

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Modulación del sistema endocannabinoide como
herramienta terapéutica en esclerosis múltiple: efecto sobre
los condroitín sulfato proteoglicanos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Ana Feliú Martínez

DIRECTORA

Carmen Guaza Rodríguez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**MODULACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE: EFECTO SOBRE LOS
CONDROITÍN SULFATO PROTEOGLICANOS**

**Ana Feliú Martínez
Tesis Doctoral
Madrid, 2018**

Directora: Carmen Guaza Rodríguez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

**MODULACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
COMO HERRAMIENTA TERAPÉUTICA EN
ESCLEROSIS MÚLTIPLE: EFECTO SOBRE LOS
CONDROITÍN SULFATO PROTEOGLICANOS**

Memoria presentada por

Ana Feliú Martínez

Para optar al grado de Doctora

Vº Bº de la Directora:

Dra. Carmen Guaza Rodríguez

Instituto Cajal (CSIC)



“Si hay algo en nosotros verdaderamente divino, es la voluntad. Por ella afirmamos la personalidad, templamos el carácter, desafiamos la adversidad y nos superamos diariamente. Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal

A mi familia y amigos

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN/SUMMARY.....	19
I. INTRODUCCIÓN.....	27
1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	29
1.1. Definición, sintomatología y diagnóstico.....	29
1.2. Epidemiología y clasificación.....	30
1.3. Etiología.....	31
1.3.1 Factores genéticos.....	31
1.3.2 Factores ambientales.....	32
2. PATOGENIA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	33
2.1. Fisiopatología.....	33
2.2. Inflamación.....	35
2.3. Neurodegeneración.....	36
2.4. Desmielinización/remielinización.....	37
3. CONDROITÍN SULFATO PROTEOGLICANOS (CSPGs).....	38
3.1. Estructura y función.....	38
3.2. CSPGs y cicatriz glial.....	41
3.3. Estrategias de inhibición de los CSPGs.....	42
3.4. Mecanismos de acción de los CSPGs.....	43
4. MODELOS EXPERIMENTALES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	45
4.1. Modelo de la encefalomielitis autoinmune experimental.....	45
4.2. Modelo viral de la encefalomielitis murina por infección con el virus de Theiler.....	46
5. TRATAMIENTO Y NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....	48
6. SISTEMA CANNABINOIDE.....	51
6.1. Sistema cannabinoide y funcionalidad.....	51
6.2. Receptores cannabinoides.....	52
6.3. Endocannabinoides, enzimas de síntesis y degradación.....	54

6.4.	Propiedades terapéuticas de los cannabinoides.....	56
6.5.	Cannabinoides y EM.....	57
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
III.	MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	65
1.	MATERIAL.....	67
1.1.	REACTIVOS.....	67
1.1.1.	Cultivos celulares.....	67
1.1.2.	Procesamiento de tejido.....	67
1.1.3.	Inmunocitoquímica, inmunohistoquímica y otras tinciones.....	67
1.1.4.	Inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western-blot).....	68
1.1.5.	Extracción de ARN, transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa.....	70
1.2.	COMPUESTOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO DE MODELO ANIMALES DE EM.....	71
1.3.	DROGAS Y TRATAMIENTOS.....	71
1.3.1.	Para los estudios in vitro.....	71
1.3.1.1.	Citoquinas.....	71
1.3.1.2.	Cannabinoides, inhibidores de la MAGL y antagonistas de receptores cannabinoides.....	71
1.3.1.3.	Inhibidores de rutas de señalización.....	72
1.3.2.	Para los estudios in vivo.....	72
1.3.2.1.	Cannabinoides, inhibidores de la MAGL y antagonistas de receptores cannabinoides.....	72
1.3.2.2.	Inhibidores de la ruta de síntesis CSPGs.....	72
1.3.2.3.	Otros.....	72
1.4.	KIT DE INFUSIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR Y BOMBAS MINIOSMÓTICAS... ..	73
1.5.	TRAZADOR ANTERÓGRADO DE ALTA RESOLUCIÓN BDA.....	73
1.6.	OLIGONUCLEÓTOS.....	74
1.7.	MARCADORES (ANTICUERPOS Y OTROS).....	75
1.8.	ENZIMOINMUNOENSAYO EN FASE SOLIDA (ELISA).....	76

