***

#### **Animales de experimentación**

Se emplearon ratones C57BL/J6 (Laboratorios Charles River, Barcelona). Durante el estudio los animales permanecieron en el estabulario del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid, recibiendo alimentación 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).

#### **Péptido de inducción (MOG)**

El péptido glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG<sub>35-55</sub>) de rata (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), fue sintetizado por el laboratorio del Dr. F. Barahona (CBM, Madrid, España).

#### **Inducción de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)**

La EAE se indujo en ratones hembra del linaje C57Bl/6J de 6-8 semanas, que se caracteriza por una parálisis ascendente progresiva crónica. La enfermedad se induce con un péptido de la mielina de oligodendrocitos (MOG<sub>35-55</sub>). Así, los animales recibieron una dosis subcutánea bilateral en la base de la cola de una mezcla de 100 µg MOG<sub>35-55</sub> emulsionado en adyuvante completo de Freund (CFA) y conteniendo 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (H37 RA). Los ratones recibieron además dos inyecciones intraperitoneales (i.p.) de 300 ng de toxina pertúsica de *B. pertussis*, una administración el día de la inmunización y otra 48 horas después. Los animales se examinaron diariamente para monitorizar la pérdida de peso y la aparición de los síntomas neurológicos.

Se dividieron en tres grupos experimentales: ratones sanos; ratones controles enfermos, inducidos con EAE; y ratones enfermos tratados con ácido oleanólico.

#### **Tratamiento con ácido oleanólico (AO)**

El ácido oleanólico (AO), un triterpeno pentacíclico natural, ampliamente distribuido en el reino vegetal, se recibe purificado (Extrasyntheses, Genay Cedex, France). La fórmula molecular del AO es: C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>, con peso molecular de 456,70.

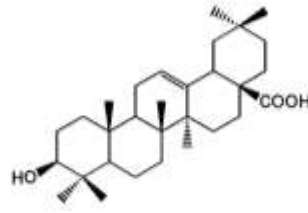


Figura 1. Estructura molecular del ácido oleanólico.

El AO fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) al 2% w/v. Esta solución de stock se diluyó con solución salina estéril a temperatura ambiente a 37°C, siendo la concentración final de DMSO 0,2% w/v. La solución de trabajo de AO fue preparada fresca el día de la inyección y esterilizada a través de un filtro de 0,22 µm. Los ratones se trataron diariamente con 50 mg/kg/día de AO mediante inyección i.p. hasta el día del sacrificio.

### Evaluación clínica de la EAE

Los animales se examinaron diariamente para monitorizar la pérdida de peso y la aparición de los síntomas neurológicos. Los signos clínicos fueron graduados como se indica en la Tabla 1.

GRADO	SIGNOS
0	no hay anomalías
0.5	indica pérdida o disminución parcial de tono en la cola
1	atonía en la cola
1.5	marcha ligera o moderadamente torpe, habilidades disminuidas, o ambos
2	debilidad en las extremidades traseras
2.5	parálisis parcial de las extremidades traseras
3	parálisis completa de las extremidades traseras
3.5	parálisis completa de las extremidades traseras y debilidad en las delanteras
4	tetraplejía
5	estado moribundo o muerte

Tabla 1. Grados de evaluación clínica.

El sacrificio se realizó entre los días 21 a 24 post-inmunización, momento en el cual los animales se encontraban en grado 3, es decir, presentaban parálisis de las extremidades traseras o síntomas severos de la enfermedad (tetraplejía). La variabilidad en el día del sacrificio ocurre porque el péptido afecta de diferente manera a las camadas de los animales, dependiendo principalmente de su peso.

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).

### **Estudio histológico/ Caracterización histológica**

El globo ocular y el nervio óptico fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio. Las muestras para microscopía óptica se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% durante 24 horas, posteriormente se lavaron en tampón fosfato 0.1 M durante 24 horas a 4º C. A continuación, 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, Leica Mcrosystems, Nussloch, Alemania).

La inclusión definitiva se realizó en un dispensador de parafina (Oxford Trade, Casa Álvarez, Madrid), obteniendo bloques de parafina a 60º C (ref. C1616VO-95, Duerolab, Salamanca, España). A continuación, 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 distales.



Figura 2. A) Procesador de tejidos; B) Dispensador de parafina; C) Microtomo.

Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) y Azul de Toluidina (AT). Para realizar cualquiera de las dos tinciones, en primer lugar se sumergieron las secciones de 7 µm de espesor en xilol para desparafinar, seguido de una batería de alcoholes de concentración decreciente para su hidratación. A continuación, para realizar la tinción H-E las secciones se tiñeron durante 10 minutos en Hematoxilina Caracci (tinción nuclear), se lavaron, y se tiñeron con Eosina (tinción citoplasmática) durante 2 minutos. Para realizar la tinción AT las secciones se sumergieron durante 4 minutos en Azul de Toluidina al 1%. 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 se examinaron con un microscopio óptico Olympus BX-41 con una cámara Olympus DP-20 incorporada (Olympus optical Co. LTD, Tokio, Japón). De nuevo se escogieron para el análisis aquellos cortes que incluían la papila del nervio óptico, o en su defecto, que se encontraban en una zona próxima a la misma. Utilizando el software Cell^A (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) se evaluaron los siguientes parámetros: número de células ganglionares y medida del espesor de la capa de fibras del nervio óptico (CFNO).

Las medidas del número de células ganglionares (CG) se tomaron en tres zonas de cada muestra, de modo bilateral a la papila: periferia (próxima a la ora serrata), medio y centro (próximo a la papila del nervio óptico) (Figura 3).

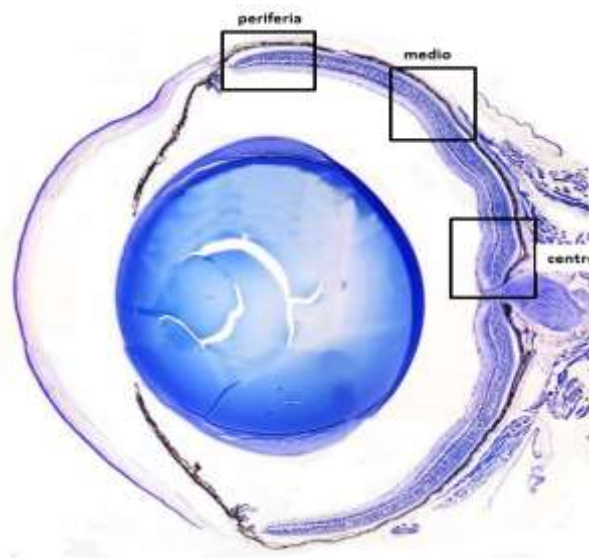


Figura 3. Medida de la capa de fibras del nervio óptico en una muestra de ratón sano.

Para realizar la medida del grosor de CFNO se hizo una estandarización de la altura de corte, y se escogieron solo aquellas muestras en las que aparecen los vasos en la papila del nervio óptico (Figura 4).

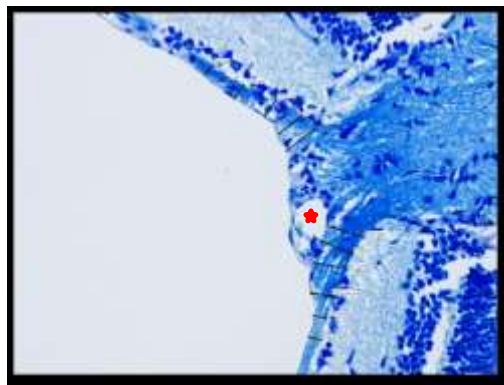


Figura 4. Medida de la capa de fibras del nervio óptico en una muestra de ratón sano. Se realiza en aquellos cortes histológicos que presenten los vasos en la papila del nervio óptico. Las líneas indican los puntos de medición.

## **Apoptosis**

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 Nick-End Labeling" (ref.- G 3250, Promega, Barcelona, España). Esta es una técnica que 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 severa digestión enzimática con el fin de permeabilizar la membrana plasmática y nuclear y así hacer accesible el DNA a las enzimas transferasas. Para la tinción de núcleos celulares se utilizó DAPI y el montaje se realizó con Vectashield.

Se examinó la presencia de células apoptóticas tanto en la capa de células ganglionares como en el resto de las capas de la retina. Para la visualización de las muestras se utilizó el microscopio de fluorescencia y campo claro Zeiss Axiophot HBO-50 que lleva incorporado una cámara AxioCam HRC (modelo: 426510-9901-000, Carl Zeiss, Alemania).

## **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) con el software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies INC, Warrenton, VA, USA). Se realizó el ANOVA de comparación de varias muestras para el número de células ganglionares y el espesor de la capa de fibras del nervio óptico. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  SD; los valores  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Para determinar qué medias son estadísticamente significativas se realizaron las Pruebas de Múltiples Rangos.

## **ESTUDIOS *IN VITRO***

### **Reactivos**

Como inhibidores se utilizaron: ácido oleanólico de Extrasyntheses (Genay Cedex, France), N-acetilcisteína (NAC) que es un antioxidante sintético, Difenileno-iodonio (DPI) que inhibe flavoenzimas como la xantina oxidasa o las isoenzimas de NADPH oxidasa, Alopurinol (ALP), potente inhibidor de la xantina oxidasa, y Rotenona (RTN) que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Además, se utilizaron las sondas: 2'7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) de Sigma ((St. Louis, MO), Dihydroethidium (DHE) de Invitrogen y Anexina-V de Becton Dickinson.

### **Línea celular y cultivo de células ganglionares**

Se utilizó la línea de células ganglionares de retina procedentes de rata: RGC-5. Las células se crecieron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 2 mM de L-glutamina y 100 µg/ml de estreptomina, en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras comprobar que se encontraban en estado de confluencia (Figura 5A) se despegaron con Tripsina y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con medio DMEM al 10% de SBF. A las 4 horas las células ya se encontraban pegadas al frasco de cultivo, así que se cambiaron a medio DMEM sin suero, para realizar el arresto celular O/N (Figura 5B y 5C).

