CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

NEURONAL SURVIVAL AND AXONAL REGENERATION AFTER SPINAL CORD INJURY: THE ROLE OF NEUROTRANSMITTERS

DANIEL SOBRIDO CAMEÁN

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN NEUROCIENCIA E PSICOLOXÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury: the role of neurotransmitters.

D. Daniel Sobrido Cameán

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 3 de outubro de 2019.

Asdo. Daniel Sobrido Cameán

Eu, Daniel Sobrido Cameán, con DNI 53486525-W e con domiciliación a efectos de notificación Santa Clara de Novás, nº 17 – Porto do Son,

Declaro

Que esta tesis non presenta conflictos de interés.

E para que así conste firmo a día 3 de outubro de 2019.

Asinado: Daniel Sobrido Cameán

AUTORIZACIÓN DA DIRECTORA E DO DIRECTOR DA TESE

Neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury: the role of neurotransmitters

Dna. María Celina Rodicio Rodicio
D. Antón Barreiro Iglesias

INFORMA/N:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. Daniel Sobrido Cameán, baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

De acordo co artigo 41 do Regulamento de Estudos de Doutoramento, declara tamén que a presente tese de doutoramento é idónea para ser defendida en base á modalidade de COMPENDIO DE PUBLICACIÓNS, nos que a participación do/a doutorando/a foi decisiva para a súa elaboración.

A utilización destes artigos nesta memoria, está en coñecemento dos coautores, tanto doutores como non doutores. Ademais, estes últimos teñen coñecemento de que ningún dos traballos aquí reunidos poderá ser presentado en ningunha outra tese de doutoramento.

En Santiago de Compostela a 9 de outubro de 2019.

Asdo. Mª Celina Rodicio Rodicio

Asndo. Antón Barreiro Iglesias

AGRADECEMENTOS

"♪♫♪ Tenemos la mala costumbre de querer a medias,
de no mostrar lo que sentimos a los que están cerca ♪♫♪"

Título: La mala costumbre
Compositor: José Abraham
Intérprete: Pastora Soler
Álbum: *15 años*

Teño tanto que agradecer que non sei por onde comezar. Miles de millares de persoas forman parte da historia desta tese. Quizás sexa unha falta mencionar a unhas poucas pero tampouco quero non agradecer a ninguén por mor de deixar no esquecemento a moitas outras persoas. Polo tanto, vou mencionar a aquelas persoas que xusto agora, en este intre, coa tese completa e cerca da fecha límite para entregala me están pasando pola cabeza.

Á xefa/directora e aos xefes/directores:

A Celina, non hai palabras en ningunha lingua coas que se poda expresar todo o que che debo e che teño que agradecer. Lémbrome da primeira entrevista que me fixestes para ver se me aceptabas no teu grupo...despois desas case 3 horas de charla saín do teu despacho tendo clarísimo que quería ser parte do teu grupo, amor a primeira vista, e ese sentimento seguiu e segue crecendo cada día. Gracias por aceptarme como discípulo, gracias por transmitirme esa enerxía inesgotable que tes, gracias polos ánimos nos momentos de baixón, es a mellor xefa do mundo, contigo pódese falar do que sexa, chorar as penas, desafogar os enfados e bailar e celebrar as alegrías e éxitos. Gracias polas horas que me dedicastes e por aturar as miñas protestas, terquedades e cabezonerías, outra persoa xa me tiña "mandado a compoñer" fai anos. Gracias por seres como es e pola inestimable axuda. Gracias!

A Antón, un exemplo a seguir. Non importa que algo non sala, sempre tes un plan b, c, d....imprescindible cando algo se complica. Sempre coa vista no seguinte paso. Gracias por collerme como discípulo. Sen ti esta tese non sería posible (nin a tese nin todo o outro coñecemento que xeramos en paralelo a esta tese). Gracias por eses momentos discutindo e planeando experimentos e proxectos. Gracias por facerme partícipe de todas as colaboracións que foron xurdindo estes anos. Gacias por ensinarme tanto sobre a parte menos "*laboratorial*" de facer ciencia: redactar proxectos, pedir becas, xestionar un grupo. Gracias!

A Ramón, o meu ídolo. Son extraordinariamente afortunado por poder traballar con unha persoa á que admiro tanto. Gracias por axudarme sempre en todo o que necesitei....da igual o asunto, dende un "non sei que lle pasa ao microscopio" a un "estame costando interpretar esta preparación", sempre tes a solución. Gracias por esas horas xuntos no microscopio, aprendo máis unha hora escoitándoche que mil horas estudiando. Gracias por introducirme no estudio da anatomía comparada, un mundo que me ten

fascinado e que ti es capaz de ver cunha sinxeleza inigualable. Gracias pola imprescindible axuda para sacar adiante todas as nosas publicacións. Gracias!

Ás amistades xurdidas no traballo:

Quero agradecer a todas as persoas que están ou estiveron por Bioloxía Celular. Aos compañeiros, aos que estaban cando empecei aquí, que dende o primeiro día me fixeron sentir como un máis do equipo.

Gracias a Dani, o meu mentor durante o TFM, ensinástesme os meus primeiros pasos no laboratorio e...que tanta paciencia tiveches comigo. Gracias por aportar sempre un ambiente máis distendido e divertido á hora de traballar. Gracias!.

Gracias a Blanca, sempre disposta a axudar no que sexa, da igual que fose un día tranquilo ou que estiveses a mil coa recta final da tese ou con apuros por un *deadline* sempre disposta a botar unha man. Gracias tamén polos momentos fora do lab, como as rutas "*conoce tu pueblo*" nas que sempre o pasamos xenial. Gracias!.

Gracias a Rocío (Ledo), dende que collemos confianza fostes un apoio inestimable, axudáchesme a superar tantas cousas, tantos momentos de penas e choros e á vez pasámolo tan ben...non houbo nin un día que non me fixera rir. Que momentazos de *sketches*, viaxes, fantasías, anécdotas, risas, bailes, festas, empachos. Gracias, marcastes a diferencia do que puideron ser e do que foron os meus anos de tese. Sempre che estarei agradecido e che terei un amor e cariño inmenso. Gracias!

Gracias aos demais membros do laboratorio, que pasaron polo lab máis ou menos tempo pero que de todos aprendín e, de unha maneira ou outra aportaron algo. Gracias aos meus compis de TFM, Ángel, Elodie e Efi, que grandes persoas, Elodie, que ben o pasamos xuntos e que man tes para as galletas...esas "cuquiElos"...ñaaam. Mencións especiales (e que nadie se ofenda polas ausencias, todo o mundo é bo e acordome de todos vos pero é unha mostra de exemplos do grandes que somos os "Celinandos") a Javier, meu primer estudiante; a José Manuel, que me salvou un día ás mil da noite, cando lle estaba ensinando as técnicas de bioloxía molecular mentres eu choraba polas esquinas porque non daba pata con bola polos mGluRs; e aos últimos parrulos: Pierre, Miguel, Sasha; e, Can(dela) e Ales(xandre), que dous tan tremendos, gracias por tantos momentos de risas, sabeume a pouco a vosa estancia no laboratorio, gracias tamén pola axuda que de vez en cando me ofreciades cos meus experimentos. Gracias!

Quero agradecer tamén aos membros dos laboratorios veciños. Gracias a Nuri, unha amiga de verdade, dende o primeiro momento e para sempre, unha persoa incrible e con quen pasei, paso e pasarei momentos insuperables. Gracias a Sol, que me ensinou a usar o corel cando eu estaba desesperado para facer uns esquemas para o TFM. A Santi, en primeirisimo lugar, gracias por tantísimos litros de agua destilada, está claro que unha parte desta tese é túa. Gracias por eses congresos xuntos, gracias por "vir a molestar" ao lab e facer que me distraia de vez en cando, gracias por axudar sempre en todo o que podes, mención especial a túa man cos acuarios. Gracias (ou non?...esto non sei se agradecelo ou queixarme) por, nos escasos momentos nos que non penso en comida, me ves a recordar de que é hora de unha pulga, de unha chocolatada, de galletas, de etc. parte dos quilogramos que ganei durante e tese é gracias a ti. Gracias por escoitarme cando estou cabreado (escasísimos momentos pero todos somos pecadores...jajaja) pero nos que teño que desafogarme....por tantas cousas, gracias!. Gracias a Alberto, por tantos cotilleos que compartimos (como nos gustan os chismorreos!...jajaja), e gracias por eses momentos que me fan reflexionar sobre a miña forma de pensar, ser e actuar; Sheila, gracias en especial por ese aceite realmente delicioso que me traias da túa terra; Yara, unha perda incalculable para o departamento, traballadora e íntegra, o CIMUS xa tiña fama pero contigo ganaron moito; gracias a Ismael, o sorriso de ouro, gracias. Gracias a Natalita, outra persoa que admiro, intelixente, lista, traballadora, atenta, que sabe estar cando se necesita. Gracias por estar aí e por deixarme formar parte da túa vida.

Gracias a Vero, Fran e Alejandra, que pena que tardásemos tantos anos en empezar a coñecernos, pero que grandes momentos de discusións, festa e risas pasamos. Vero, gracias por poñer sempre o sentido común, a voz da razón e un sentido de humor dos que se acercan a ser perigosos por poder causar "risco de morte por risa"; a Fran, gracias por arrastrarme a saír do lab e a disfrutar de festa e vida social "*extra muros*"; a Alejandra, que gran descubrimento coñecerche, brava, peleona, atenta e, sorprendentemente, tamén tes momentos de cariñosa, gracias!

Aos de "o outro lado do pasillo" e outras áreas da USC:

A Miguel, un gran bailarín e que sempre aportas positividade e alegría ao día a día; a Fátima, gracias por encargarte de que sempre teñamos o mateiral común e por coidar tan ben a miña máquina preferida (o criostato), gracias ademais polo teu sentido de humor e polos teu comentarios tan divertidos; gracias a Manolo por esas, escasos pero

interesantes charlas nos cafés e comidas e por contar comigo para intentar aportar un granciño de area na defensa do galego; a Suso, por esas charlas e anécdotas nas comidas; a Eva, gracias por axudarme a abrir a mente e facerme consciente de cousas que eu non vía, gracias polas colaboracións que fixemos, facemos e faremos; a Isabel, gracias por ser tan boa docente, lembro as túas clases con paixón, en algún curso, cando era máis preguiceiro, as túas clases non mas perdía por nada, tes unha facilidade para ensinar o complexo desenvolvemento dun ser vivo dunha forma tan fácil que é incrible, ademais de que sabes espertar nos demais a ilusión e as ganas de saber máis sobre o que estas explicando, gracias tamén polos ánimos, cando nos meus primeiros anos de tese estaba cacharreando ás mil da noite e aparecías ti e sempre tiñas palabras de apoio e ánimo, gracias tamén polos consellos á hora de plantexarme o camiño a seguir para continuar a carreira como investigador.

