MODULACIÓN DE LAS REDES PERINEURALES A TRAVÉS DE EJERCICIO FÍSICO TRAS UNA LESIÓN MEDULAR EN MODELOS ANIMALES: PLASTICIDAD VERSUS ESTABILIDAD DE LOS CIRCUITOS NEURALES

Dra. Esther Udina Bonet
Facultat de Medicina - Universitat Autònoma de Barcelona
Dr. Joost Verhaagen
Netherlands Institute for Neuroscience - Royal Netherlands Academy of Sciences. Países Bajos

1. Resumen

Las lesiones medulares (LM) conllevan importantes déficits por debajo de la lesión que suelen ser muy invalidantes para los pacientes que las padecen; desgraciadamente, no existen tratamientos para revertirlos. La rehabilitación física es una prometedora estrategia para modular la plasticidad y favorecer la recuperación funcional en estos pacientes. Conocer sus mecanismos de acción y sus limitaciones permitiría optimizar su aplicación clínica y diseñar terapias combinadas que permitieran mejorar la calidad de vida y la recuperación de estos pacientes. Puesto que las redes perineuronales (RPN) regulan la plasticidad neural, favoreciendo la estabilización sináptica versus la plasticidad, probablemente son clave en los cambios plásticos observados después de una LM. Es interesante remarcar que la actividad reduce las RPN encefálicas, lo cual favorece la plasticidad, pero incrementa las RPN espinales, lo que refuerza la estabilidad de los circuitos espinales. De todas formas, el papel de las RPN después de lesión medular y cómo la rehabilitación podría modularlas han sido muy poco estudiados. El presente proyecto se basa en la hipótesis de que, tras una LM, la menor actividad por debajo de la lesión conllevaría una reducción de las RPN en torno a las motoneuronas espinales, que han perdido la inervación de los centros motores superiores. Esta reducción facilitaría una desorganización de los circuitos espinales y contribuiría a la espasticidad y el dolor neuropático, dos fenómenos que aparecen después de lesiones medulares en el contexto de plasticidad maladaptativa. La rehabilitación física, incrementando la actividad de las motoneuronas y, consecuentemente, atenuando la pérdida de las RPN, limitaría la desorganización de los circuitos espinales y, por lo tanto, la plasticidad maladaptativa. Por el contrario, un incremento de las RPN podría dificultar la formación de nuevas conexiones neurales.

Para evaluar el papel de las RPN y la actividad en la modulación de la plasticidad, hemos utilizado un modelo experimental de LM, tanto en ratones salvajes como en ratones transgénicos que presentan unas RPN vestigiales (por falta de la proteína Link1 o Crtl1, un importante componente de estas redes), y hemos valorado cómo el ejercicio físico modula estas RPN después de LM. También hemos valorado si estas RPN limitan la formación de nuevas conexiones entre las motoneuronas denervadas y el trato corticoespinal lesionado. Conocer mejor los efectos de la actividad física sobre las RPN después de una lesión medular permitiría diseñar estrategias que encuentren un equilibrio entre potenciar la estabilización de los circuitos espinales para evitar la

plasticidad maladaptativa, pero, al mismo tiempo, promuevan la regeneración de los tratos lesionados o de los axones remanentes para mejorar la recuperación funcional.

Los objetivos que se han abordado en el proyecto han sido:

1- Evaluar cómo la actividad física modula los cambios plásticos inducidos por la LM, centrándonos en el papel de las RPN de las motoneuronas espinales por debajo de la lesión, relacionando estos cambios con la plasticidad maladaptativa y la recuperación funcional.

2- Evaluar el papel de las RPN espinales en la función motora, utilizando ratones transgénicos que tienen unas RPN vestigiales.

3- Evaluar el papel inhibidor de las RPN en el crecimiento de colaterales desde el tracto corticoespinal descendente hacia las motoneuronas espinales después de LM, centrándonos en el papel de la Sema 3A en esta inhibición.

4- Evaluar el papel de las RPN en la médula cervical, centrándonos en los circuitos respiratorios, y cómo la lesión puede alterar estas RPN y modular la plasticidad de estos circuitos.

2. Resultados

Papel de las RPN y la actividad física en la modulación de los cambios plásticos maladaptativos inducidos por una LM

En un modelo animal, valoramos el impacto de una LM torácica sobre las motoneuronas espinales lumbares (por debajo de la lesión) y observamos que había una reducción de las RPN que las rodean. Asimismo, mediante técnicas electrofisiológicas, se observó un incremento de la hiperreflexia espinal y de la respuesta al dolor de tipo térmico (hiperalgesia térmica). Si los animales con lesión medular eran sometidos a diferentes tipos de actividad física (correr de forma forzada una hora al día en una cinta de correr, vivir en un ambiente enriquecido o tener acceso las 24 h a una rueda de ejercicio), la reducción de las RPN inducida por la lesión se atenuaba o incluso se revertía. Asimismo, la actividad en la rueda las 24 h era mucho

más efectiva que el enriquecimiento o correr puntualmente en la cinta de correr de cara a preservar las RPN y atenuar la hiperreflexia, observando una correlación entre el grado de actividad física en la rueda y el grado de preservación de las RPN. Por el contrario, ambos tipos de ejercicio físico (rueda y cinta de correr) permitían reducir la hiperalgesia térmica que se desarrollaba después de la lesión. Los resultados confirman que la actividad física incrementa las RPN espinales y, de esta forma, favorece la estabilización de los circuitos y limita la plasticidad maladaptativa observada después de LM.