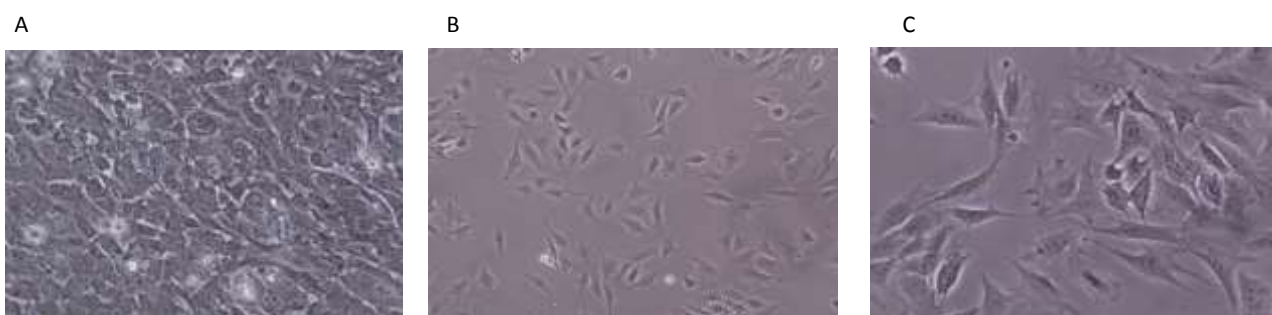


Figura 5. A) Cultivo de RGC-5 en medio completo (20x); B) Cultivo de RGC-5 en medio S/S (20x); C) Cultivo de RGC-5 en medio S/S (40x).

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

#### ***Análisis de la producción de peróxido de hidrógeno***

Para monitorizar la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), concretamente de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se utilizó la sonda DCFH-DA. El DCFH-DA difunde rápidamente a través de las membranas celulares y es retenida en el citosol como DCFH al ser desacetilada por una esterasa intracelular. En presencia de peróxido de hidrógeno el DCFH se oxida a DCF que es altamente fluorescente. Las células se marcaron con 10 µM de DCFH-DA durante 30 min a 37°C y se incubaron durante otros 30 minutos a 37°C con los distintos inhibidores: AO (5 y 10 µM), NAC (5 y 10 µM), DPI (5 y 20 µM) o Alopurinol (10 y 50 µM). A continuación, se realizó la estimulación a 37°C durante 24 horas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a dosis 300, 500 ó 650 µM. Finalmente, las células fueron despegadas con EDTA, lavadas en PBS 1x, e inmediatamente fueron analizadas mediante citometría de flujo (Citómetro analítico Gallios, Beckman Coulter) para detectar la presencia de células positivas para la sonda.



### ***Análisis de la producción de anión superóxido***

El análisis de la producción intracelular de anión superóxido ( $O_2^-$ ) se realizó utilizando el fluorocromo Dihydroethidium (DHE) ya que al ser oxidado por  $O_2^-$  emite fluorescencia. La diferencia de esta sonda, respecto a la DCFH-DA, es que las células se marcan una vez que son despegadas, recogidas y lavadas. Se añade 2  $\mu$ M de DHE, durante 30 minutos, a 37°C. El resto del protocolo es igual que para la sonda DCFH-DA.

### **Análisis de la apoptosis celular**

El análisis de la presencia de células ganglionares apoptóticas se realizó utilizando el método de detección con Anexina V. Uno de los primeros eventos que sufren las células apoptóticas es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina (PS) del interior al exterior de la membrana plasmática. La Anexina V tiene una gran afinidad por la PS por lo que se une a las células que lo exponen, las células apoptóticas; La Anexina-V es detectada al ser conjugada con el fluorocromo Ficoeritrina (PE). Las células fueron pre-tratadas durante 30 minutos a 37°C, con los distintos inhibidores. A continuación, se realizó la estimulación con  $H_2O_2$  a las dosis 300, 500 ó 650  $\mu$ M durante 24 horas. Las células fueron despegadas con EDTA, lavadas con PBS1x, e incubadas en binding buffer 1x (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2,5mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 4% albúmina sérica bovina) con Anexina V-PE durante 10 minutos, en oscuridad y agitación. Por último, se diluyeron en binding buffer para ser analizadas mediante citometría de flujo (Citómetro analítico Gallios, Beckman Coulter).

## RESULTADOS

### ESTUDIOS *IN VIVO*

En el estudio *in vivo* se realizó el análisis de la capa de células ganglionares (CCG) y la capa de fibras del nervio óptico (CFNO) de muestras del globo ocular de los tres grupos experimentales. Se analizaron las diferencias existentes en cuanto al número de células ganglionares, el grosor de la capa de fibras del nervio óptico y el número de células ganglionares apoptóticas.

#### Contaje del número de células ganglionares

Se realizó el contaje del número de células presentes en la capa de células ganglionares en un globo ocular de cada animal, escogiendo tres campos a cada lado de la papila.

En la tabla 2 se muestra el número de muestras analizadas y los resultados obtenidos en cuanto al contaje. En la figura 6 se puede observar la representación gráfica de los resultados.

	DERECHA			IZQUIERDA			Nº MUESTRAS
	periferia	medio	centro	periferia	medio	centro	
<b>SANOS</b>	31,09 ± 7,12	53,09 ± 10,49	41,30 ± 11,07	24,00 ± 7,26	46,61 ± 9,25	42,13 ± 15,89	6
<b>EAE</b>	24,94 ± 6,46	46,06 ± 9,11	37,77 ± 12,90	24,16 ± 10,37	50,00 ± 12,69	43,87 ± 14,60	8
<b>EAE+OA</b>	29,15 ± 10,75	57,82 ± 17,32	39,71 ± 13,99	26,82 ± 8,07	49,71 ± 11,27	31,64 ± 7,78	7

Tabla 2. Valores medios del número de células ganglionares ± desviación estándar, obtenidos en los tres grupos experimentales, de forma bilateral a la papila y en tres campos: periferia, medio y centro.

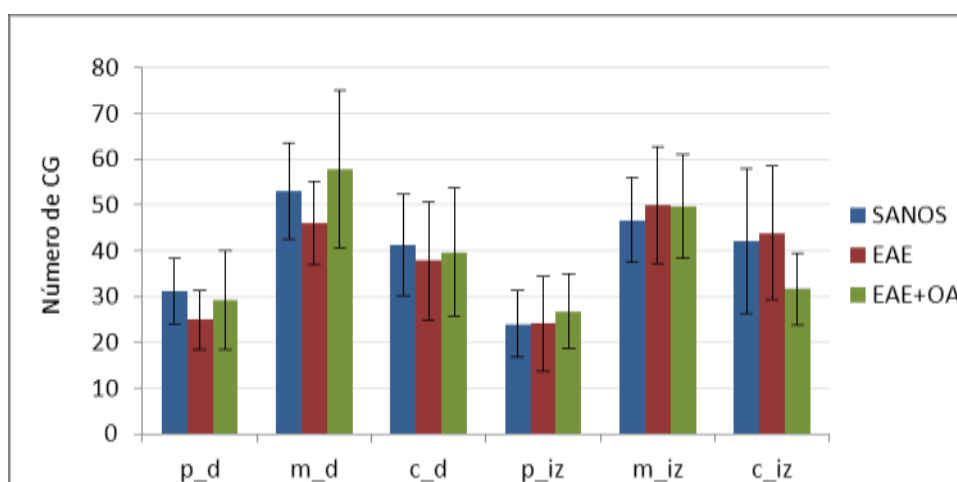


Figura 6. Número total de células ganglionares, agrupadas por grupos experimentales y campos.

Se observa la existencia de diferencias en el número de células ganglionares entre los diferentes campos seleccionados, sin embargo, el número es más o menos similar a ambos lados de la papila, como cabe esperar.

En la figura 7 se puede observar que el número medio de CG es menor en los individuos enfermos (EAE) que en los sanos o tratados con OA, excepto en el campo central. Por otro lado, se aprecia que el número medio de CG en los individuos tratados se asemeja al de los sanos, exceptuando también el campo central.

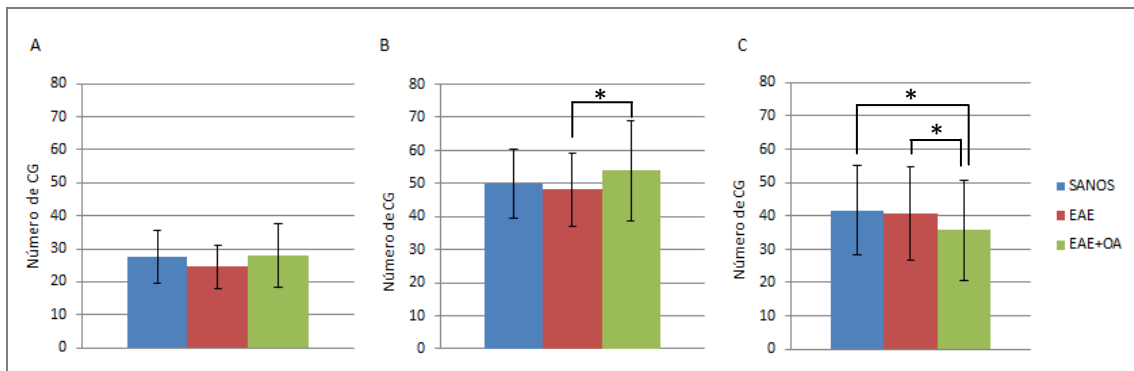


Figura 7. Número de células ganglionares en los tres grupos experimentales: a) periferia; b) medio; c) centro. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por \* $p \leq 0,05$ .

En la figura 8 se representan los resultados obtenidos al agrupar los datos en función del grupo experimental.