Gracias a Diego e Xoana, por, entre outras cousas, axudarme coas PCR dos mGlutR que non me saín nin de broma e a Ana Viñas, por deixarme usar o termociclador, conxelador, pHmetro....son pequenos grandes detalles que fan a vida máis fácil. Diego, empezastes dándome consellos sobre deseño de cebadores para PCR e terminastes sendo un colaborador imprescindible, gracias! Gracias a Ana Quelle e Laura Elena, gracias por estar tan abertas a colaborar, traballar con vos é moi doado, estou seguro de que continuaremos así moito tempo.

Aos viaxantes:

Gracias especialmente a Javier de Leboriz e a Isa de Grupo-3 gran profesional que me coida de marabilla, sempre me busca a mellor calidade ao mellor prezo, ademais de ser divertida e simpática, sempre é unha alegría cando te pasas polo lab (ou coincidimos "por ahí").

Ao Personal do CIBUS e da facultade de Bioloxía:

En especial a José (da limpeza), con mil e unha historias e anécdotas que contar e que fas que comezar pola mañá sexa máis agradable cun pouco de charla. Gracias ás chicas de asuntos económicos, Nati e Mar, ¿que sería dos investigadores sen vos? Gracias por axudarme tanto cos papeleos todos, sei que vos dei moito a lata con mil dudas e sempre me atendestes de boa gana, me axudastedes e me resolvestedes todos os problemas que me foron xurdindo. Gracias por ensinarme un pouco da xestión de esta universidade.

Ao Comité organizador da EMI:

Gracias aos compañeiros do comité organizador do Encontro da Mocidade Investigadora VI, xuntos aprendemos moito sobre a organización de congresos ao tempo que o pasamos moi ben. Especialmente a Rocío Martínez, non só por compañeira de comité organizador se non por compañeira de congresos, que ben o temos pasado, como guía turística non tes precio e como compañeira de dúo par cantar por Rocío Jurado....insuperable.

Aos traballadores da estación ictiolóxica de Ximonde:

Imprescindibles para esta tese. Moitas gracias por conseguirnos tantas lampreas, sempre dispostos a axudar, sempre de boa gana, sempre de bo humor. Gracias!

A Mercedes Rivas Cascallar:

Gracias Merche, a doutora dos microscopios, es unha grandísima persoa, tanto profesional como persoalmente falando. Gracias por toda a axuda, manexando o confocal pero tamén pensando e aportando solucións a experimentos que non saían, a pensar en formas de cuantificar, a solucionar problemas con marcaxes (como o de núcleos, que, algún quebradeiro de cabeza nos dou). Tantas horas pasamos xuntos, traballando, sacando as fotos que fixeron posible esta tese, pero tamén charlando, chorando, desafogándonos e rindo. É un privilexio poder traballar contigo. Gracias!

Aos forasteiros:

Dous grandes momentos que vivín durante esta tese son as miñas 2 estancias no estranxeiro:

A primeira, en Alemaña, 2 semanas no programa de entrenamento de neurocientíficos da FENS, donde coñecín a moita xente e aprendín un montón, gracias a todos os membros do departamento de Neuroloxía de Jena, en especial a Sylke Keiner, a Knut Holthoff e Christian Schmeer. Especial agradecemento para a miña compañeira de programa, Luisa, gracias por todos eses momentos. E, a visita ao laboratorio de Henrik Kaessman, gracias pola colaboración, especialmente gracias a Francesco por atenderme perfectamente e a Francisca e Phil, que despois viñeron ao noso lab e cos que compartín bos momento, gracias!.

A segunda, 3 meses en Cambridge. Gracias Mathias por aceptarme no teu grupo, gracias por ensinarme tantas cousas, gracias por introducirme no mundo da investigación con moscas, que me ten namorado, gracias por facerme sentir como un membro máis do

teu equipo, gracias por abrirme as portas do teu grupo para o futuro, gracias por facer que me plantease tantas preguntas sobre a ciencia e o meu futuro. Gracias a Matt por estar sempre disposto a axudarme en todo e por introducirme ao traballo nun laboratorio con moscas, gracias a Eva por axudarme sempre que o necesitei e por esa simpatía, gracias ás demais persoas do lab (Serene, Yi Xing and Hwei Minn) e ao demais do departamento de zooloxía, especialmente ao grupo de Jimena, todo o equipo é fantástico; e aos compañeiros da *tea room*.

Ao persoal docente:

Durante a carreira e máster tiven brillantes docentes pero por mencionar un, Francisco Martín Cora, quen me deu Neurobioloxía, unha forma de ensinar que fomenta moitísimo o traballo persoal dos alumnos e que conseguisches elevar en escala exponencial, o meu amor pola neurociencia. Outros docentes que tiven durante a miña vida e que quero mencionar, sen desmerecer aos demais, son Leonor, tutora en 5º e 6º de primaria, soubeches aumentar as ansias de saber e entender o mundo que xa habitaban dentro de min; a Anxela, profesora de filosofía no instituto, por ensinarme a pensar razoando; a Teresa, profesora de física; a Xulio César, profesor de bioloxía, que intensificastes o meu amor pola bioloxía; Margarita, profesora de historia, despois de toda a vida querendo ser biólogo entroume a dubida, xusto no momento de decidir carreira, gracias por axudarme a tomar unha boa decisión.

Ás outras amizades:

Moitas gracias a todas as persoas que me acompañaron e me acompañan polo camiño da vida. Gracias ás amizades todas que forman parte da miña vida, presente ou pasada.

Aos "Monte Reinlles" e demais amizades que forman parte que gran grupo chegamos a formar. A Rocío (Pose) a primeira (ou das primeiras) persoas que coñecín ao empezar a carreira e dende entón a amizade sempre foi a máis. Entre as primeiras amizades da carreira están tamén María; Aldara, Roi, Miriam e Miguel (os mellores veciños que se pode ter); Paco, que camiñatas de praia e que comilonas nos temos dado; a Elisa, que momentazos de reirnos a dolor, "amantes de Camela" e concertos de rock...jajajajaja...que momentos, que tantas charlas, especialmente sobre a nosa afección (as plantas), gracias por esas cenas de "ensalada estilo Elisa" que gusto chegar de traballar e ter a cea lista, e gracias tamén polas natillas de leite de Paloma....manxar de deuses; e

Emilio, lémbrome do día que che coñecín, que personaxe único, non tes remedio pero non hai nada que remediar, quéreseche como es. Que ganas de unha reunión/festa con todos vos. Creo que nunca o dixen pero sodes parte importantísima de min. Que sorte coñecervos.

Hai tanta xente que me gustaría mencionar...compañeiras de piso: Leti, Alba (Rodríguez), Lidia, Inés....gracias.

Amistades da infancia: Mª José, Álvaro, Miguel, as supernenas (Elisa, Gema, Magdalena) que ben o temos pasado e pasa o tempo e os camiños que seguimos son distintos e aparece a distancia pero a amizade queda para sempre.

Aos amigos de máster! Menudo grupazo somos, que sorte coincidir con todes vos, TODES, que ben o pasamos. Vanesa, es a mellor e sempre me acordarei de como me salvastes aquela semana, gracias; Uxía, que tan fácil se che colle cariño; ás miñas "zorritas"...jajaja...Mari e Clara, que maneira tan peculiar de empezar a levarnos ben. Clara, que tantos momentos compartidos, gracias por ser como es, quéroche moito!

Á familia:

Menos mal que a familia é a que nos toca e non a eliximos porque nin en mil vidas podería deseñar unha familia mellor. Que sorte teño e que orgullo ser parte desta familia. Tíos e tías, primeiros, segundos terceiros, etc, de sangue ou políticos, primos e primas...segundos, terceiros, etc, especialmente as/os curmáns: Que ben o temos pasado! Virginia, Rosina, Jorge, Vanesa, e imos aumentando o equipo...Alberto e Valeria.

Bisavoas, nais ao cubo, Ramona, Manuela e Pepa, unha vida de loita, exemplos de fortaleza, sufrir a morte de seres queridos é unha dor brutal pero que sorte que cheguei a coñecervos. Avós e avoas, outros catro exemplos de modelos a seguir, persoas traballadoras, incansables e que pasaron o impensable para seguir para diante, quérovos moito. Gracias! Avoa María, tiven que aprender a vivir sen ti e, que difícil é, non hai día que non me acorde de ti, daría o que fose por falar un ratiño contigo outra vez e contarche como me vai. Bótoche de menos.

Alba (Sayáns), non sei como definir o que es para min...¿amiga? sería quedarse corto, ¿unha parte de min con vida propia?, ¿es para min o que o aire para os demais humanos? chámalle "x". Gracias a teus pais por facerche e a ti por existires.

Papá e mamá, non lle quedan suficientes anos a este universo para ter tempo a devolvervos algo de todo o que facedes por min. Sempre estades aí para todo, infalibles,

capaces de dar a vida por nos (inclúo a Laura) se fixera falta. Gracias! E gracias tamén por faceres a Laura, isto supera todo o que ninguén pode facer por min nunca.

Laura, última persoa que menciono pero a máis importante. ¿Como pode quedar sorte no mundo se a acabei eu toda téndoche como irmán? Es o mellor que me pasou na vida. Quéroche infinito!