Caracterización de un ratón transgénico con RPN vestigiales para valorar el papel de las RPN espinales en la función motora

Utilizamos un ratón transgénico que presenta unas RPN vestigiales, debido a la carencia de uno de sus componentes, la proteína Link1 o Crtl1 (Crtl1 KO). El objetivo inicial del estudio era comparar los efectos de la LM y la rehabilitación en estos ratones transgénicos, a fin de investigar el papel de las RPN espinales después de una LM. Primero, sin embargo, quisimos caracterizar el modelo en estado basal. Para nuestra sorpresa, observamos que estos ratones presentaban alteraciones motoras sutiles pero muy reveladoras. Los ratones Crtl1 KO tenían unas RPN con alteraciones de sus componentes tanto en la corteza motora como en la médula espinal. Las pruebas de comportamiento y electrofisiológicas revelaron deficiencias motoras, como hipoactividad, la incapacidad de correr en la cinta de correr a la misma velocidad máxima que los ratones de control y alteraciones en la coordinación motora. Además, mostraban hiperexcitabilidad de los reflejos espinales y un reclutamiento de unidades motoras alterado. Estos resultados funcionales fueron acompañados de un aumento de las sinapsis excitadoras en torno a las motoneuronas espinales. Asimismo, había una reducción en el mayor número de motoneuronas, probablemente porque la mayor aportación sináptica excitadora favorece el desarrollo de un perfil de motoneuronas más pequeñas y excitables. Los resultados denotan la importancia de garantizar unos circuitos espinales estables, en su madurez, para una función motora adecuada. La alteración de las RPN espinales favorece un exceso de sinapsis excitadoras e induce una hiperreflexia espinal que se asemeja a la que se observa después de lesiones espinales. De hecho, los ratones transgénicos a nivel basal presentan características que recuerdan a los ratones después de una LM.

Debido a que en el primer objetivo ya mostramos que, después de una ML, hay una desorganización de las RPN por debajo de la lesión, y que su preservación a través de la actividad física ayuda a reducir la hiperexcitabilidad, este estudio reafirma la importancia de preservar las RPN para asegurar una buena función motora, así como la relación que existe entre las RPN, la estabilidad de los circuitos espinales y la plasticidad maladaptativa. Desafortunadamente, las alteraciones basales de estos ratones a nivel motor también son una desventaja para estudiar el impacto de la rehabilitación post-LM en este modelo. Debido a que son hipoactivos y no pueden correr en una cinta de correr a las velocidades máximas que alcanzan los ratones de control, la intensidad de la actividad física que pueden lograr siempre será menor que la de los animales de control, lo que dificulta comparar los efectos de la rehabilitación en estos OMG.

Papel inhibidor de las RPN en el crecimiento de colaterales desde el tracto corticoespinal descendente hacia las motoneuronas espinales después de LM

Los ratones transgénicos con RPN vestigiales también tienen una expresión más baja de Sema3A en estas redes, dado que Sema3A es un componente inhibidor importante. Así, exploramos el papel de estas redes a la hora de limitar la plasticidad del tracto corticoespinal después de una lesión. Tras lesionar el tracto corticoespinal derecho, exploramos la capacidad del tracto contralateral (intacto) de realizar inervación colateral, un fenómeno que se da espontáneamente pero de forma muy limitada después de lesiones parciales, en un intento de compensar la pérdida de la función del otro tracto. Como era de esperar, el hecho de que las motoneuronas espinales tengan unas RPN vestigiales hace la médula espinal más permisiva para que los axones del tracto corticoespinal crezcan colateralmente hacia la zona denervada. Por tanto, podemos concluir que la falta de proteína Crtl1 genera RPN aberrantes, que conllevan unas RPN alteradas, que no pueden garantizar la estabilidad óptima de los circuitos espinales, pero esta desorganización genera un escenario permisivo para el crecimiento de axones contralaterales después de la lesión.

Impacto de una lesión medular en las RPN cervicales implicadas en los circuitos respiratorios

Debido a que las RPN tienen una modulación diferencial dependiendo de la región anatómica donde se encuentren, quisimos explorar cómo se comportaban las RPN que rodean las neuronas que forman los circuitos espinales respiratorios, extremadamente

plásticos y cruciales para una función vital como es la respiración. Estos circuitos, si bien se encuentran en la médula espinal, al igual que los circuitos que controlan la locomoción, son circuitos en los que predomina el componente de regulación interna y muy reflexiva, y podrían tener una regulación diferente en cuanto a la estabilidad y la plasticidad.