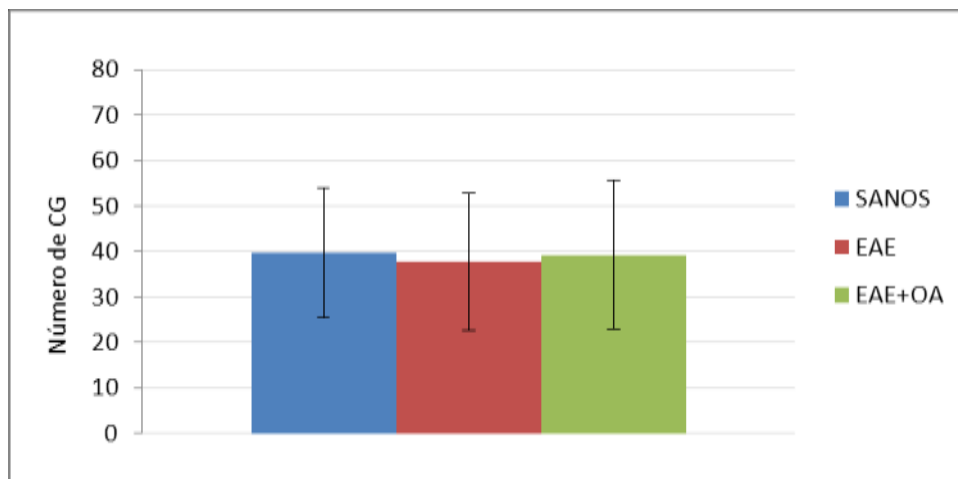


Figura 8. Número total de células ganglionares para cada grupo experimental.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre las medias de los tres grupos experimentales. Sin embargo, en la Figura 1 se observaba que los resultados en cada campo eran muy diversos por lo que se realizó el análisis estadístico de los resultados por campos. En la periferia de la retina no existen diferencias estadísticamente significativas

( $p \geq 0,05$ ) entre la media de las tres condiciones experimentales. Sin embargo, en el campo del medio y en el central sí existen diferencias significativas entre la media del número CG de los individuos enfermos y los tratados. En el centro, además, existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre los sanos y los tratados.

### Medida del grosor de la capa de fibras del nervio óptico peripapilar

Se realizó la medida del grosor de la CFNO para estudiar si existe una disminución en el espesor de CFNO en los individuos con EAE, como plantea la hipótesis de partida.

Los datos del grosor medio de CFNO quedan reflejados en la Tabla 3 y en la Figura 9.

	Grosor medio de NFL ( $\mu\text{m}$ )	Nº MUESTRAS
SANOS	31,23 $\pm$ 9,50	5
EAE	38,75 $\pm$ 8,77	8
EAE+OA	37,03 $\pm$ 8,51	7

Tabla 3. Valores medios del grosor ( $\mu\text{m}$ ) de la capa de fibras del nervio óptico  $\pm$  SD.

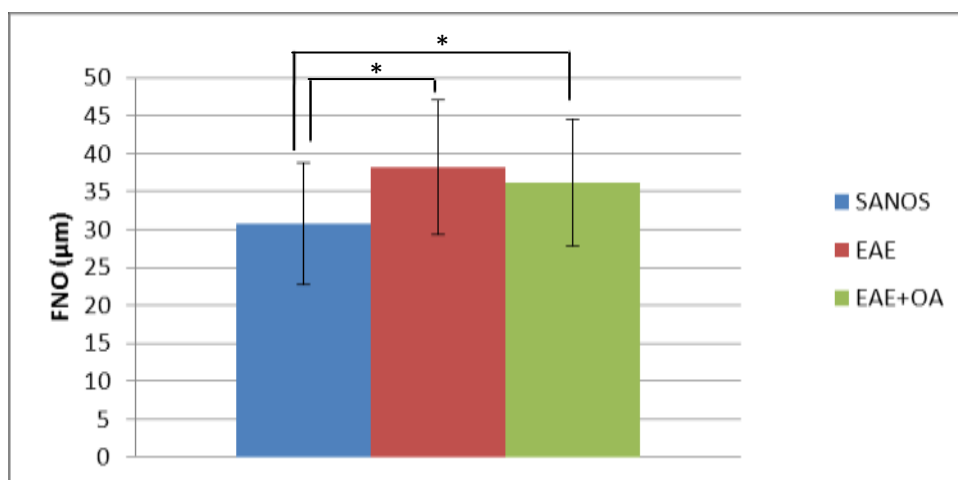


Figura 9. Grosor ( $\mu\text{m}$ ) de la capa de fibras del nervio óptico en las tres condiciones experimentales. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por  $*p \leq 0,05$ .

El análisis de los datos muestra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la media de las tres condiciones experimentales. Esto indica que en el modelo de esclerosis múltiple existe una afectación en el grosor de CFNO. Sin embargo, las diferencias significativas solo aparecen entre los individuos sanos y los enfermos, y los sanos y los tratados, pero no existen entre los enfermos y tratados. Esto significaría que el tratamiento

con AO no modifica la afectación en el grosor de CFNO. Además, en la Figura 9 podemos observar que el grosor de CFNO es mayor en los enfermos y tratados, que en los sanos.

### Contaje del número de células ganglionares apoptóticas

Los resultados obtenidos en el contaje del número de células ganglionares se muestran en la tabla 3 y en las figura 10 y 11.

	Nº CG apoptóticas	Nº MUESTRAS
SANOS	1,6 ± 3,58	11
EAE	2,23 ± 4,93	13
EAE+OA	1,27 ± 1,60	11

Tabla 3. Número medio de CG apoptóticas ± SD.

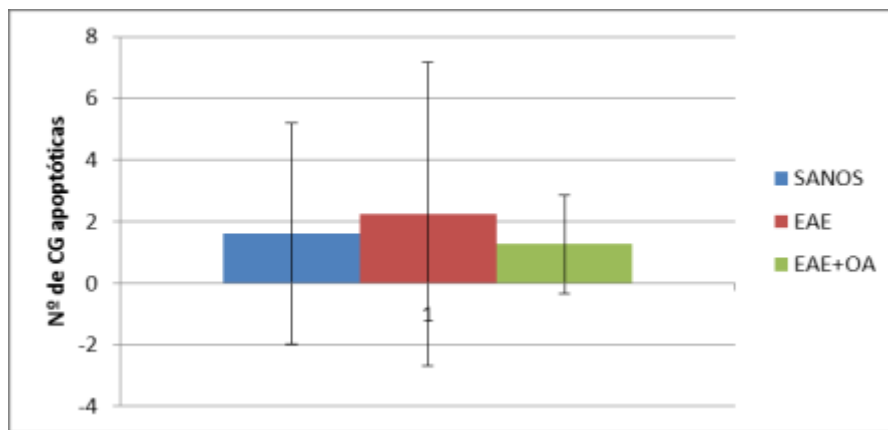


Figura 10. Número medio de CG apoptóticas.

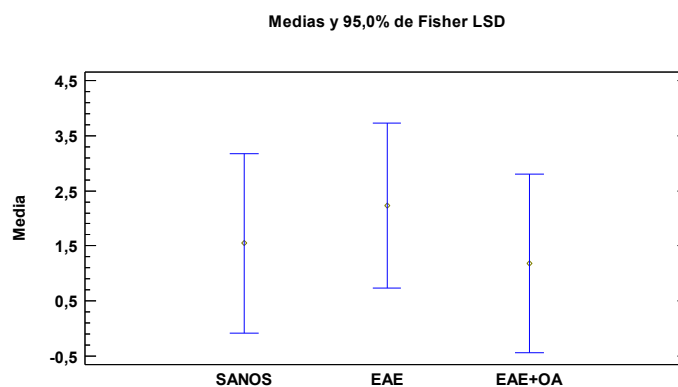


Figura 11. Gráfico de medias de los resultados obtenidos para las tres condiciones experimentales.

El análisis de los datos muestra que el número de células ganglionares apoptóticas es mayor en los individuos enfermos, que en los otros grupos experimentales. Sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) entre la media de las tres condiciones experimentales y los valores de desviaciones son muy grandes, tal y como se apreciaba en la Figura 6.

## ESTUDIOS *IN VITRO*

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

En primer lugar se analizó la producción de ROS, mediante la sonda **DCFH-DA** que detecta  $H_2O_2$ .

Las células ganglionares de retina RGC-5 se trataron con las dosis indicadas de  $H_2O_2$  durante 30 min a  $37^\circ C$ , en presencia y ausencia de ácido oleanólico (AO), un antioxidante natural, ya que los datos obtenidos *in vivo* en el modelo de EAE muestran que tiene un efecto protector. El incremento en la fluorescencia de la diclorofluoresceína (DCF) en las células tratadas con  $H_2O_2$ , respecto al control, indica que existe un aumento en la producción de ROS.

Los resultados obtenidos para el AO (figura 12) indican que el pretratamiento con la concentración de  $5 \mu M$ , no es efectivo bloqueando la producción de ROS. Sin embargo, con AO  $10 \mu M$  se observa menor cantidad de ROS, es decir, esta concentración es efectiva en la protección de ROS.

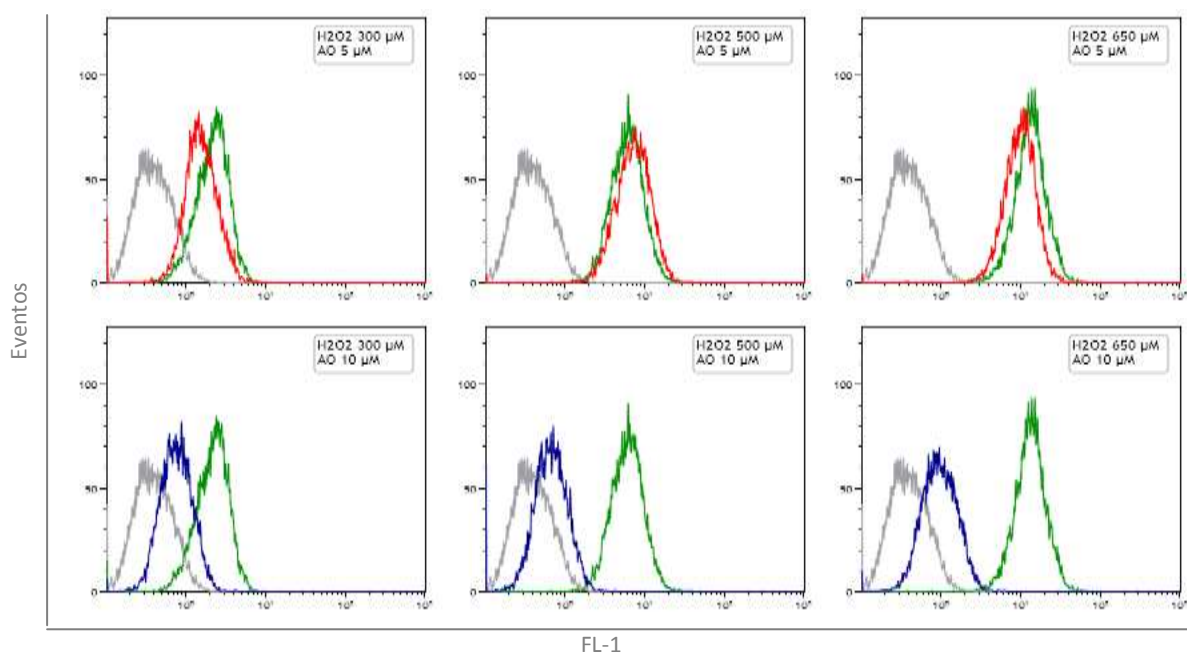


Figura 12. Análisis mediante citometría de flujo para AO con DCFH-DA. Gris: control; Verde: control de  $H_2O_2$ ; Rojo: AO  $5 \mu M$ ; Azul: AO  $10 \mu M$ .