Gracias tamén a:

Rita Levi Montalcini

Santiago Ramón y Cajal

“Yo por qué voy a ser distinta a los setenta que el día siguiente que tengo setenta más un día. Yo considero que la jubilación es discriminatoria”

Margarita Salas

A investigación realizada en esta tese foi financiada por:

- Study of the changes in neurotransmitter systems during spinal regeneration in lampreys. Spanish Ministry of Science and Innovation (BFU2010-17174/BFI). Principal investigator: María Celina Rodicio Rodicio. Duration: 4 years (1/1/2011-31/12/2014). Funding: 148,830 euros.
- Research group consolidation grant of the Galician Government 2014. Xunta de Galicia (Grant number: GPC2014/030). Principal investigator: Victor Manuel Arce. Duration: 2.5 years (24/06/2014-31/12/2016). Funding: 70,000 euros.
- Role of GABA in the survival and regeneration of spinal-projecting brain neurons after spinal cord injury in lampreys. Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2014-56300P). Principal investigator: María Celina Rodicio. Duration: 3 years (01/01/2015-31/12/2017). Funding: 133,100 euros.
- Role of neurotransmitters in axon regeneration following spinal cord injury: serotonin and a novel *in vivo* drug screen. Xunta de Galicia (Grant number: 2016-PG008). Principal investigator: Antón Barreiro-Iglesias. Duration: 2 years (01/08/2016-31/07/2018). Funding: 20,000 euros.
- Searching for drugs to promote axonal regeneration following spinal cord injury. Crowdfunding campaign in the platform *Precipita* of the FECYT, Spanish Ministry of Economy and Competiveness, Spain (Grant number: 2017-CP0081). Principal Investigator: Antón Barreiro-Iglesias. Duration: 1 year (07/2017-07/2018). Funding: 11,620 euros. The project was the most visited and most supported project during its period in the public platform Precipita.
- GABA promotes neuronal survival and axonal regeneration following spinal cord injury by inhibiting the Notch pathway. Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (BFU2017-87079-P). Principal investigators: María Celina Rodicio and Antón Barreiro Iglesias. Duration: 3 years (01/01/2018-31/12/2020). Funding: 114,950 euros.

A realización da estancia predoutoral no laboratorio do Dr. Mathias Langraf foi financiada pola *European Molecular Biology Organization* (EMBO):

- EMBO Short-Term Fellowship. Duration 3 months (01/07/2019-31/09/2019). Funding: 8,990 euros.

As publicacións realizadas durante a miña etapa predoutoral son:

As 6 publicacións que forman da tese:

Barreiro-Iglesias A, **Sobrido-Cameán D**, Shifman MI. (2017). Retrograde activation of the extrinsic apoptotic pathway in spinal-projecting neurons after a complete spinal cord injury in lampreys. BioMed Research International. 2017:5953674. doi: 10.1155/2017/5953674

Sobrido-Cameán D, Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. (2018). The role of serotonin in nervous system regeneration: lessons from regenerating animal models. Neural Regeneration Research. 13, 237-238. doi: 10.4103/1673-5374.226387.

Sobrido-Cameán D, Barreiro-Iglesias A. (2018). Role of caspase-8 and Fas in cell death after spinal cord injury. Frontiers in Molecular Neuroscience. 3, 11:101. doi: 10.3389/fnmol.2018.00101.

Sobrido-Cameán D, Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. (2018). Data on the effect of a muscimol treatment in caspase activation in descending neurons of lampreys after a complete spinal cord injury. Data in Brief. 21, 2037-2041. doi: 10.1016/j.dib.2018.11.003.

Sobrido-Cameán D, Robledo D, Sánchez L, Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. (2019). Serotonin inhibits axonal regeneration of identifiable descending neurons after a complete spinal cord injury in lampreys. Disease Models and Mechanisms. 12(2). pii: dmm037085. doi: 10.1242/dmm.037085.

Sobrido-Cameán D, Fernández-López B, Pereiro N, Lafuente A, Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. Taurine promotes axonal regeneration after a complete spinal cord injury in lampreys. Journal of Neurotrauma. doi: 10.1089/neu.2019.6604.

Outras publicacións:

Romaus-Sanjurjo, D, Fernández-López, B, **Sobrido-Cameán, D,** Barreiro-Iglesias, A, Rodicio, MC. (2017). Cloning of the gabaB Receptor Subunits B1 and B2 and their Expression in the Central Nervous System of the Adult Sea Lamprey. Frontiers in Neuroanatomy. 10:118. doi: 10.3389/fnana.2016.00118

Barreiro-Iglesias A, Fernández-López B**, Sobrido-Cameán D**, Anadón R. (2017). Organization of Alpha-Transducin Immunoreactive System in the Brain and Retina of Larval and Young Adult Sea Lamprey (*Petromyzon marinus*), and their Relationship with Other Neural Systems. Journal of Comparative Neurology. 525, 3683-3704. doi: 10.1002/cne.24296

Fernández-López B, **Sobrido-Cameán D**, Anadón R, Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. (2017). Restricted co-localization of glutamate and dopamine in neurons of the adult sea lamprey brain. Journal of Anatomy. 231, 776-784. doi: 10.1111/joa.12674

Sobrido-Cameán D, Yáñez-Guerra LA, Lamanna F, Conde-Fernández C, Kaessmann H, Elphick MR, Anadón R, Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. (2019). Galanin in an agnathan: precursor identification and localisation of expression in the brain of the sea lamprey Petromyzon marinus. Journal of Neuroanatomy.

Da Silva-Álvarez S, Guerra-Varela J, **Sobrido-Cameán D**, Quelle A, Barreiro-Iglesias A, Sánchez L, Collado M. (2019). Cell senescence contributes to tissue regeneration in Zebrafish. Aging Cell.

Contents

General introduction 3

Chapter 1 17

Chapter 2 31

Chapter 3 43

Chapter 4 51

Chapter 5 55

Chapter 6 73

General discussion 89

Conclusions 101

Resumo 105

GENERAL INTRODUCTION

Traumatic spinal cord injury (SCI) is caused by a mechanical damage to the spinal cord. SCI is currently incurable and treatment is limited to minimising secondary complications and maximising residual function by rehabilitation. Symptoms may include loss of muscle function, sensation, or autonomic function in the parts of the body served by the spinal cord below the level of the injury. Damage after a traumatic SCI has been classically divided into primary and secondary injury: the primary injury refers to the cell death that occurs immediately in the original injury caused by the mechanical forces, and the secondary injury refers to the biochemical cascades that are initiated by the original insult and cause further tissue damage (Ahuja et al., 2017). These secondary injury pathways include the ischemic cascade, inflammation, cell death, and neurotransmitter imbalances. Studies of spinal cord repair can be categorised by their clinical target: rescue, reactivate, and rewire (see Ramer et al., 2014). Different strategies have been proposed to promote the recovery after SCI, for example, reduce neuron death, promote axon regeneration or promote neurogenesis. However, there is not yet an effective treatment for SCI, and although many therapies have been explored clinically, their efficacy is very limited. Therefore, it is necessary to explore innovative ways to treat SCI.

Lampreys are one of the two extant representatives of the most ancient class of vertebrates, the agnathans, which diverged from the main line of vertebrate evolution approximately 450 million years ago. Due to their key phylogenetic position, lampreys are important model for evolutionary biology (Kuratani et al., 2002). Lamprey embryology and developmental genetics have already been crucial in addressing a number of key aspects of early vertebrate evolution (Langille and Hall, 1988a; Shigetani et al., 2002; Osório and Rétaux, 2008; Shimeld and Donoghue, 2012). Another interesting

characteristic of lampreys as an animal model in neuroscience is that, in contrast to mammals, lampreys spontaneously recover locomotion after a complete SCI (see Rodicio and Barreiro-Iglesias, 2012). Lampreys have been used since the 1970's as a model system for studying the recovery of locomotor function after SCI (Parker, 2017).

Brain descending neurons of lampreys include 36 identifiable giant reticulospinal neurons (Jacobs et al., 1997). These include the Mauthner neurons and several pairs of Müller cells. Interestingly, these identifiable descending neurons vary greatly in their survival and regenerative abilities (Jacobs et al., 1997; Shifman et al., 2008). Thus, in lampreys, there is an opportunity to study both enhancement and inhibition of death and/or regeneration in the same preparation. An additional advantage of the lamprey model of SCI is that the identifiable descending neurons and their descending axons can be visualised *in vivo* and in CNS whole-mounts due to the transparency of the lamprey brain. Thus, the lamprey is a convenient vertebrate model for the *in vivo* study of the mechanisms underlying the death/survival and/or regeneration of spinal-projecting neurons after SCI.

The recovery process of lampreys following SCI involves the regeneration of descending spinal axons (Jacobs et al., 1997) and the formation of synaptic connections between the regenerated axons and neurons caudal to the lesion (Rovainen, 1976; Selzer, 1978; Wood and Cohen, 1979). However, regeneration of descending axons in lampreys is incomplete (Becker and Parker, 2015). So, changes are necessary in the connectome above and below the lesion site to compensate the reduced number of descending inputs (Parker, 2017). Different neurotransmitter systems are involved in plastic changes after a SCI and adjust in different ways to the post-injury situation: serotonergic (Cohen et al., 2005; Cornide-Petronio et al., 2014), GABAergic (Svensson et al., 2013; Fernández-

López et al., 2014; Romaus-Sanjurjo et al., 2018a), glutamatergic (Fernández-López et al., 2016), dopaminergic (Fernández-López et al., 2015) and glycinergic (Valle-Maroto, 2017) systems. More recently, our group also showed that endogenous GABA promotes neuronal survival and axon re-growth after a complete SCI in lampreys (Romaus-Sanjurjo et al., 2018b). Thus, neurotransmitters seem to play important roles in recovery and regeneration after SCI.

We aim to understand important aspects of the basic biology responsible for the amazing regenerative capacity of lampreys as compared to mammals. Understanding the molecular processes that are responsible for the recovery of function after SCI in lampreys will serve as a basis to open new research lines in mammalian pre-clinical models and to design new therapies for humans with spinal injuries. The **general aims** proposed to be developed in this Thesis project were:

1. To advance on our knowledge on the process of the cell death after SCI.

It has been reported that a complete SCI induces delayed death of lamprey identifiable descending neurons (Shifman et al., 2008). Evidence for cell death included the disappearance of Nissl staining, the loss of neurofilament expression, the absence of labelling when using retrograde tracers (Shifman et al., 2008), and the earlier staining of these neurons with Fluoro-Jade C, a marker for degenerating neurons, (Busch and Morgan, 2012). The appearance of TUNEL staining (Shifman et al., 2008; Hu et al., 2013) and activated caspases (Barreiro-Iglesias and Shifman, 2012; Hu et al., 2013; Zhang et al., 2014) in the axotomized perikarya suggested that the death of these bad-regenerating neurons in lampreys was apoptotic. However, we do not yet know whether there is or not a correlation between caspase activation and the regeneration/death of descending

neurons in lampreys and which specific signalling pathway/s are involved in the death of these neurons.

