



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**PhD Thesis:**

---

Transcriptional Insights for Spinal Cord Injury and Neural  
Precursor Cell Therapy: Toward a Novel Optogenetics-  
Based Treatment for cAMP Neuronal Induction

---

PhD candidate:

**Beatriz Martinez Rojas**

Supervisors:

**Victoria Moreno Manzano**

**Esther Giraldo Reboloso**

~ Valencia, October 2023 ~

## RESUMEN

La lesión medular traumática (LM) se refiere a una condición neurológica en la que un insulto mecánico interrumpe la adecuada comunicación de los impulsos nerviosos a través del sistema nervioso central (SNC), resultando en la pérdida de la función locomotora por debajo del área lesionada. La consiguiente parálisis tiene efectos devastadores en la calidad de vida de los pacientes lesionados. Lamentablemente, en la actualidad aún no existe una cura efectiva para restaurar completamente la funcionalidad de la médula espinal después de la lesión, aunque se han realizado grandes avances en los últimos años.

La búsqueda de un tratamiento eficiente para LM sigue siendo un gran desafío debido a nuestra aún incompleta comprensión de la multitud de procesos biológicos desencadenados por la lesión primaria. Las terapias dedicadas a inducir la plasticidad neuronal y la regeneración tras la LM incluyen la estimulación eléctrica, la administración local de factores de crecimiento, el uso de degradadores de la matriz extracelular y el trasplante de células madre. Entre ellos la terapia celular destaca como la aproximación más recurrente para el tratamiento de la LM. En las últimas décadas, se han explorado varias estrategias basadas en células, siendo una de las más prometedoras el trasplante de células progenitoras neurales (CPN). Muchos estudios preclínicos demostraron el potencial del trasplante de CPN para proporcionar una recuperación motora sustancial en modelos animales, sin embargo, las mejoras funcionales en pacientes humanos tratados han sido limitadas y su aplicabilidad para la translación clínica sigue siendo un tema de estudio. Por lo tanto, aún se deben realizar esfuerzos para descubrir la cascada precisa de procesos moleculares a lo largo de la fisiopatología de LM, así como el mecanismo subyacente de los CPN.

En ese contexto, el Capítulo 1 del presente trabajo tuvo como objetivo proporcionar una caracterización de los cambios en el perfil transcripcional medular a lo largo de las diferentes etapas temporales de las ratas que sufren una lesión severa contusiva. Además, hemos descrito el impacto transcripcional del trasplante agudo y subagudo de CPN en animales lesionados. Notablemente, hemos demostrado que mientras la LM conllevó una fuerte desregulación de varios componentes de señalización de AMPc (siendo EPAC2 el gen más regulado a la baja), el trasplante de CPN pudo restaurar las alteraciones derivadas de LM en esta vía, con sobreexpresión de EPAC2. Para explorar el papel de EPAC2 en el mecanismo terapéutico mediado por CPN, realizamos un experimento de pérdida de función mediante la inhibición sostenida de EPAC2 debido a la administración de ESI-05 junto con el trasplante de CPN en animales lesionados. En

comparación con los animales solo trasplantados, los animales CPN +ESI-05 mostraron un aumento en el área de cicatriz, una exacerbación de la polarización de la microglía hacia un perfil inflamatorio y una ampliación de la brecha de neuronas preservadas a lo largo de la lesión. En general, estos resultados sugieren que los mecanismos terapéuticos de CPN en el contexto de LM implican un mecanismo dependiente de EPAC2, reduciendo la neuroinflamación y proporcionando un entorno neuro-permisivo.

Basándonos en nuestros hallazgos anteriores, el Capítulo 2 explora el potencial del AMPc para la regeneración de la LM. Hemos diseñado una estrategia innovadora para inducir artificialmente el AMPc en las neuronas corticoespinales a través de la activación optogenética de un adenilato ciclasa foto-inducible (bPAC). La estimulación optogenética diaria de AMPc en ratas con una hemisección dorsal torácica (que daña completamente la parte dorsal del tracto corticoespinal), promovió una recuperación locomotora temprana y sostenida en comparación con los animales de control. Hemos demostrado que la estimulación de bPAC aumentó el número de neuronas marcadas retrógradamente desde el segmento lumbar tanto en la corteza motora como en la formación rafe-reticular, pero no en el núcleo rojo. Además, la inmunotinción del tracto rafeespinal por 5-HT mostró que la estimulación de bPAC aumentó el ratio de axones serotoninérgicos caudales a la lesión, lo que se correlacionó significativamente con una mejora de parámetros funcionales. Nuestros estudios de las proyecciones corticobulbares, trazado transináptico con WGA y análisis de P-CREB sugieren que la modulación de bPAC sobre la vía cortico-serotoninérgica podría ocurrir a nivel del tronco encefálico. Por último, la depleción del sistema serotoninérgico mediante la administración de 5,7-Dihydroxytryptamina suprimió la abolió la mejora mediada por bPAC, confirmando la implicación de la vía serotoninérgica en la recuperación de los animales estimulados.

En resumen, nuestra investigación ha proporcionado nuevos conocimientos sobre los cambios transcripcionales que ocurren a lo largo de la progresión de la LM y tras el trasplante de CPN, con un énfasis especial en la señalización de AMPc. La manipulación optogenética de AMPc en las neuronas corticoespinales después de la LM ha demostrado ser efectiva para la recuperación funcional y ha permitido descubrir una ruta cortical alternativa a través del tracto descendente serotoninérgico