Para profundizar en las vías de producción de ROS se utilizaron diferentes inhibidores: NAC, antioxidante sintético; DPI inhibidor de flavoenzimas como la xantina oxidasa o las isoenzimas de NADPH oxidasa; allopurinol, potente inhibidor de la xantina oxidasa; y rotenona, inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

En la figura 13 se puede observar que en presencia del antioxidante NAC, se produce una disminución de la producción de ROS, siendo este bloqueo dosis-dependiente.

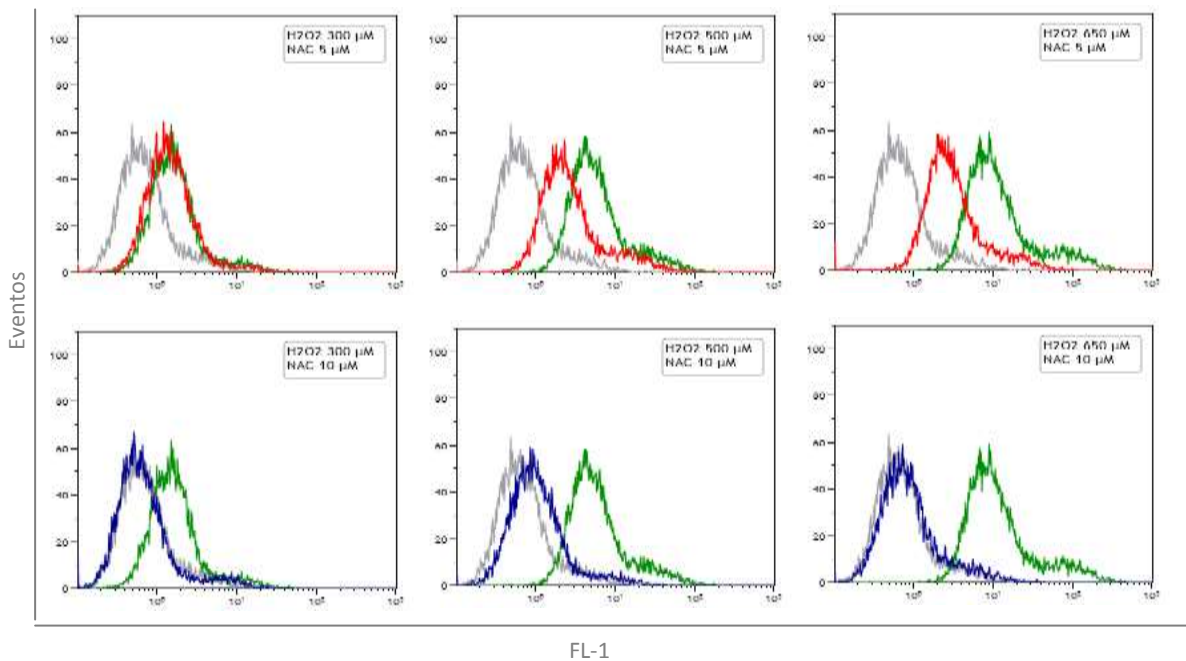


Figura 13. Análisis mediante citometría de flujo para NAC con DCFH-DA. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: NAC 5 μM; Azul: NAC 10 μM.

A continuación, estudiamos la inhibición con DPI, que inhibe la xantina oxidasa y las isoenzimas de NADPH. Como se observa en la Figura 14, la dosis más alta utilizada fue la única efectiva en la disminución de los ROS producidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

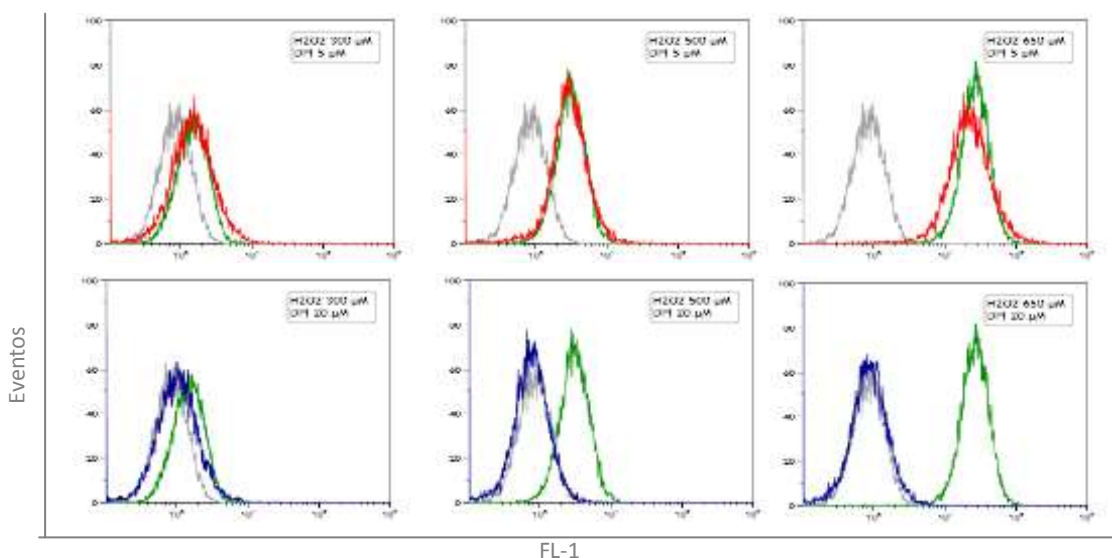


Figura 14. Análisis mediante citometría de flujo para DPI con DCFH-DA. Gris: control; Verde: control de H2O2; Rojo: DPI 5  $\mu$ M; Azul: DPI 20  $\mu$ M.

Los resultados para ALOPURINOL (Figura 15) indican que a una concentración de 10  $\mu$ M apenas existe inhibición de la xantina oxidasa, ya que prácticamente no disminuye la producción de ROS con respecto a las células sin inhibidor. Sin embargo, la concentración alta, de 50  $\mu$ M, sí fue efectiva.

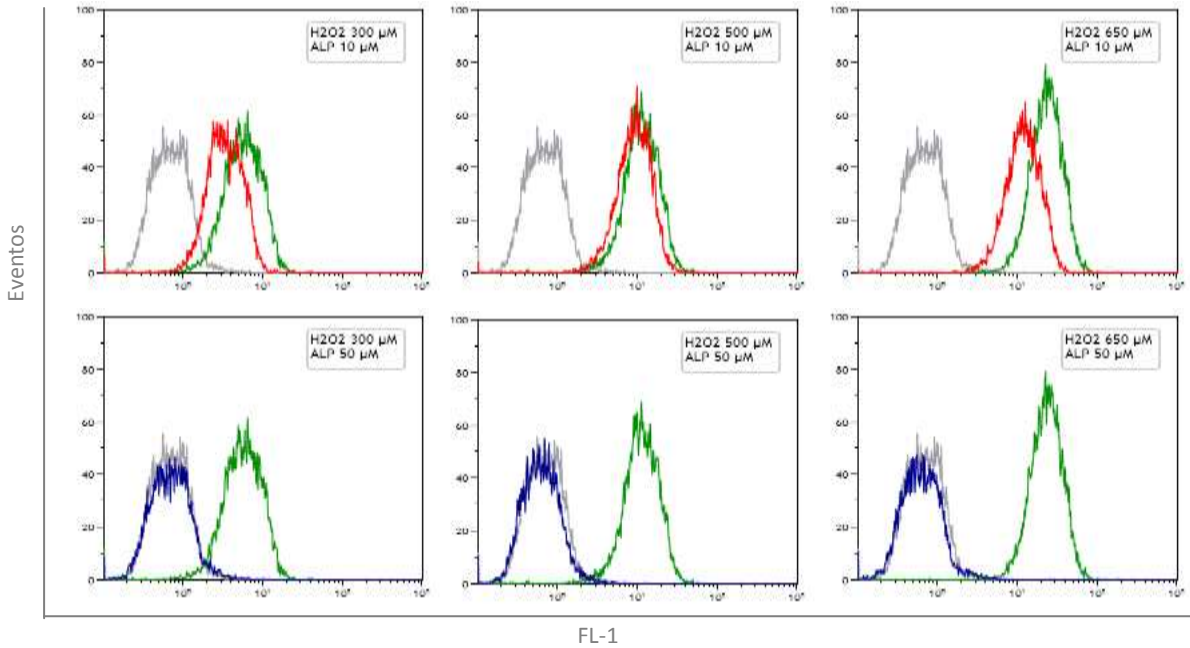


Figura 15. Análisis mediante citometría de flujo para ALP con DCFH-DA. Gris: control; Verde: control de H2O2; Rojo: ALP 10  $\mu$ M; Azul: ALP 50  $\mu$ M.

El inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, Rotenona, fue efectivo a la dosis más alta utilizada (10  $\mu$ M), mientras que la más baja (5  $\mu$ M) apenas inhibe (Figura 16). Estos resultados indicarían que la mitocondria está implicada en la producción de ROS en esta línea celular.