2. **To study the possible role of the GABAA receptors in caspase activation in descending neurons following SCI.**

As in mammals, there is a massive release of glutamate, GABA and glycine from most of the spinal neurons close to the lesion site in lampreys after SCI (Fernández-López et al., 2014). Interestingly, between 1 and 3 days after the injury there is an accumulation of GABA around some axotomized axons of descending neurons (Fernández-López et al., 2014). GABA accumulation correlated with a higher survival ability of the corresponding identifiable descending neurons (Fernández-López et al., 2014). Moreover, there is a correlation between the presence of increased GABA inhibition and a better recovery of function in spinal lesioned lampreys (Svensson et al., 2013). More recently, our group showed that endogenous GABA promotes axon re-growth in descending neurons, which could be caused by the inhibition of caspase activation in these neurons (Romaus-Sanjurjo et al., 2018b). The GABA effects appear to be mediated, at least in part, by the activation of GABAB receptors expressed in descending neurons. However, the role of the GABAA receptors in neuronal death after SCI in lampreys is not known.

3. **To study the role of 5-HT in axon regeneration following SCI.**

The first report showing that 5-HT could be involved in neurite outgrowth came in 1984 (Haydon et al., 1984). Haydon and coworkers (1984) demonstrated that growth cones and elongating neurites of the snail *Helisoma trivolvis* neurons are inhibited by the application of 5-HT. The effect of 5-HT seems to be different at different developmental

stages, because the comparison between the effect of application 5-HT on embryonic and adult *H. trivolvis* neurons shows the same inhibitory effects on actively growing neurites; however, 5-HT could reinitiate neurite elongation in non-growing neurites in embryos, but not in non-growing neurites from adults (Goldberg et al., 1991). More recently, a study showed that the application of a selective 5-HT reuptake inhibitor (fluoxetine) on snail neurons (serotonergic or non-serotonergic) inhibits neurite formation and induced growth cone collapse and neurite retraction (Xu et al., 2010). In mammals, a similar effect of 5-HT has been reported. The application of fluoxetine on rat cultured cortical neurons decreased neurite outgrowth (Xu et al., 2010). Moreover, the neurite length of cultured neurons from foetal rats decreases after the application of 5-HT (Sikich et al., 1990). In contrast, there are other reports in mammalian models whose results show the reverse effect of 5-HT. For example, the *in vivo* application of DL-P-chlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA), an inhibitor of 5-HT synthesis, to embryonic rats reduces dendritic complexity in pyramidal neurons (Vitalis et al., 2007). The application of 5-HT to cultured rat neurons induced outgrowth of secondary neurites in embryonic neurons (Rojas et al., 2014) and in neurons from new-born rats (Whitaker-Azmitia and Azmitia, 1989). Interestingly, 5-HT application over *ex vivo* cerebellar slices from rats increases or decreases dendritic areas depending on the region and concentration (Kondoh et al., 2004). The heterogeneous responses to 5-HT supplementation or inhibition could be explained by the heterogeneity of 5-HT receptors depending on developmental stages and nervous system region. Despite the evident role of 5-HT in axon growth during development or in *in vitro* studies, much less is known about its possible effect on axon regeneration after CNS damage.

4. To study the role of taurine on axonal regeneration following SCI.

Taurine is one of the most abundant free amino acids in the brain. It is well known that taurine protects the brain from further damage after a traumatic event. Interestingly, methylprednisolone, which is the only pharmacological therapy approved for the treatment of traumatic SCI, enhances axon regeneration after SCI (Chen et al., 1996, Nash et al., 2002) and is known to cause an increase in the concentration of taurine in the spinal cord (Benton et al., 2001). In vertebrates, taurine can act as an agonist of a variety of neurotransmitter receptors, including GABA receptors (Albrecht and Schousboe, 2005). Recent work of our group has shown that endogenous GABA promotes axonal regeneration of identifiable reticulospinal neurons following SCI in lampreys (see above). These data led us to study the possible effect of taurine in axon regeneration after SCI in lampreys.

To tackle these general aims, we defined the following **specific aims**:

1. Study if caspase activation in lamprey giant identifiable reticulospinal neurons correlates with their survival and regenerative abilities following SCI.
2. Propose a possible signalling pathway regulating the death of reticulospinal neurons following SCI using the results of the previous objective and the revision of existing literature.
3. Study the possible role of GABAA receptors in caspase activation in giant reticulospinal neurons of lampreys following SCI.
4. Compile the current knowledge on the role of 5-HT in neuronal regeneration as a basis for the study of the role of 5-HT in axonal regeneration following SCI in lampreys.
5. Study the role of 5-HT in axonal regeneration following SCI in lampreys

6. Study the role of taurine in axonal regeneration following SCI in lampreys.

The present Thesis has been organized in 6 chapters corresponding to the publications derived from the results obtained pursuing each specify aim.

The first chapter corresponds to the specific aim 1. Here, a significant correlation between levels of activated caspases 2 weeks after SCI and the regenerative ability of giant identifiable neurons of lampreys is shown.

The second chapter corresponds to the specific aim 2. Here, we hypothesize, based on the available literature, that Fas/caspase-8 signalling could be an important player in the degeneration of reticulospinal neurons after SCI in vertebrates.

The third chapter corresponds to the specific aim 3. Here, the effect on caspase activation of a treatment with a specific GABAA receptor agonist (muscimol) is shown. A single dose of muscimol reduces the level of activated caspases 2 weeks after a complete SCI.

The fourth chapter corresponds to the specific aim 4. A revision of the knowledge about the role of 5-HT in neuronal regeneration is presented. Here, we propose the possibility that 5-HT has a role in the regeneration of axons after SCI.

The fifth chapter corresponds to specific aim 5. Here, we present data showing that endogenous 5-HT inhibits axonal regeneration of identifiable descending neurons after a complete spinal cord injury in lampreys. Moreover, we show that changes in the expression of genes that control axonal guidance process could be a key factor determining the 5-HT effects during regeneration.

The sixth chapter corresponds to specific aim 6. Here, we present data showing that taurine promotes axon regeneration following a complete SCI in lampreys.

References

Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J, Choi D, Fehlings MG. 2017. Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. Neurosurgery. 80:S9-S22.

Albrecht J, Schousboe A. 2005. Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. Neurochem Res. 30:1615-1621.

Barreiro-Iglesias A, Shifman MI. 2012. Use of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases to detect neuronal apoptosis in the whole-mounted lamprey brain after spinal cord injury. Enzyme Res. 2012:835731.

Becker MI, Parker D. 2015. Changes in functional properties and 5-HT modulation above and below a spinal transection in lamprey. Front Neural Circuits. 8:148.

Benton RL, Ross CD, Miller KE. 2001. Spinal taurine levels are increased 7 and 30 days following methylprednisolone treatment of spinal cord injury in rats. Brain Res. 893:292-300.

Busch DJ, Morgan JR. 2012. Synuclein accumulation is associated with cell-specific neuronal death after spinal cord injury. J Comp Neurol. 520:1751-1771.

Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. 1996. Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. Exp Neurol. 138:261-276.

Cohen AH, Abdelnabi M, Guan L, Ottinger MA, Chakrabarti L. 2005. Changes in distribution of serotonin induced by spinal injury in larval lampreys: evidence from immunohistochemistry and HPLC. J Neurotrauma. 22:172-188.

Cornide-Petronio ME, Fernández-López B, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2014. Traumatic injury induces changes in the expression of the serotonin 1A receptor in the spinal cord of lampreys. Neuropharmacology. 77:369-378.

Fernández-López B, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2016. Anatomical recovery of the spinal glutamatergic system following a complete spinal cord injury in lampreys. Sci Rep. 6:37786.

Fernández-López B, Romaus-Sanjurjo D, Cornide-Petronio ME, Gómez-Fernández S, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2015. Full anatomical recovery of the dopaminergic system after a complete spinal cord injury in lampreys. Neural Plast. 2015:350750.

Fernández-López B, Valle-Maroto SM, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2014. Neuronal release and successful astrocyte uptake of aminoacidergic neurotransmitters after spinal cord injury in lampreys. Glia. 62:1254-1269.

Goldberg JI, Mills LR, Kater SB. 1991. Novel effects of serotonin on neurite outgrowth in neurons cultured from embryos of Helisoma trivolvis. J Neurobiol. 22:182-194.

Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. 1984. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. Science. 226:561-564.

Hu J, Zhang G, Selzer ME. 2013. Activated caspase detection in living tissuecombined with subsequent retrograde labeling, immunohistochemistry or in situ hybridization in whole-mounted lamprey brains. J Neurosci Methods. 220:92-98.

Jacobs AJ, Swain GP, Snedeker JA, Pijak DS, Gladstone LJ, Selzer ME. 1997. Recovery of neurofilament expression selectively in regenerating reticulospinal neurons. J Neurosci. 17:5206-5220.

Kondoh M, Shiga T, Okado N. 2004. Regulation of dendrite formation of Purkinje cells by serotonin through serotonin 1A and serotonin 2A receptors in culture. Neurosci Res. 48:101-109.

Kuratani S, Kuraku S, Murakami Y. 2002. Lamprey as an evo-devo model: lessons from comparative embryology and molecular phylogenetics. Genesis. 34:175-183.

Langille RM, Hall BK. 1988. The organ culture and grafting of lamprey cartilage and teeth. In Vitro Cell Dev Biol. 24:1-8.

Nash HH, Borke RC, Anders JJ. 2002. Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. J Neurosci. 22:7111-7120.

Osório J, Rétaux S. 2008. The lamprey in evolutionary studies. Dev Genes Evol. 218:221-235.

Parker D. 2017. The Lesioned Spinal Cord Is a "New" Spinal Cord: Evidence from Functional Changes after Spinal Injury in Lamprey. Front Neural Circuits. 11:84.