De hecho, estos circuitos son muy plásticos después de LM. Para explorar los circuitos, aplicamos un retrotrazador transináptico al diafragma, el principal músculo respiratorio, para poder marcar tanto las motoneuronas que lo inervan (motoneuronas frénicas) como las interneuronas que conforman estos circuitos. Observamos que las motoneuronas frénicas tienen RPN, pero más delgadas que las observadas en las motoneuronas lumbares, mientras que las interneuronas no tienen estas redes, en comparación con interneuronas vecinas (no implicadas en los circuitos respiratorios) que las tienen muy prominentes. Esta falta de RPN en las interneuronas permitiría al circuito ser muy plástico y adaptarse a las necesidades del momento.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

En este proyecto, mediante el uso de modelos animales, se ha profundizado en el estudio de las RPN espinales y su papel estratégico a la hora de mantener un balance adecuado entre estabilidad y plasticidad en el sistema nervioso maduro, así como después de lesiones medulares. Asimismo, también se ha estudiado cómo la actividad física puede modular estas RPN y favorecer la recuperación funcional después de lesiones. La rehabilitación física es una de las terapias más utilizadas en clínica después de lesiones traumáticas de la médula espinal, pero los mecanismos de acción que conducen a sus beneficios probados no están claros.

De hecho, suele asumirse que el ejercicio físico, al promover la plasticidad, ayuda a mejorar la función nerviosa. Sin embargo, en nuestro proyecto demostramos que la actividad física tiene efectos diferentes en el encéfalo y en la médula espinal, ya que modula de forma diferencial las RPN en estas dos regiones anatómicas. En el encéfalo, está ampliamente estudiado que la actividad física, al reducir las RPN en torno a diferentes neuronas, promueve plasticidad. Esto puede explicar gran parte de los efectos positivos de la rehabilitación física en la recuperación funcional después de

lesiones medulares, ya que favorece que los centros superiores sean más plásticos y puedan compensar parcialmente su lesión. En contraste, observamos que la actividad física incrementa las RPN en torno a las motoneuronas espinales, lo que promueve la estabilidad de los circuitos espinales y limita su plasticidad. Esto es muy interesante, ya que la propia lesión medular provoca una reducción de las RPN de estas motoneuronas espinales por debajo de la lesión, debido a la denervación que sufren de los centros superiores (que conlleva una menor activación de estas neuronas). La actividad física, al prevenir o reducir esta pérdida de RPN, evita que los circuitos espinales se hagan más plásticos y, por tanto, previene la plasticidad maladaptativa que se suele observar después de lesiones medulares (espasticidad, dolor neuropático, etc.).

Los resultados son muy relevantes, porque evidencian que, después de una lesión nerviosa, si bien la plasticidad puede ser beneficiosa y favorecer la regeneración de los tratos lesionados o la compensación de las funciones perdidas por el tejido neural remanente, también es fundamental mantener la estabilidad de los circuitos para garantizar su buena funcionalidad. El hecho de que la actividad física module de forma diferencial las RPN en la médula espinal y encéfalo es muy paradigmático y refuerza el uso de la rehabilitación física en lesionados medulares, pero aportando evidencias de que esta actividad no promoverá plasticidad en los circuitos espinales, al contrario, les dará estabilidad. Esto será positivo, porque limitará la plasticidad maladaptativa, pero también puede limitar la regeneración de axones lesionados y, por tanto, interferir en terapias combinadas en las que se busque promover plasticidad y regeneración medular. Entender los mecanismos de acción de las terapias permitirá mejorar su aplicación y los protocolos y tener muy claro los beneficios, pero también sus limitaciones, y combinar de forma más efectiva estrategias terapéuticas.

4. Bibliografía científica generada

Carulli D, Broersen R, De Winter F, Muir EM, Mešković M, De Waal M, De Vries S, Boele HJ, Canto CB, De Zeeuw CI, Verhaagen J. *Cerebellar plasticity and associative memories are controlled by perineuronal nets*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020. 117:6855-6865.

Sánchez-Ventura J, Giménez-Llort L, Penas C, Udina E. *Voluntary wheel running preserves lumbar perineuronal nets, enhances motor functions and prevents hyperreflexia after spinal cord injury*. Exp Neurol. 2021. 336:113533.

Sánchez-Ventura J, Lane M, Udina E. *The role and modulation of spinal perineuronal nets in the healthy and injured spinal cord*. Front Cel Neurosci. (Aceptado para publicación).

Sánchez-Ventura J, Canals C, Hidalgo J, Penas C, Navarro X, Torres-Espín A, Fouad K, Udina E. *The role and modulation of spinal perineuronal nets in the healthy and injured spinal cord*. (En revisión).