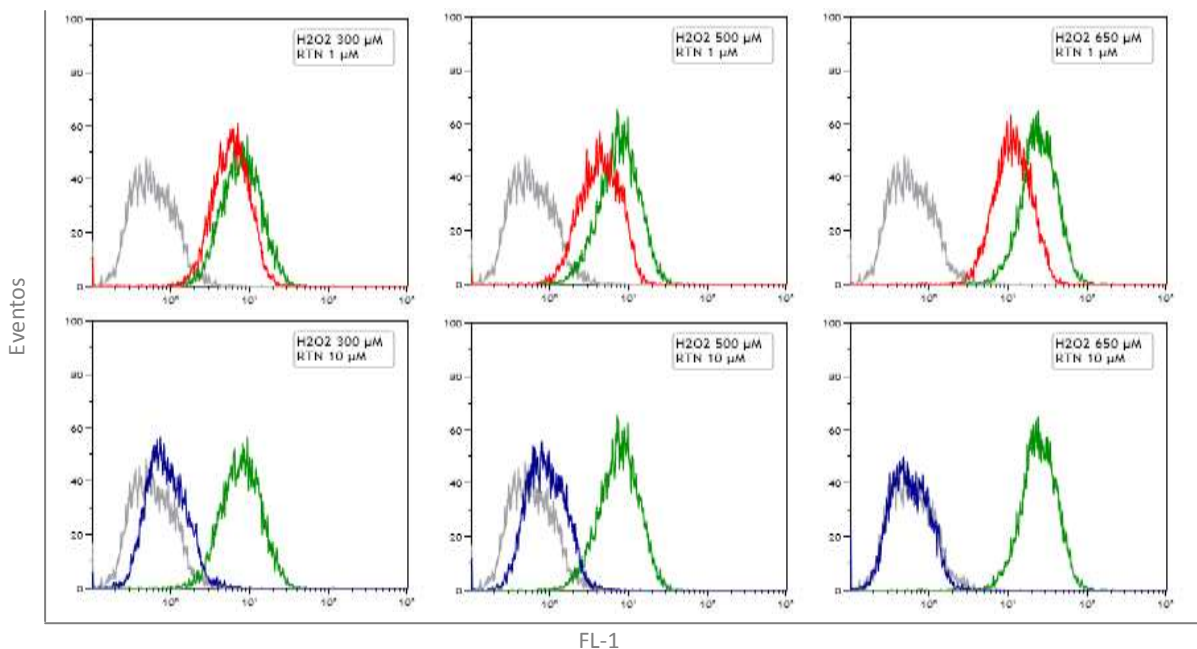




Figura 16. Análisis mediante citometría de flujo para RTN con DCFH-DA. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: RTN 1 μM; Azul: RTN 10 μM.

La sonda **DHE** también permite analizar la producción de ROS, pero en este caso se detecta la presencia del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Las células ganglionares de retina RGC-5 se trataron con las dosis indicadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min a 37°C, en presencia y ausencia de ácido oleanólico (AO), un antioxidante natural. El incremento en la fluorescencia en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respecto al control, indica que existe un aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. De nuevo, tal y como ocurrió con la sonda DCFHDA, el AO fue efectivo a dosis altas protegiendo de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 17).

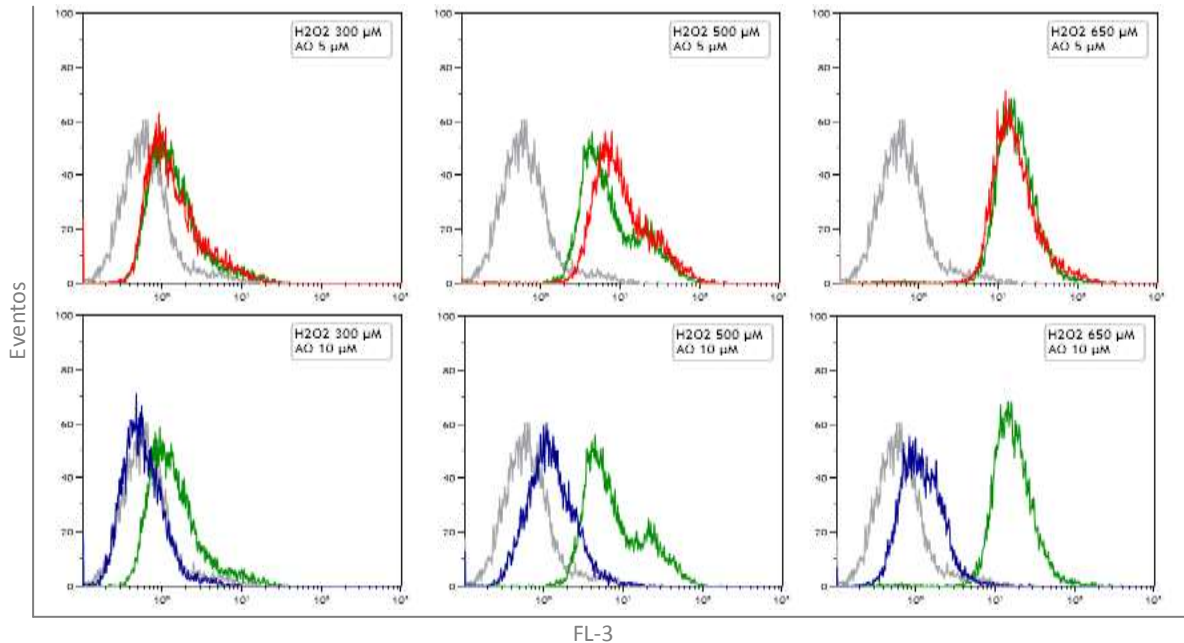


Figura 17. Análisis mediante citometría de flujo para AO con DHE. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: AO 5 μM; Azul: AO 10 μM.

De nuevo las células se pre trataron 30 min con diversos antioxidantes/inhibidores de la producción de ROS para profundizar en las vías de producción.

En la figura 18 se puede observar una atenuación en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en presencia del antioxidante NAC. Dicho efecto es más significativo a la concentración más alta utilizada.

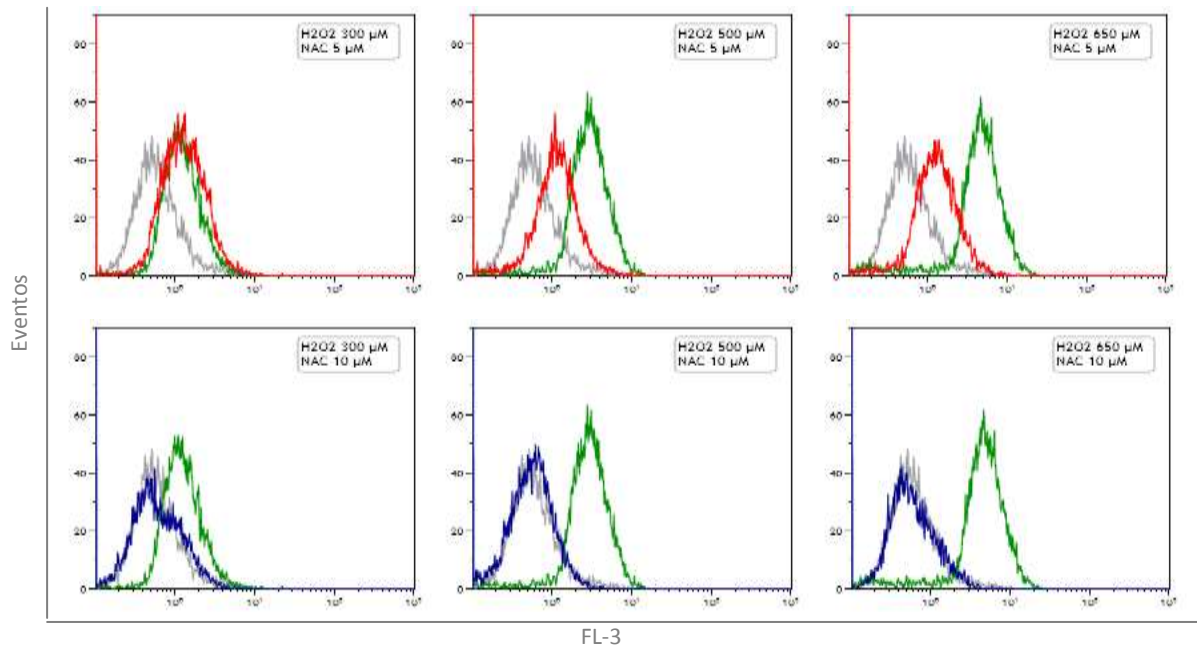


Figura 18. Análisis mediante citometría de flujo para NAC con DHE. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: NAC 5 μM; Azul: NAC 10 μM.