Ramer LM, Ramer MS, Bradbury EJ. 2014. Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies. Lancet Neurol. 13:1241-1256.

Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. 2012. Lampreys as an animal model in regeneration studies after spinal cord injury. Rev Neurol. 55:157-166.

Rojas PS, Neira D, Muñoz M, Lavandero S, Fiedler JL. 2014. Serotonin (5-HT) regulates neurite outgrowth through 5-HT1A and 5-HT7 receptors in cultured hippocampal neurons. J Neurosci Res. 92:1000-1009.

Romaus-Sanjurjo D, Ledo-García R, Fernández-López B, Hanslik K, Morgan JR, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. 2018b. GABA promotes survival and axonal regeneration in identifiable descending neurons after spinal cord injury in larval lampreys. Cell Death Dis. 9:663.

Romaus-Sanjurjo D, Valle-Maroto SM, Barreiro-Iglesias A, Fernández-López B, Rodicio MC. 2018a. Anatomical recovery of the GABAergic system after a complete spinal cord injury in lampreys. Neuropharmacology. 131:389-402.

Rovainen CM. 1976. Regeneration of Müller and Mauthner axons after spinal transection in larval lampreys. J Comp Neurol. 168:545-554.

Selzer ME. 1978. Mechanisms of functional recovery and regeneration after spinalcord transection in larval sea lamprey. J Physiol. 277:395-408.

Shifman MI, Zhang G, Selzer ME. 2008. Delayed death of identified reticulospinal neurons after spinal cord injury in lampreys. J Comp Neurol. 510:269-282.

Shigetani Y, Sugahara F, Kawakami Y, Murakami Y, Hirano S, Kuratani S. 2002. Heterotopic shift of epithelial-mesenchymal interactions in vertebrate jaw evolution. Science. 296:1316-1319.

Shimeld SM, Donoghue PC. 2012. Evolutionary crossroads in developmental biology: cyclostomes (lamprey and hagfish). Development. 139:2091-2099.

Sikich L, Hickok JM, Todd RD. 1990. 5-HT1A receptors control neurite branching during development. Brain Res Dev Brain Res. 56:269-274.

Svensson E, Kim O, Parker D. 2013. Altered GABA and somatostatin modulation of proprioceptive feedback after spinal cord injury in lamprey. Neuroscience. 235:109-118.

Valle-Maroto S. 2017. Cambios en la expresión de neurotransmisores inhibidores en respuesta a la lesión y durante la regeneración espinal en la lamprea de mar. Universidade de Santiago de Compostela.

Vitalis T, Cases O, Passemard S, Callebert J, Parnavelas JG. 2007. Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. Eur J Neurosci. 26:331-344.

Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. 1989. Stimulation of astroglial serotonin receptors produces culture media which regulates growth of serotonergic neurons. Brain Res. 497:80-85.

Wood MR, Cohen MJ. 1979. Synaptic regeneration in identified neurons of the lamprey spinal cords. Science. 206:344-347.

Xu F, Luk C, Richard MP, Zaidi W, Farkas S, Getz A, Lee A, van Minnen J, Syed NI. 2010. Antidepressant fluoxetine suppresses neuronal growth from both vertebrate and invertebrate neurons and perturbs synapse formation between Lymnaea neurons. Eur J Neurosci. 31:994-1005.

Zhang G, Hu J, Li S, Huang L, Selzer ME. 2014. Selective expression of CSPG receptors PTPσ and LAR in poorly regenerating reticulospinal neurons of lamprey. J Comp Neurol. 522:2209-2229.

GENERAL DISCUSION

Spinal cord injury (SCI) affects more than 50,000 people around the world every year (data from "The National Spinal Cord Injury Statistical Center", 2019). SCI leads to dramatic consequences for affected individuals, whose life literally shatters in seconds. Injured people are fighting to take a step, struggling to maintain their trunk, suffering sexual dysfunction and problems with bladder control (Benevento and Sipski, 2002). In addition, they have to face emotional problems such as depression and anxiety (Kennedy and Rogers, 2000; Zürcher et al., 2019). Great efforts have been carried out to understand mechanisms that could promote spinal cord regeneration and to develop therapies for SCI using not only mammalian models (Verma et al., 2019), but also a variety non-mammalian vertebrate models (e.g. fishes: Noorimotlagh et al., 2017; Ghosh and Hui, 2018). For example, and as seen in this thesis, lampreys have become an important model for the study of successful and spontaneous recovery following SCI (see Barreiro-Iglesias and Rodicio, 2012).

Lampreys recover normal swimming ability after a complete spinal cord transection, which is accompanied by heterogeneous regeneration of their reticulospinal system. Among the reticulospinal cells of the lamprey brainstem, there are 36 giant individually identifiable neurons that show great differences in their ability to regenerate following SCI (Jacobs et al., 1997). Lampreys offer a convenient model to study mechanisms that promote spinal cord regeneration after SCI. The general aim of this thesis was to study the molecular mechanisms involved in the amazing ability of lampreys to recover from a complete SCI. Two major points have been addressed in relation to the regeneration of descending axons after spinal cord damage: mechanisms that prevent neuronal death and pathways that regulate the re-growth of axotomized axons.

First, we demonstrated that in identifiable descending neurons of lampreys there is a significant correlation between the intensity of caspase activation 2 weeks following a complete SCI with their long-term survival and regenerative abilities (chapter 1). Thus, we validated that measurements of intensity of caspase activation 2 weeks after a complete SCI are a good approach to predict the survival/regenerative ability of neurons after axotomy. In all vertebrates, SCI causes the death of neurons and glial cells at the site of injury. This is due to the initial mechanical forces and through a cascade of secondary molecular events that exacerbate cell death (Ahuja et al., 2017). These secondary injury pathways include the ischemic cascade, inflammation and neurotransmitter imbalances. During the secondary injury, apoptotic processes are activated in neurons and glia. However, there is some controversy about retrograde neuronal of death of spinal projecting neurons of the brain following SCI in mammals (see chapter 2). Several studies have shown the death of brain neurons after SCI in mammals, including humans (see chapter 2). However, other studies in rodents showed that spinal projecting surviving neurons were significantly smaller in size after SCI than uninjured neurons but did not detect cell death (McBride et al., 1989; Kwon et al., 2002; Nielson et al., 2011). In lampreys, reticulospinal neurons clearly die after a complete SCI by a delayed caspase-mediated apoptosis (Shifftman et al., 2008; Barreiro-Iglesias and Shifman, 2012, 2015; Hu et al., 2013; Chapter 1, 2 and 3). Our review article (chapter 2) shows that caspase-8 could play an important role in these processes (neuronal death or atrophy).

In chapter 3 we showed that an acute treatment with muscimol, a GABAA receptor agonist, inhibits caspase activation 2 weeks after a complete SCI. Based on our knowledge of the correlation between caspase activation and axon regeneration, we are tempted to hypothesize that a treatment with muscimol might also result in an

improvement in axon regeneration of descending neurons after SCI, although this should be experimentally tested in the future. Results previously reported by our group demonstrated that endogenous GABA promotes the regeneration of giant identifiable reticulospinal neurons after a complete SCI by acting through GABAB receptors (Romaus-Sanjurjo et al., 2018). Present results start to extend these analyses to GABAA receptors. The muscimol results suggest that the activation of GABAA receptors might also promote survival and axon regeneration in descending neurons. Interestingly, in chapter 6, we showed that taurine promotes axon regeneration following a complete SCI. Taurine can act as an agonist of GABAA receptors (Albretch et al., 2005), which further supports the idea that GABAA receptor activation could promote not only neuronal survival but also axon regeneration.

Results of this thesis show that, in a regenerating vertebrate, endogenous 5-HT inhibits axon regeneration in descending neurons after SCI (chapter 5). It is known that neurotransmitters activate various signal transduction pathways. Cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate (cAMP) is a second messenger molecule that plays fundamental roles in cellular responses to neurotransmitters (Greengard, 1976). 5-HT regulates the intracellular levels of cAMP by the activation of 5-HT receptors (Prasad et al., 2019; chapter 5). Different studies have revealed that cAMP modulates axon growth after SCI (Cai et al., 2001; Neumann et al., 2002; Qiu et al., 2002; Lu et al., 2004; Nikulina et al., 2004; Pearse et al., 2004 a, b; Whitaker et al., 2008; Jin et al., 2009; Costa et al., 2013; Lau et al., 2013; Pale et al., 2013; Qi et al., 2019; Chapter 4, 5). Interestingly, several studies have also shown that cAMP can play important roles in neuroprotection (Rydel and Greene, 1988; Hanson et al., 1998; Cui and So, 2004; see Silveira and Linden, 2006; Lau et al., 2013). So, in the future it would be of interest to analyse the 5-HT effects on

neuronal survival after SCI (see above). Recent studies show that 5-HT plays distinct roles in the process of neuronal regeneration after SCI (see chapter 4). For example, in zebrafish, endogenous 5-HT promotes motor neuron production in the spinal cord after a complete SCI by enhancing the proliferation of motor neuron progenitor cells (Barreiro-Iglesias et al., 2015); in turtles, 5-HT inhibits the emergence of serotonergic interneurons after SCI by inhibiting a change in neurotransmitter phenotype of non-serotonergic neurons (Fabbiani et al., 2018). For all of this, we suggest that 5-HT could be a target of interest in non-regenerating mammalian models of SCI, since it can modulate several aspects of the regenerative process (chapter 5).

We studied molecular pathways involved in neuroprotection (chapter 1, 2, 3) and axon regeneration (chapter 4, 5, 6) following a complete SCI in lampreys. This work further suggests that a given signalling pathway can influence both neuroprotection and axon regeneration after axotomy. Recent studies from other groups have also revealed that molecular mechanisms that reduce neuronal apoptosis also promote neuron regeneration (Boczek et al., 2019; Lei et al., 2019). Our group recently reported that GABA and baclofen treatment inhibits caspase activation and promote axon regeneration following SCI in lampreys (Romaus-Sanjurjo et al., 2018). Here, we have obtained additional information about the role of neurotransmitters in spinal cord regeneration following complete SCI. This thesis corroborates that lampreys constitute a reliable model for the study of the molecular mechanisms that underlie spontaneous recovery after SCI. Moreover, these results establish a solid basis for the study of new therapies for the regeneration of the mammalian spinal cord after injury. Translation of all this knowledge to pre-clinical studies is of obvious and crucial importance.