Los resultados para DPI (figura 19) y ALP (figura 20) muestran que al inhibir las isoenzimas de NADPH oxidasa y la xantina oxidasa, respectivamente, existe un bloqueo dosis-dependiente de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

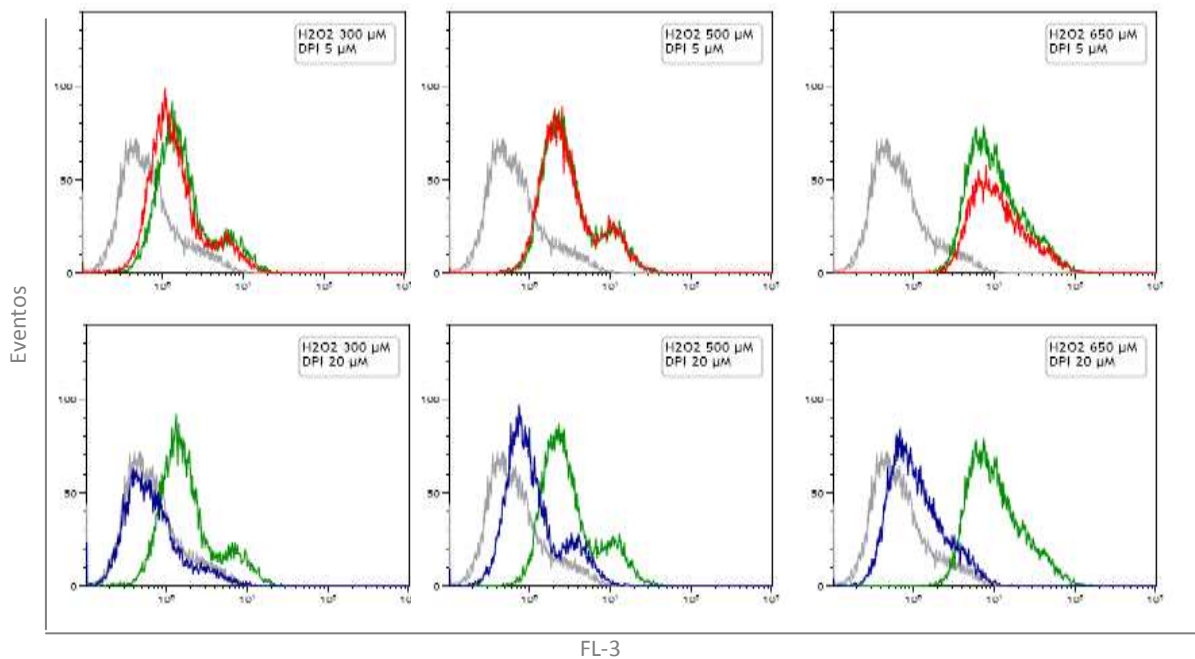


Figura 19. Análisis mediante citometría de flujo para DPI con DHE. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: DPI 5 μM; Azul: DPI 20 μM.

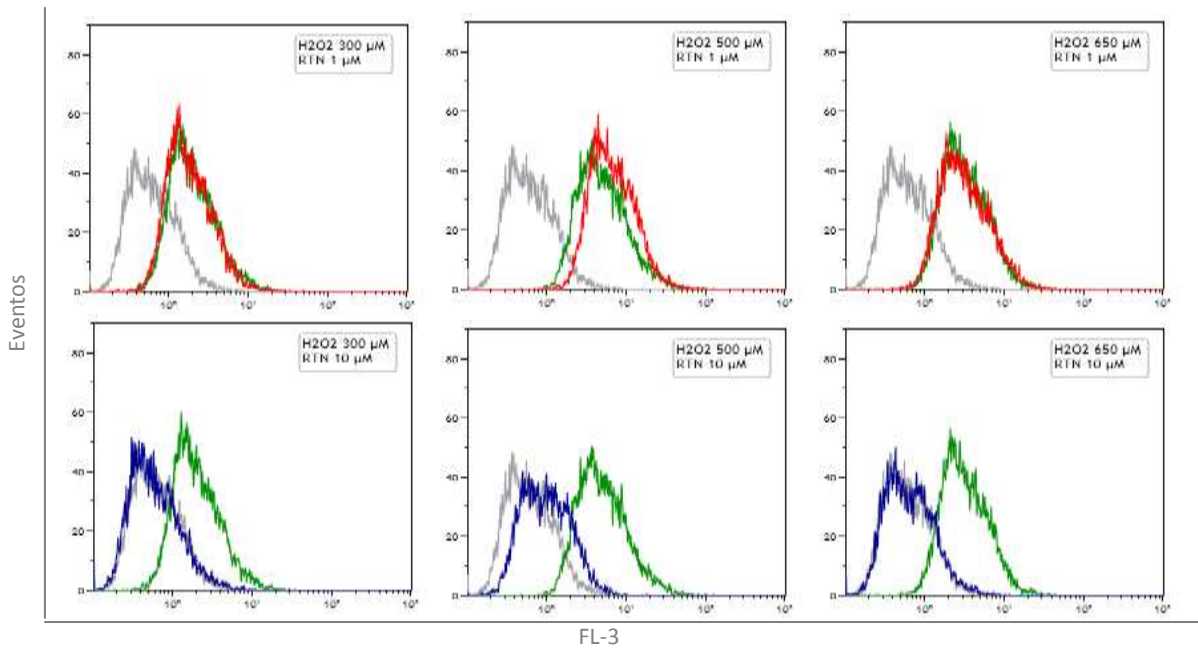


Figura 20. Análisis mediante citometría de flujo para ALP con DHE. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: ALP 10 μM; Azul: ALP 50 μM.

Los resultados para la RTN (figura 21) muestran un bloqueo en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> cuando se realiza un pretratamiento con la concentración de 10 μM.

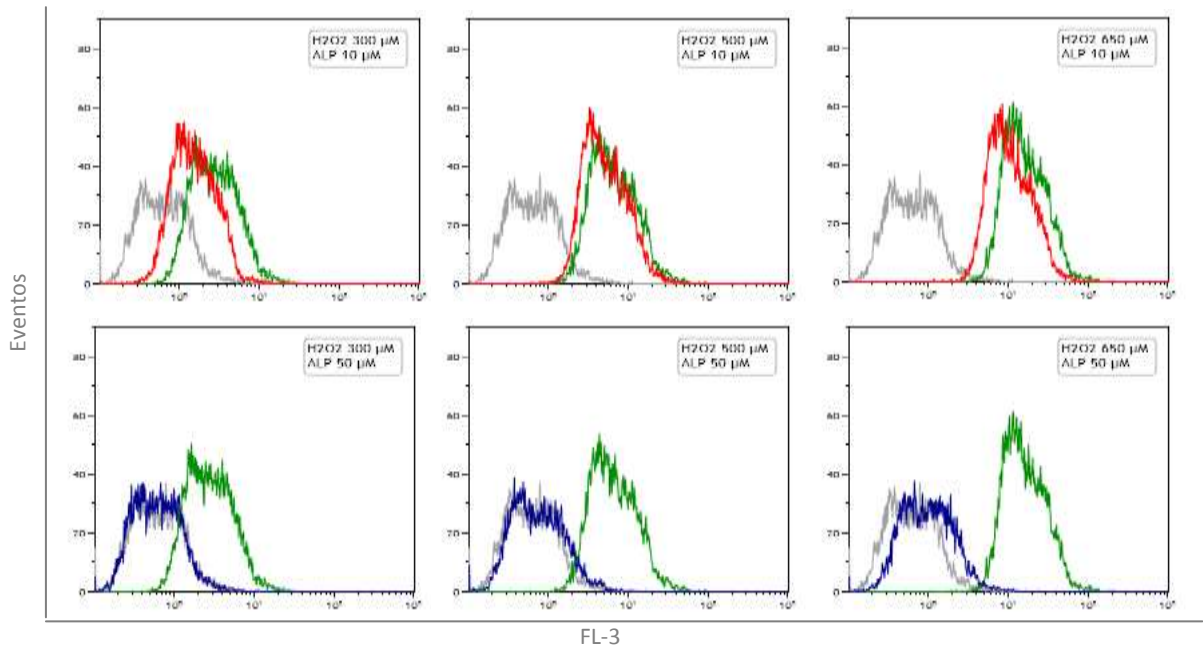


Figura 21. Análisis mediante citometría de flujo para RTN con DHE. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: RTN 1 μM; Azul: RTN 10 μM.

## Análisis de la apoptosis celular - Anexina V

Por último, se analizó la presencia de células apoptóticas, mediante la Anexina V.

Las células ganglionares de retina RGC-5 se trataron con las dosis indicadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24h a 37°C, en presencia y ausencia de ácido oleanólico (AO). La inducción de apoptosis se cuantificó mediante el ensayo de unión de Anexina V, como se detalla en materiales y métodos. Observamos que con el peróxido de hidrógeno hay presencia de células positivas para Anexina V, de manera dosis-dependiente.

El comportamiento protector que observamos con las distintas dosis de AO, fueron similares a los obtenidos para la producción de ROS. Así, la menor concentración de AO utilizada no bloqueó la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, las células apoptóticas se disminuyen drásticamente a altas concentraciones (Figura 22).

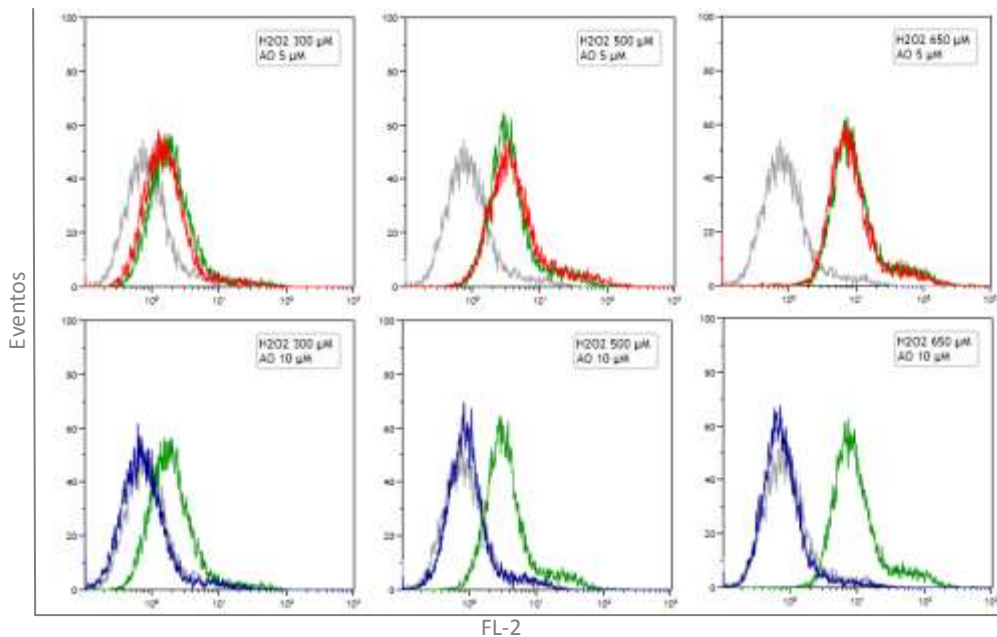


Figura 22. Análisis mediante citometría de flujo para AO con Anexina-V. Gris: control; Verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Rojo: AO 5 μM; Azul: AO 10 μM.

Respecto al resto de los antioxidantes/inhibidores empleados, con los que se realizó un pretratamiento durante 30 minutos, se aprecian diferencias en los resultados en función de la concentración del inhibidor y de la dosis de peróxido de hidrógeno. En primer lugar, al realizar el pretratamiento con la concentración más baja del inhibidor, se observa la presencia de células positivas para Anexina V (figura 23).

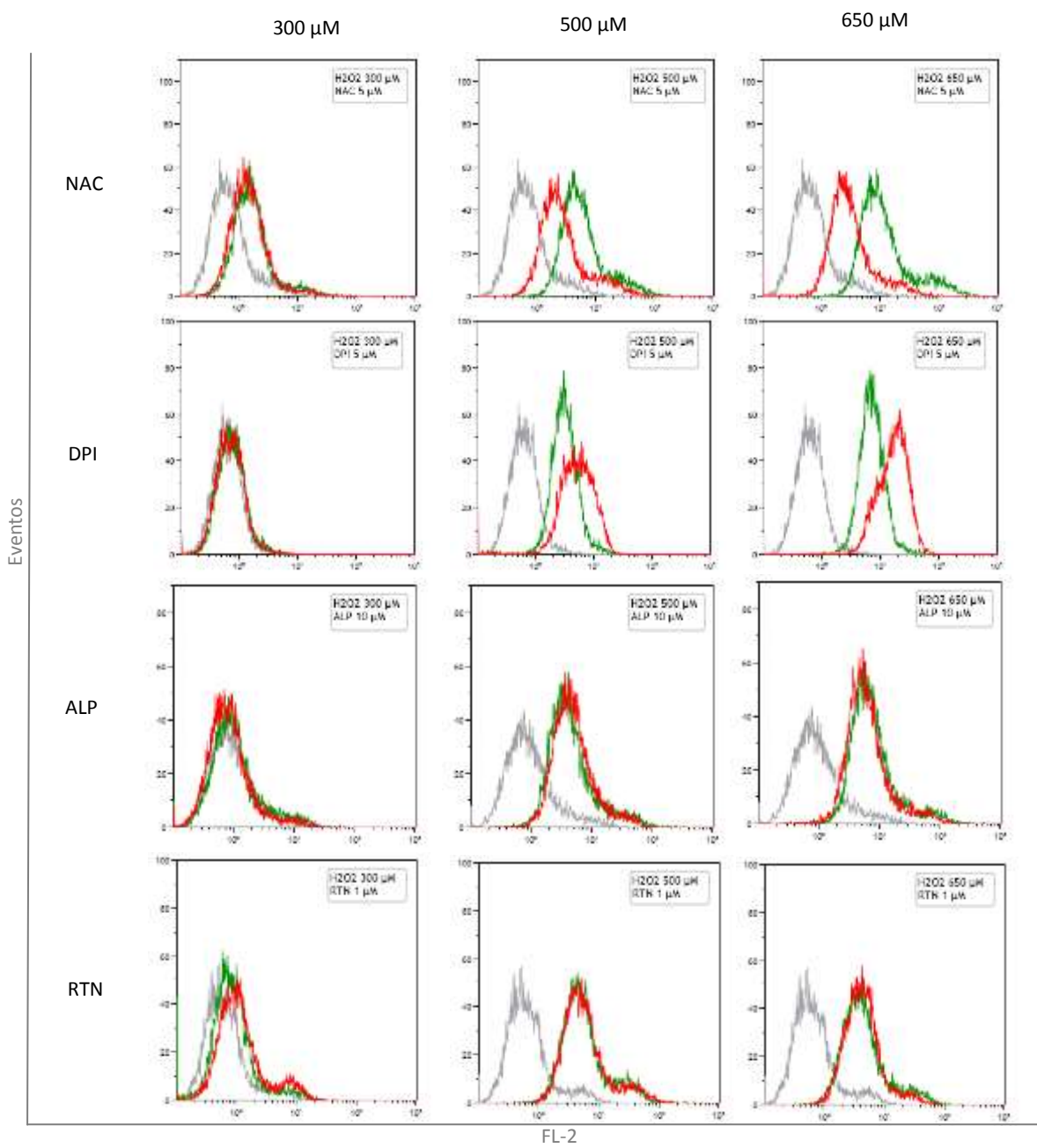


Figura 23. Análisis por citometría de flujo con Anexina V para NAC , DPI , ALP y RTN. Gris: control; verde: control de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; rojo: inhibidor con la concentración más baja utilizada (5, 5, 10 y 1, respectivamente).

Sin embargo, con la concentración más alta utilizada se disminuyen las células apoptóticas (Figura 24).

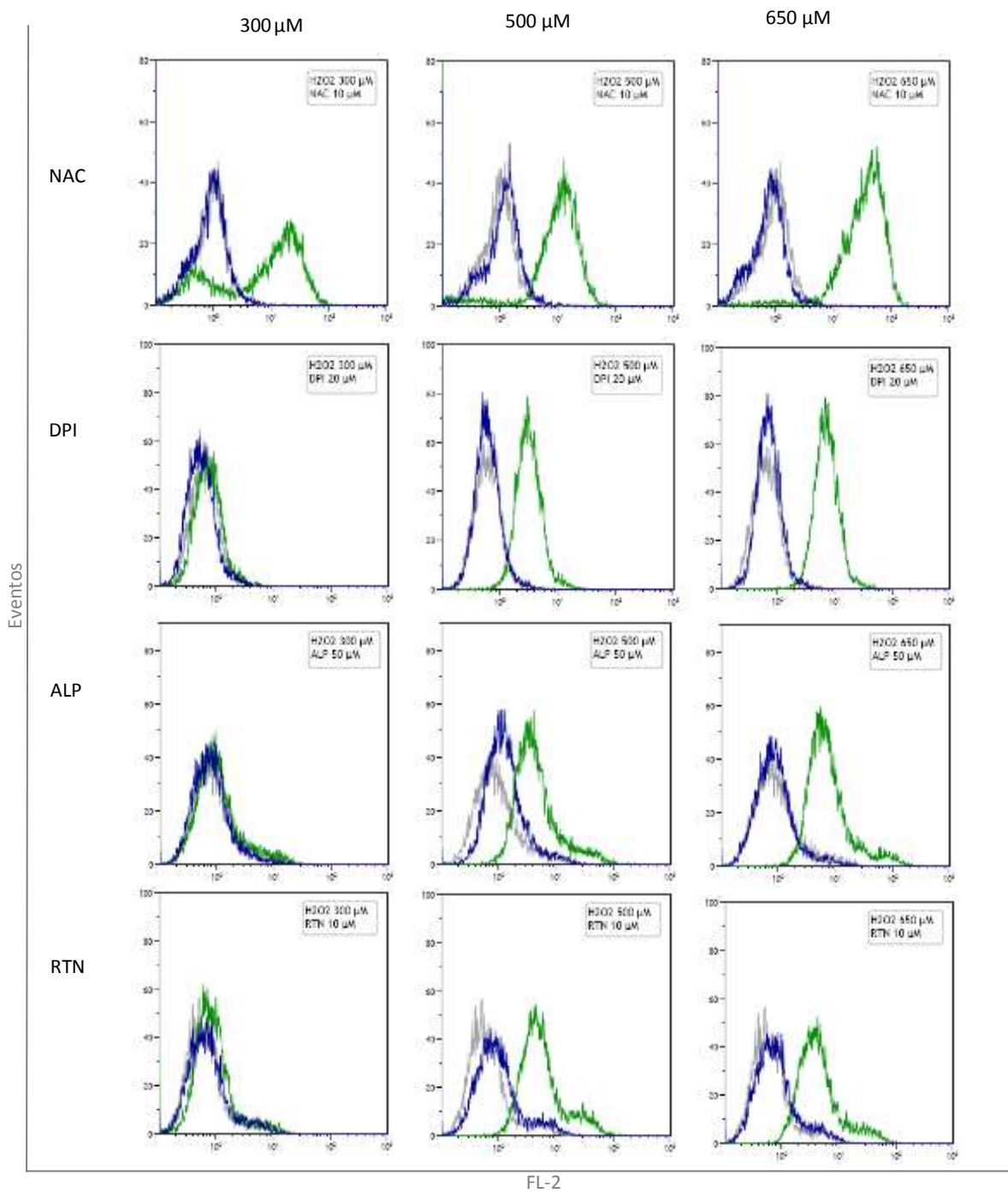


Figura 24. Análisis por citometría de flujo con Anexina V para NAC, DPI, ALP. Gris: control; Verde: control de H2O2; Rojo: inhibidor con la concentración más alta utilizada (10, 20, 50 y 10, respectivamente).

## DISCUSIÓN

En los estudios *in vivo* se investigaron los efectos de MOG-EAE en la retina y la eficiencia del tratamiento con ácido oleanólico en la reversión de los mismos.

En primer lugar, teniendo en cuenta la variabilidad de los resultados por la utilización de un tamaño muestral pequeño, y la alta desviación estándar obtenida, no se puede concluir que exista una disminución en el **número de CG** en los individuos con EAE.

Estos resultados se contraponen con los de otros autores que observan una disminución en la densidad de las CG cuando los ratones son sacrificados en el mismo estado clínico que en nuestro experimento (Meyer *et al.* 2001.; Horstmann *et al.* 2013). En el estudio realizado por Horstmann *et al.*, 2001, se utiliza el mismo modelo animal pero varía el método de conteo de las CG, que fue realizado como número de células/mm<sup>2</sup> en un montaje plano de ojo. Por otro lado, diversos estudios en diferentes modelos animales de EAE realizan el seguimiento varios d.p.i. obteniendo así el porcentaje de células que se pierden, que para nuestro modelo animal sería del 66% a los 2-3 días de desarrollarse los síntomas clínicos (Meyer *et al.*, 2001). Esto nos hace plantearnos si el método de medición del número de CG es el más adecuado.

En segundo lugar, los resultados obtenidos plantean la posibilidad de que la principal pérdida de CG ocurra en otro momento del desarrollo clínico de EAE. Quinn *et al.*, 2011, utilizaron el mismo modelo animal y no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de CG entre los individuos control y los EAE hasta los 35 y 50 d.p.i.