References

Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J, Choi D, Fehlings MG. (2017). Traumatic Spinal Cord Injury-Repair and Regeneration. Neurosurgery 80: S9-S22.

Albrecht J, Schousboe A. (2005). Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. Neurochem Res 30: 1615-1621.

Barreiro-Iglesias A, Shifman MI. (2012). Use of fluorochrome-labeled inhibitors of caspases to detect neuronal apoptosis in the whole-mounted lamprey brain after spinal cord injury. Enzyme Res. 2012: 835731.

Barreiro-Iglesias A, Shifman MI. (2015). Detection of activated caspase-8 in injured spinal axons by using fluorochrome-labeled inhibitors of caspases (FLICA). Methods Mol Biol. 1254: 329-339.

Benevento BT, Sipski ML. (2002). Neurogenic bladder, neurogenic bowel, and sexual dysfunction in people with spinal cord injury. Physical therapy. 82: 601-612.

Boczek T, Cameron EG, Yu W, Xia X, Shah SH, Castillo Chabeco B, Galvao J, Nahmou M, Li J, Thakur H, Goldberg JL, Kapiloff MS. (2019). Regulation of Neuronal Survival and Axon Growth by a Perinuclear cAMP Compartment. J Neurosci. 39: 5466-5480.

Cai D, Qiu J, Cao Z, McAtee M, Bregman BS, Filbin MT. (2001). Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. J Neurosci. 21: 4731-9.

Chen L. (2018). Microtubules and axon regeneration in C. elegans. Mol Cell Neurosci. 91: 160-166.

Costa LM, Pereira JE, Filipe VM, Magalhães LG, Couto PA, Gonzalo-Orden JM, Raimondo S, Geuna S, Maurício AC, Nikulina E, Filbin MT, Varejão AS. (2013). Rolipram promotes functional recovery after contusive thoracic spinal cord injury in rats. Behav Brain Res. 243: 66-73.

Fabbiani G, Rehermann MI, Aldecosea C, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. (2018). Emergence of Serotonergic Neurons After Spinal Cord Injury in Turtles. Front Neural Circuits. 13: 12-20.

Fang Y, Bonini NM. (2012). Axon degeneration and regeneration: insights from Drosophila models of nerve injury. Annu Rev Cell Dev Biol. 28: 575-597.

Ghosh S, Hui SP. (2018). Axonal regeneration in zebrafish spinal cord. Regeneration(Oxf) 5: 43-60.

Greengard P. (1976). Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. Nature. 260: 101-108.

Hu J, Zhang G, Selzer ME. (2013). Activated caspase detection in living tissue combined with subsequent retrograde labeling, immunohistochemistry or *in situ* hybridization in whole-mounted lamprey brains. J Neurosci Methods. 220: 92-98.

Jacobs AJ, Swain GP, Snedeker JA, Pijak DS, Gladstone LJ, Selzer ME. (1997). Recovery of neurofilament expression selectively in regenerating reticulospinal neurons. J Neurosci. 17: 5206-5220.

Jin LQ, Zhang G, Jamison C Jr, Takano H, Haydon PG, Selzer ME. (2009). Axon regeneration in the absence of growth cones: acceleration by cyclic AMP. J Comp Neurol. 515: 295-312.

Kennedy P, Rogers BA. (2000). Anxiety and depression after spinal cord injury: a longitudinal analysis. Arch Phys Med Rehabil 81: 932-937.

Kwon BK, Liu J, Oschipok L, Tetzlaff W. (2002). Reaxotomy of chronically injured rubrospinal neurons results in only modest cell loss. Exp Neurol. 177: 332-337.

Lau BY, Fogerson SM, Walsh RB, Morgan JR. (2013). Cyclic AMP promotes axon regeneration, lesion repair and neuronal survival in lampreys after spinal cord injury. Exp Neurol. 250: 31-42.

Lei F, He W, Tian X, Zhou Q, Zheng L, Kang J, Song Y, Feng D. (2019). GSK-3 Inhibitor promotes neuronal cell regeneration and functional recovery in a rat model of spinal cord injury. Biomed Res Int. 2019: 9628065.

Lu P, Yang H, Jones LL, Filbin MT, Tuszynski MH. (2004). Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. J Neurosci. 24: 6402-6409.

McBride RL, Feringa ER, Garver MK, Williams JK Jr. (1989). Prelabeled red nucleus and sensorimotor cortex neurons of the rat survive 10 and 20 weeks after spinal cord transection. J Neuropathol Exp Neurol. 48: 568-576.

Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI. (2002). Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. Neuron. 34: 885-893.

Nielson JL, Strong MK, Steward O. (2011). A reassessment of whether cortical motor neurons die following spinal cord injury. J Comp Neurol. 519: 2852-2869.

Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, Bregman BS, Filbin MT. (2004). The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 8786-8790.

Noorimotlagh Z, Babaie M, Safdarian M, Ghadiri T, Rahimi-Movaghar V. (2017). Mechanisms of spinal cord injury regeneration in zebrafish: a systematic review. Iran J Basic Med Sci. 20: 1287-1296.

Pale T, Frisch EB, McClellan AD. (2013). Cyclic AMP stimulates neurite outgrowth of lamprey reticulospinal neurons without substantially altering their biophysical properties. Neuroscience. 245: 74-89.

Pearse DD, Bunge MB. (2004 A). Paralysis research: Promoting nerve fiber protection, growth and functional recovery by cyclic AMP and cell transplantation. Discov Med. 4: 199-202.

Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, Bunge MB. (2004 B). cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. Nat Med. 10: 610-616.

Prasad S, Ponimaskin E, Zeug A. (2019). Serotonin receptor oligomerization regulates cAMP-based signaling. J Cell Sci. 132. pii: jcs230334.

Qi B, Sun R, Rong J, Peng Z, Wang Y. (2019). Cyclic adenosine phosphate improves functional recovery after spinal cord injury via activating unfolded protein response. Pharmazie. 74: 115-119.

Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT. (2002). Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. Neuron. 34: 895-903.

Rodemer W, Selzer ME. (2019). Role of axon resealing in retrograde neuronal death and regeneration after spinal cord injury. Neural Regen Res. 14: 399-404.

Rodicio MC, Barreiro-Iglesias A. (2012). Lampreys as an animal model in regeneration studies after spinal cord injury. Rev Neurol. 55: 157-66.

Romaus-Sanjurjo D, Ledo-García R, Fernández-López B, Hanslik K, Morgan JR, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. (2018). GABA promotes survival and axonal regeneration in identifiable descending neurons after spinal cord injury in larval lampreys. Cell Death Dis 9: 663

Romaus-Sanjurjo D, Ledo-García R, Fernández-López B, Hanslik K, Morgan JR, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC. (2018). GABA promotes survival and axonal regeneration in identifiable descending neurons after spinal cord injury in larval lampreys. Cell Death Dis. 9: 663.

Shifman MI, Zhang G, Selzer ME. (2008). Delayed death of identified reticulospinal neurons after spinal cord injury in lampreys. J Comp Neurol 510:269-282.

Shifman MI, Zhang G, Selzer ME. (2008). Delayed death of identified reticulospinalneurons after spinal cord injury in lampreys. J Comp Neurol. 510: 269-282.

Silveira M.S., Linden R. (2006). Neuroprotection by cAMP. In: Bähr M. (eds) Brain Repair. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 557. Springer, Boston, MA

Verma R, Virdi JK, Singh N, Jaggi AS. (2019). Animals models of spinal cord contusion injury. Korean J Pain 32: 12-21.

Whitaker CM, Beaumont E, Wells MJ, Magnuson DS, Hetman M, Onifer SM. (2008). Rolipram attenuates acute oligodendrocyte death in the adult rat ventrolateral funiculus following contusive cervical spinal cord injury. Neurosci Lett. 438: 200-204.

Zürcher C, Tough H, Fekete C; SwiSCI Study Group. Mental health in individuals with spinal cord injury: (2019). The role of socioeconomic conditions and social relationships. PLoS One 14: e0206069.

CHAPTER 1

RETROGRADE ACTIVATION OF THE EXTRINSIC APOPTOTIC PATHWAY IN SPINAL-PROJECTING NEURONS AFTER A COMPLETE SPINAL CORD INJURY IN LAMPREYS

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733621/pdf/BMRI2017-5953674.pdf

Note: My contribution to this article was the experiments related to "*Levels of Activated Caspases 2 Weeks after a Complete SC Transection Correlate Significantly with the Long-Term Regenerative Ability of Identifiable Neurons*"

CHAPTER 2

ROLE OF CASPASE-8 AND FAS IN CELL DEATH AFTER SPINAL CORD INJURY

https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2018.00101/full

CHAPTER 3

DATA ON THE EFFECT OF A MUSCIMOL TREATMENT IN CASPASE ACTIVATION IN DESCENDING NEURONS OF LAMPREYS AFTER A COMPLETE SPINAL CORD INJURY

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6258874/pdf/main.pdf

CHAPTER 4

SEROTONIN CONTROLS AXON AND NEURONAL REGENERATION IN THE NERVOUS SYSTEM: LESSONS FROM REGENERATING ANIMAL MODELS

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5879892/

CHAPTER 5

SEROTONIN INHIBITS AXONAL REGENERATION OF IDENTIFIABLE DESCENDING NEURONS AFTER A COMPLETE SPINAL CORD INJURY IN LAMPREYS

https://dmm.biologists.org/content/12/2/dmm037085.long

CHAPTER 6

TAURINE PROMOTES AXONAL REGENERATION AFTER A COMPLETE SPINAL CORD INJURY IN LAMPREYS

https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/neu.2019.6604

Note: My contribution to this article is the experiments related to “taurine treatments”

CONCLUSIONS

1. Caspase activation in lamprey giant identifiable reticulospinal neurons correlates, negatively, with their survival ability following a complete SCI.
2. Caspase activation in lamprey giant identifiable reticulospinal neurons correlates, negatively, with their regenerative ability following a complete SCI.
3. Fas/Caspase-8 is an important signalling pathway regulating neuronal death following SCI.
4. Muscimol, a GABAA receptor agonist, reduces caspase activation in giant reticulospinal neurons of lampreys following a complete SCI.
5. 5-HT is an important modulator of neuronal regeneration in invertebrate and vertebrate species.
6. Endogenous 5-HT inhibits axonal regeneration following a complete SCI in lampreys.
7. Taurine promotes axonal regeneration following a complete SCI in lampreys.

RESUMO

Unha lesión medular traumática (SCI) é causada por un dano mecánico na medula espiñal. A SCI é, actualmente, incurable e o tratamento limítase a minimizar as complicacións secundarias e maximizar a función residual mediante rehabilitación. Os síntomas poden incluír a perda de función muscular, sensibilidade ou a función autónoma nas partes do corpo innervadas pola medula espiñal por baixo do nivel da lesión. Propuxéronse diferentes estratexias para promover a recuperación despois da SCI, por exemplo, reducir a morte das neuronas, promover a rexeneración de axóns danados ou promover a neuroxénese. Non obstante, aínda non hai un tratamento eficaz para a SCI e, aínda que se exploraron varias posibles terapias, a súa eficacia é moi limitada. Por iso, é necesario buscar xeitos innovadores para o tratamento da SCI.

As lampreas son un dos dous animais existentes da clase de vertebrados máis antiga, os *agnathan*, que diverxeron da liña principal da evolución dos vertebrados hai aproximadamente 450 millóns de anos. Debido á súa posición filoxenética, as lampreas son un modelo interesante para estudiar a evolución dos animais. Estudios embriolóxicos e xenéticos sobre o desenrolo da lamprea xa foron cruciais para abordar varios aspectos clave da evolución dos primeiros vertebrados.

Outra característica interesante das lampreas como modelo animal en neurociencia é que, en contraste cos mamíferos, as lampreas recuperan de forma espontánea a capacidade de nadar despois dunha SCI completa. As lampreas utilizáronse desde 1970 como sistema modelo para estudar a recuperación da función locomotora despois dunha SCI. As neuronas descendentes do cerebro, é dicir, que proxectan á medula espiñal, das lampreas inclúen 36 neuronas reticulospiñais xigantes identificables. Estas inclúen as neuronas Mauthner e varios pares de células Müller. Curiosamente, estas neuronas descendentes identificables varían moito na súa supervivencia e habilidades

rexenerativas. Así, as lampreas, ofrecen unha oportunidade para estudar tanto a mellora como a inhibición da morte e/ou a rexeneración nun mesmo sistema. Unha vantaxe adicional de estudar a SCI en lampreas é que as neuronas descendentes identificables e os seus axóns descendentes poden visualizarse *in vivo* debido á transparencia do cerebro da lamprea. Así, a lamprea é un modelo vertebrado moi bo para o estudo *in vivo* dos mecanismos subxacentes á morte/supervivencia e/ou rexeneración de neuronas que proxectan á medula espiñal despois dunha SCI. O proceso de recuperación das lampreas tras a SCI implica a rexeneración de axóns espiñais descendentes e a formación de conexións sinápticas entre os axóns rexenerados e as neuronas caudais coa lesión. Non obstante, a rexeneración de axóns descendentes en lampreas é incompleta. Diferentes sistemas de neurotransmisores están implicados en cambios plásticos tras unha SCI e inflúen de diferentes xeitos sobre a situación posterior á lesión. Recentemente, o noso grupo tamén demostrou que o GABA endóxeno promove a supervivencia neuronal e o crecemento dos axóns despois dunha SCI completa en lampreas. Así, os neurotransmisores parecen desempeñar papeis importantes na recuperación e rexeneración despois da SCI.

O obxetivo desta tese é comprender aspectos importantes da bioloxía básica responsables da sorprendente capacidade rexenerativa das lampreas en comparación cos mamíferos. Comprender os procesos moleculares que son responsables da recuperación da función despois da SCI en lampreas servirá de base para abrir novas liñas de investigación en modelos preclínicos de mamíferos e deseñar novas terapias para humanos con lesións na medula espiñal.

No **capítulo 1**, investigamos os proceso apoptóticos activados en neuronas descendentes identificables de lampreas despois da SCI. Para iso, estudamos a activación

das caspasas empregando inhibidores de caspasas marcados con fluorocromo, a dexeneración de neuronas que proxectan á medula espiñal mediante unha tinción de Fluro-Jade C e a implicación da vía apoptótica intrínseca mediante inmunofluorescencia do citocromo C e V. Algunhas neuronas reticulospinais da lamprea do mar foron nomeadas como "malas rexeneradoras" porque os seus axóns tiñan unha baixa probabilidade de rexenerarse despois da axotomía debido a unha SCI completa. En estudos posteriores, case as mesmas células foron identificadas como neuronas "malas sobrevivintes" porque teñen unha alta probabilidade de dexenerarse e morrer despois da axotomía. As malas neuronas rexeneradoras/pobres sobreviventes mostran altos niveis de caspasas activadas nas dúas primeiras semanas despois dunha SCI completa. Non obstante, estes estudos nunca estableceron unha correlación estatística entre a intensidade do marcaxe das caspasas nas dúas primeiras semanas posteriores á lesión e a capacidade rexenerativa a longo prazo das neuronas identificables individualmente. Aquí, empregamos *FLICA poli-caspasa (FAM-VAD-FMK)* para detectar todas as caspasas activadas 2 semanas despois dunha SCI completa e correlacionamos os niveis de caspasas activadas en neuronas identificables coa súa coñecida capacidade rexeneradora. Isto revelou unha correlación significativa entre o nivel de caspasas activadas (intensidade de fluorescencia) e a coñecida capacidade rexeneradora das neuronas identificables. Ademais, os nosos resultados dan evidencias de que, despois da SCI, as neuronas que proxectan á medula espiñal dexeneran lentamente e que a vía extrínseca da apoptose participa neste proceso. Experimentos co estabilizador de microtúbulos *Taxol* demostraron que a sinalización vía caspasa-8 é transportada retrogradamente desde o sitio da lesión ata o soma neuronal. A prevención da activación deste proceso podería ser un enfoque terapéutico importante despois da SCI en mamíferos.

No **capítulo 2** revisamos o coñecemento actual sobre o papel da caspasa-8 e a vía Fas na morte celular tras a SCI e proporcionamos unha perspectiva para os traballos futuros sobre este proceso. A perda de neuronas e células gliais que non se substitúen despois da lesión é unha das principais causas de discapacidade despois da SCI. Unha ampla evidencia acumulada nas últimas décadas demostrou que a activación de mecanismos apoptóticos é un dos factores que causan a morte de células intrínsecas da medula espiñal despois da SCI. Aínda que isto non é tan claro para as neuronas cerebrais que innervan a medula espiñal, algúns estudos tamén demostraron que a apoptose pode activarse nas neuronas descendentes do cerebro tras a SCI. Hai dúas vías apoptóticas principais, a vía extrínseca ou do receptor da morte e a vía intrínseca ou mitocondrial. A activación da caspasa iniciadora caspasa-8 é un paso importante na iniciación da vía extrínseca. Estudos en roedores demostraron que a caspasa-8 está activada en células e neuronas da medula espiñal e que o receptor de Fas xoga un papel clave na súa activación tras unha SCI traumática. Ademais, traballos recentes en lamprea tamén demostraron a activación retrógrada da caspase-8 en neuronas cerebrais descendentes identificables tras unha SCI completa (capitulo 1).

Como se mostra neste capítulo, varios traballos confirmaron que a activación da caspasa-8 e a vía extrínseca da apoptose é un dos mecanismos que causan a morte celular durante unha lesión secundaria despois de unha SCI e que a vía de sinalización FasL/Fas xoga un papel clave neste proceso. Sorprendente, ningún estudo intentou inhibir directamente a caspase-8 despois da SCI. Este enfoque experimental pode resultar de interese, especialmente porque a activación de caspasa-8 non só está causada pola activación do receptor de Fas, o que podería levar a novas melloras na recuperación do SCI. Outro obxectivo para futuros traballos, e baseándose nos resultados obtidos en

lamprea, podería ser investigar a posible activación da caspasa-8 en neuronas descendentes de mamíferos tras SCI e a implicación da sinalización Fas e do transporte retrógrado neste proceso. Finalmente, a tradución de todo este coñecemento a estudos preclínicos ou incluso ensaios clínicos tería unha importancia evidente e crucial.

No **capítulo 3**, inhibimos a activación de caspasas en neuronas reticulospinais identificables de lampreas despois dunha SCI utilizando un agonista específico do receptor GABAA (muscimol). Os datos presentados neste capitulo son cuantificacións do marcaxe fluorescente de neuronas descendentes identificables de lampreas tras unha SCI utilizando inhibidores de caspasas marcados con fluorocromo e a correspondente análise estatística. Unha única dose de muscimol diminuíu a intensidade do marcaxe de FLICA en neuronas reticulospiñais identificables xigantes tras unha lesión medular nas lampreas.

O **capítulo 4** é unha revisión que mostra que a 5-HT xoga un papel clave tanto na modulación do re-crecemento do axón como na xeración de novas neuronas despois da lesión do sistema nervioso. Tamén damos a nosa propia perspectiva sobre como debe avanzar o estudo do papel do 5-HT na rexeneración do sistema nervioso. Manipular sistemas de neurotransmisores como o 5-HT podería ser un xeito innovador de promover a rexeneración despois das lesións do sistema nervioso central.

Poucos estudos analizaron o papel dos neurotransmisores na rexeneración tras unha lesión traumática do sistema nervioso; incluso cando estes apuntan a un papel clave dos neurotransmisores na rexeneración de axóns ou células. Un dos principais candidatos a neurotransmisores a ser mediador en procesos rexenerativos no sistema nervioso central é a 5-HT. A 5-HT xoga un papel importante durante o desenvolvemento do sistema nervioso; por exemplo, no crecemento das dendritas e dos axóns. Revisamos o coñecemento actual sobre o papel deste neurotransmisor na rexeneración de células e

axóns a partir de estudos *in vitro, ex vivo* e *in vivo* en diferentes especies (por exemplo, invertebrados e peixes). Esta revisión mostra que a 5-HT xoga un papel importante tanto na modulación do re-crecemento dos axóns como na xeración de novas neuronas despois da lesión do sistema nervioso en especies con capacidade para rexenerar.