Hobom *et al.*, 2004, 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 NO, y otro independiente del proceso inflamatorio. Además han demostrado que la neuritis del nervio óptico conduce a la apoptosis de las CG lo que hace pensar que la determinación del grado de inflamación del NO podría ser un buen indicador del momento en el que comienza el proceso de pérdida de CG dependiente del proceso inflamatorio, pudiéndose así establecer el punto ideal de estudio para poder verificar la eficacia del tratamiento con AO. Además, esto está apoyado por los resultados obtenidos por Shindler *et al.*, 2006, que demuestran que la pérdida neuronal detectada en las últimas etapas ocurre de forma secundaria al proceso inflamatorio.

Por otro lado, los resultados obtenidos respecto al número de **CG apoptóticas** que existe mayor número de CG apoptóticas en los individuos con EAE que en los sanos o tratados, en el momento del sacrificio. Diversos estudios demuestran que la muerte de las células ganglionares es apoptótica (Meyer *et al.*, 2001), por lo que el método utilizado para



determinar la existencia de muerte en las células ganglionares es el adecuado. Además, indican que la muerte de las CG no está sincronizada, sólo unas pocas CG por sección son positivas para TUNEL, lo que explicaría la enorme variabilidad existente en nuestro estudio entre cada muestra de la misma condición experimental.

En conclusión, aunque no se pueda afirmar la existencia de una disminución en la densidad de CG en los individuos EAE respecto a los sanos o tratados, sí se aprecia mayor número de células apoptóticas en los individuos EAE que en los sanos o tratados con AO, lo que podría indicar la efectividad del tratamiento.

Respecto al **grosor de CFNO**, se observa un aumento en el grosor en los individuos con EAE y no disminuye en los enfermos tratados con AO. Este resultado se contrapone con lo esperado, ya que al existir una disminución en el número de células ganglionares en los individuos enfermos se espera que disminuya también el grosor de CFNO debido a la pérdida axonal, pero ocurre lo contrario.

En primer lugar nos podríamos plantear si es buena la elección del método de medida del grosor de CFNO. En estudios similares se utilizan diferentes técnicas, aunque la establecida en el ámbito clínico es la tomografía de coherencia óptica (OCT). Horstmann *et al.*, 2013, afirman que aunque esta técnica resulta muy útil a la hora de medir el resto de las capas de la retina, no lo es tanto para la CFNO debido a su delgadez, por lo que utilizan tinciones histológicas como en nuestro caso. Sus resultados no muestran diferencias en el grosor ni estructura de las diversas capas de la retina entre los individuos sanos y los MOG-EAE. Además, la presencia de inflamación perivasculare y gliosis, encontrada especialmente en los vasos de la retina interna en un estudio en individuos humanos, incrementan la posibilidad de que la medida del grosor de CFNO por OCT no sea exacta (Green *et al.*, 2010).

Para explicar el aumento en el grosor de la capa de fibras del nervio óptico en los individuos enfermos respecto a los sanos se debería comprobar la existencia de cambios en el resto de los componentes de la CFNO: las células gliales y la red de vasos retinianos. Una de las principales causas podría ser la presencia de un edema, como paso previo al proceso de inflamación; Stamenkovic *et al.*, 2011, han demostrado en sus estudios en pacientes con EM la existencia de inflamación de los vasos de la retina que apoyarían esta hipótesis, aunque no se han observado células inflamatorias. Sería preciso realizar otra serie de estudios en CFNO y en el nervio óptico para averiguar qué produce el aumento del grosor.



Se podría concluir que, a pesar de no poderse afirmar que existe una disminución en el número de CG en los individuos con EAE respecto a los sanos, ni una reversión en los tratados con AO, sí que se aprecia mayor número de células apoptóticas. Además, se aprecia un aumento en el grosor de la CFNO en los individuos enfermos que podría estar asociado a la presencia de un edema, que se revierte en los tratados. Estos resultados indican que probablemente nos encontramos en un estado temprano en el proceso de afectación retiniana que ocurre en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental.

Hay que tener en cuenta además que este estudio es una primera aproximación a la afectación ocular en individuos con el modelo murino de esclerosis múltiple citado y el efecto del AO. Se ha utilizado una *n* pequeña, por lo que se deberían realizar los experimentos en un mayor número muestras e insertar nuevas técnicas o métodos de estudio de los diferentes parámetros, tal y como se ha ido mencionando. También podría ser interesante realizar los experimentos en individuos sacrificados a varios tiempos post-inmunización para determinar el momento en el que comienza la afectación ocular o realizar un tratamiento con ácido oleanólico desde la fase aguda de la enfermedad a la crónica (de 21 a 65 días aproximadamente).

Los estudios *in vitro* nos permitieron descubrir las diferentes vías de producción de ROS, así como la relación de dicha producción con la apoptosis de las células ganglionares.

Se estimuló la **producción de radicales libres de oxígeno** (ROS) en la línea de células ganglionares RGC-5 y se trataron con diferentes inhibidores implicados en las vías de producción de ROS: Difenileno-iodonio (DPI) que inhibe flavoenzimas como la xantina oxidasa o las isoenzimas de NADPH oxidasa, Alopurinol (ALP), potente inhibidor de la xantina oxidasa, y Rotenona (RTN) que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Mediante la sonda DCFH-DA se analizó la presencia de peróxido de hidrógeno y con DHE la del anión superóxido.

Los resultados obtenidos con ambas sondas indican que en la línea celular RGC-5 existe producción de ROS a través de la vía de la xantina oxidasa, de la NADPH oxidasa y de la cadena respiratoria mitocondrial. Esto puede relacionarse con estudios previos realizados en mi laboratorio en ratones con el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental inducida con MOG que mostraron una acumulación de ROS en suero y cerebelo, que se reducía en los ratones enfermos tratados con ácido oleanólico. Además, nuestros resultados muestran que

en presencia de ácido oleanólico 10  $\mu\text{M}$  la producción de ROS está atenuada, lo que también indicaría una protección frente a los ROS por parte del AO.

Los resultados obtenidos *in vivo* mostraban una disminución en el número de **células apoptóticas** en los ratones enfermos tratados con AO, que podría deberse a su efecto protector frente a las especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, se analizó la apoptosis de la línea RGC-5 mediante la Anexina-V. Al relacionar la presencia de ROS con los resultados obtenidos para Anexina-V se puede concluir que cuando no se inhiben los procesos de formación de ROS se desencadenan procesos apoptóticos, lo cual no ocurre cuando se inhibe dicha formación mediante los inhibidores enzimáticos o en presencia del antioxidante NAC o del ácido oleanólico 10  $\mu\text{M}$ . Esto apoyaría los estudios obtenidos por Liven *et al.*, 2006 que relacionaban el daño en las CG con un incremento en la actividad de ROS.

En conclusión, el aumento en el número de células ganglionares apoptóticas en los individuos con MOG-EAE podría deberse a un aumento en la producción de ROS, que se revierte mediante el tratamiento con AO.

## **REFERENCIAS**

Arnold, A.C. Evolving management of optic neuritis and multiple sclerosis. *Am. J. Ophthalmol* 2005; 139: 1101-1108.

Blacer LJ: Clinical practice. Optic neuritis. *N Engl J Med* 2006; 354:1273-1280.

Carretero JL, Bowakim W, Acebes JM. Multiple sclerosis. *Medifam* 2001; 11:516-529.

Dzubak P, Hajduch M, Vydra D, Hustova A, Kvasnica M, Biedermann D, et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat Prod Rep* 2006; 23:394-411.

Fisher J, Levkovitch-Verbin H, Schori H, Yoles E, Butovsky O, Kaye JF, Ben-Nun A, Schwartz M. Vaccination for Neuroprotection in the Mouse Optic Nerve Implications of Optic Neuropathies. *The Journal of Neurosciencie* 2001; 21(1): 136-142.

Fisher JB, Jacobs DA, Markowitz CE et al. Relation of visual function to retinal nerve fibre layer thickness in multiple sclerosis. *Ophthalmology* 2006; 113:324–332

Frisén L, Hoyt WF. Insidious atrophy of retinal nerve fiber in multiple sclerosis. Funduscopy identification in patients with and without visual complaints. *Arch Ophthalmol* 1974; 92: 91-7.

Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R. Ocular pathology in multiple sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain* 2010; 133: 1591-1601.

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: 40-48.

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.

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.

Kalman B, Leist TP. A mitochondrial component of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Neuromol Med.* 2003; 3: 147-158.

Kezuka T, Usui Y, Goto H. Analysis of the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Optic Neuritis. *J Biomedic and Biotechnol* 2001:

Lieve CJ, Hoegger MJ, Schlieve CR, Leven LA. Retinal ganglion cell axotomy induces an increase in intracellular superoxide anion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 1477-1485.

Martín R, Carvalho-Tavares J, Hernández M, Arnés M, Ruiz-Gutiérrez V, Nieto ML. Beneficial actions of oleanolic acid in an experimental model of multiple sclerosis: A potential therapeutic role. *Biochemical Pharmacology* 2010; 79:198-208.

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): 6214-6220.

Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice; fine specificity and T cel receptor V g expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Inmunol* 1995; 25: 1951-1959.

Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mende MF, Kaimen-Maciel DR, Callegaro D. Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol* 2002; 34: 378-83).

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007; 70: 461-77.

Powell HC, Lampert PW. Pathology of multiple sclerosis. Antel JP, ed. *Multiple sclerosis. Neurologic Clinics* WB Saunders Co. Philadelphia 1983; 631-4.

Qi X, Lewin AS, Sun L, Hauswirth WW, Guy J. Suppression of Mitochondrial Oxidative Stress Provides Long-term Neuroprotection in Experimental Optic Neuritis. *Inv Oph Vis Sc* 2007; 48 (2): 681-691.

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.

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): 362-373.

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.

Stamenković M1, Obradović D. Retinal periphlebitis in patients with multiple sclerosis. *Vojnosanit Pregl.* 2011; Jul;68(7):544-9.

Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerchen-Steiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 1998; 8: 681-694.

Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, Trapp BD. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61:23-32.