Estudos de rexeneración en modelos como invertebrados e peixes están a revelar un papel crucial da 5-HT na modulación de procesos rexeneradores tras lesións traumaticas do sistema nervioso. Non obstante, necesítase máis estudios para comprender plenamente o papel que xogan diferentes receptores de neurotransmisores neste proceso. É necesario o uso de ferramentas xenéticas ou fármacos máis específicos para descifrar a contribución de cada receptor de 5-HT na rexeneración axónica ou neuronal. Futuros estudios debería intentar trasladar os resultados en especies con capacidade rexeneradora a modelos "non rexeneradores". Unha vez que teñamos unha imaxe clara do papel específico da 5-HT e de cada un dos seus receptores na rexeneración, a posible tradución deste coñecemento á clínica será facilitada pola existencia de medicamentos serotonérxicos que xa están en uso en pacientes humanos con outras problemas.

No **capítulo 5** utilizamos o modelo de lamprea en lesión medular para estudar o efecto da 5-HT na rexeneración dos axóns das neuronas descendentes identificables. As manipulacións farmacolóxicas e xenéticas tras unha SCI completa demostraron que a 5-HT endóxena inhibe a rexeneración axonal en neuronas descendentes identificables mediante a activación dos receptores da serotonina 1A e unha posterior diminución dos niveis de cAMP. A secuenciación de ARN revelou que os cambios na expresión de xenes que controlan o crecemento dos axóns poderían ser un factor clave nos efectos da 5-HT durante a rexeneración. Este capítulo proporciona unha base para novos estudios en

modelos de SCI de mamíferos non rexeneradores e amplía as funcións coñecidos da sinalización de 5-HT durante a rexeneración neuronal.

Para revelar o efecto do 5-HT na rexeneración de neuronas descendentes identificables, as lampreas tratáronse con 5-HT durante un mes despois dunha SCI completa. 11 semanas despois da lesión vimos que, o tratamento con 5-HT, inhibiu significativamente a rexeneración das neuronas descendentes identificables das lampreas. É importante destacar que as análises de comportamento revelaron que o tratamento con 5-HT non causaron un efecto tóxico xeral xa que a recuperación locomotora non se viu afectada polo tratamento con 5-HT. Ademais, levamos a cabo un experimento de "rescate" no que os animais tratados con 5-HT como anteriormente tamén foron tratados con dibutiril-cAMP (db-cAMP). O tratamento db-cAMP bloqueou o efecto inhibidor do 5-HT.

Os nosos experimentos de hibridación *in situ* para estudiar o transcrito do receptor de 5-HT1A revelaron que en neuronas malas rexeneradoras hai un aumento significativo na expresión do receptor 5-HT1A 4 semanas despois da SCI completa, mentres que nas neuronas boas rexeneradoras (neuronas M1 e I3) a expresión do receptor diminúe (non significativamente) nas primeiras semanas despois dunha SCI completa. O análise estatísticos revelou unha correlación significativa entre a porcentaxe de aumento/diminución da expresión do receptor e a capacidade rexenerativa a longo prazo de neuronas identificables. Estes datos suxiren que a presenza e actividade do receptor 5-HT1A en neuronas descendentes pode inhibir a rexeneración axónica despois dunha SCI completa.

Tamén tratamos a outro grupo de animais durante 4 semanas despois dunha SCI completa co antagonista do receptor 5-HT1A WAY-100,135. O tratamento con WAY-

100.135 promoveu significativamente a rexeneración dos axóns en neuronas identificables en comparación cos animais tratados con vehículos control. Para confirmar que o efecto inhibidor da 5-HT endóxena débese á activación dos receptores 5-HT1A expresados en neuronas descendentes identificables, decidimos inhibir especificamente a expresión do receptor nestas neuronas empregando morfolinos dirixidos contra o sitio de iniciación da tradución. do receptor 5-HT1A. A aplicación deste morfolino promoveu significativamente a rexeneración dos axóns de neuronas identificables tras unha SCI completa. Como control da especificidade empregouse un segundo morfolino dirixido á rexión non traducida de 5 'do ARNm 5-HT1a (non solapada co primeiro morfolino). A aplicación deste segundo morfolino promoveu significativamente a rexeneración de axóns de neuronas identificables. Tanto os tratamentos co antagonista como con morfolinos indican que a 5-HT endóxena inhibe a rexeneración dos axóns en neuronas identificables despois da SCI mediante a activación de receptores 5-HT1A expresados nestas neuronas.

Os experimentos de ganancia e perda de función revelaron que a 5-HT endóxena inhibe a rexeneración de axóns tras a SCI en lampreas a través da activación dos receptores 5-HT1A e que este efecto podería ser causado por unha diminución dos niveis de cAMP intracelulares. Para ver os xenes que poderían estar implicados no control intrínseco da rexeneración do axón e cuxa expresión está modulada pola actividade dos receptores 1A, decidimos repetir o tratamento WAY-100.135 e realizar un estudo de secuenciación de ARN no cerebro de lampreas 4 semans despois da SCI. A análise de vías mediante *Reactoma* revelou 29 vías enriquecidas de forma significativa. Entre estes, os máis interesantes son vías de "guía axónica", "Sinalización por receptores ROBO" e "Regulación de expresión de SLITs e ROBOs".

No **capítulo 6**, demostramos que a taurina promove a rexeneración axonal despois dunha SCI completa. A taurina é un dos aminoácidos máis abundantes no cerebro e ten varias funcións fisiolóxicas, incluída a osmorregulación e a modulación dos niveis de calcio intracelular. Moitos estudos demostraron tamén que a taurina pode protexer o cerebro contra danos mecánicos. Non obstante, só algúns estudos suxeriron que a taurina tamén podería promover a rexeneración do axón despois de unha axotomía. A metilprednisolona, que é a única terapia farmacolóxica aprobada para o tratamento das SCI traumáticas, aumenta a rexeneración dos axóns despois da SCI e tamén provoca un aumento na concentración de taurina.

En vertebrados, a taurina pode actuar como agonista de unha diversa variedade de receptores de neurotransmisores, incluídos os receptores de GABA. O GABA endóxeno promove a rexeneración axonal de neuronas reticulospinais identificables tras unha SCI en lampreas. Os efectos beneficiosos do GABA parecen estar mediados principalmente mediante a activación dos receptores GABAB. No capítulo 3 desta tese demostramos que a activación dos receptores de GABAA empregando o agonista muscimol tamén reduce a activación de caspasas en neuronas identificables tras SCI en lampreas. No capítulo 6, mostramos que os niveis de taurina aumentan 4 semanas despois dunha SCI completa na medula espiñal das lampreas e que un tratamento agudo con taurina promove aínda máis a rexeneración dos axóns das neuronas xigantes reticuloespiñais. 11 semanas despois da laesión, o tratamento con taurina mellorou significativamente a rexeneración de neuronas descendentes identificables das lampreas e aumentou significativamente o número de axóns rexenerados tras SCI. Estes resultados demostran que a subministración de taurina no momento da lesión mellora aínda máis a capacidade de rexeneración dos axóns da lamprea. Así, amosamos, por primeira vez, o efecto da taurina favorecendo a rexeneración

dos axóns tras unha SCI. En próximos estudios sería de interese descifrar os mecanismos subxacentes detrás do efecto proxenerativo da taurina.

Os resultados desta tese demostran que, nun vertebrado con capacidade de rexenear, a 5-HT endóxena inhibe a rexeneración dos axóns das neuronas descendentes despois da SCI (capítulo 5). Sábese que os neurotransmisores activan varias vías de transducción de sinal. A adenosina cíclica 3 ', 5'-monofosfato (cAMP) é un segundo mensaxeiro que desempeña papeis fundamentais nas respostas celulares aos neurotransmisores. A 5-HT regula os niveis intracelulares de cAMP mediante a activación de receptores 5-HT (capítulo 5). Diferentes estudos revelaron que o cAMP modula o crecemento do axón tras SCI (capítulo 4, 5). Curiosamente, varios estudos tamén demostraron que a cAMP pode desempeñar importantes funcios neuroprotectoras. Así, no futuro sería de interese analizar os efectos da 5-HT sobre a supervivencia neuronal despois da SCI. Estudos recentes demostran que a 5-HT desempeña distintos papeis no proceso de rexeneración neuronal despois da SCI (ver capítulo 4). Por exemplo, no peixe cebra, a 5-HT endóxena promove a produción de neuronas motoras na medula espiñal despois dunha SCI completa aumentando a proliferación de células progenitoras de neuronas motoras; en tartarugas, a 5-HT inhibe a aparición de interneuronas serotonérxicas despois da SCI ao inhibir un cambio no fenotipo neurotransmisor de neuronas non serotonérxicas. Por todo isto, suxerimos que a 5-HT podería ser unha diana de interese para os modelos de mamíferos non rexeneradores , xa que pode modular varios aspectos do proceso de rexeneración (capítulo 5).

Nesta tese estudamos rutas moleculares implicadas na neuroprotección (capítulo 1, 2, 3) e na rexeneración do axón (capítulo 4, 5, 6) despois de unha SCI completa en lampreas. Este traballo suxire ademais que unha vía de sinalización determinada pode

influír tanto na neuroprotección como na rexeneración do axón despois da axotomía. Estudos recentes doutros grupos tamén revelaron que os mecanismos moleculares que reducen a apoptose neuronal tamén promoven a rexeneración de neuronas. O noso grupo descubriu recentemente que o tratamento con GABA e baclofen inhibe a activación das caspasas e promove a rexeneración do axón tras a SCI nas lampreas. Nesta tese obtivemos información adicional sobre o papel dos neurotransmisores na rexeneración da medula espiral tras unha SCI completa. Esta tese corrobora que as lampreas constitúen un modelo fiable para o estudo dos mecanismos moleculares subxacentes á recuperación espontánea despois da SCI. Ademais, estes resultados establecen unha base sólida para o estudo de novas terapias para a rexeneración da medula espiñal despois da lesión. A translación de todo este coñecemento a estudos preclínicos podería ter unha importancia relevante para a procura de un tratamento eficiente que promova a rexeneración da medula espiñal e que permita que as persoas que sufran este problema poidan ter unha solución.