1.9.	EQUIPOS.....	77
2.	MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	78
2.1.	ANIMALES.....	78
2.2.	MODELOS ANIMALES DE EM.....	78
2.2.1.	Modelo de encefalomiелitis murina desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD).....	78
2.2.1.1.	Diseño experimental.....	79
2.2.1.2.	Evaluación de la función motora (caja de actividad).....	80
2.2.2.	Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).....	81
2.2.2.1.	Diseño experimental.....	81
2.2.2.2.	Evaluación de la función motora (puntuación clínica).....	82
2.3.	CIRUGÍA E IMPLANTACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE CATÉTERES Y MINIBOMBAS OSMÓTICAS PARA LA LIBERACIÓN DE 2-AG.....	83
2.4.	TRAZADOR ANTERÓGRADO BDA.....	84
2.5.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	84
2.5.1.	Procesamiento del tejido.....	84
2.5.2.	Inmunohistoquímica.....	85
2.5.2.1.	Marcaje con inmunofluorescencia.....	85
2.5.2.2.	Marcaje con diaminobenzidina (DAB).....	85
2.5.2.3.	Hematoxilina/eosina.....	86
2.5.2.4.	Evaluación de la infiltración celular.....	86
2.5.2.5.	Marcaje Luxol Fast Blue (LFB).....	87
2.6.	MICROSCOPÍA.....	88
2.6.1.	Microscopía óptica y análisis de imagen.....	88
2.6.2.	Microscopía confocal y análisis de imagen.....	88
2.6.3.	Microscopía electrónica.....	88
2.6.3.1.	Procesamiento del tejido.....	88
2.6.3.2.	Análisis semicuantitativo de axones mediante TEM.....	89
2.7.	TÉCNICA DE INMUNODETECCION POR SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS (WESTERN-BLOT).....	89
2.8.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	91
2.8.1.	Extracción de ARN.....	91

2.8.2.	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	91
2.9.	CULTIVOS CELULARES.....	91
2.9.1.	Cultivo primario mixto.....	92
2.9.2.	Cultivo primario de astrocitos a partir del cultivo mixto.....	92
2.10.	ENZIMOINMUNOENSAYO EN FASE SOLIDA (ELISA).....	93
2.11.	CUANTIFICACIÓN DE 2-AG EN TEJIDO (HPLC UNIDO A ESPECTROSCOPÍA DE MASAS LC-MS).....	93
2.12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
IV.	RESULTADOS.....	97
1.	FISIOPATOLOGÍA Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CSPGs EN LA FASE CRÓNICA DEL MODELO DE TMEV-IDD.....	99
1.1.	Fisiopatología de la encefalomiелitis murina por infección con el virus de Theiler.....	99
1.2.	Análisis de la expresión de CSPGs en médula espinal en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD.....	100
2.	ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE CSPGs EN LA FASE CRÓNICA DEL MODELO DE TMEV-IDD.....	107
2.1.	Inhibición farmacológica de la expresión de CSPGs por xilósido en el modelo de TMEV-IDD.....	107
2.2.	Inhibición farmacológica de la expresión de CSPGs por fluorosamina en el modelo de TMEV-IDD.....	110
3.	POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL ENDOCANNABINOIDE 2-AG Y SU EFECTO SOBRE LOS CSPGs EN MODELOS MURINOS DE EM.....	115
3.1.	Potencial terapéutico del UCM03025, inhibidor de la enzima MAGL, en el modelo de EAE.....	115
3.2.	Potencial terapéutico del UCM03025 y del endocannabinoide 2-AG en el modelo del virus de Theiler. Efecto sobre los CSPGs.....	121
4.	MODULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS CSPGs POR 2-AG E INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA MAGL EN ASTROCITOS EN CULTIVO.....	139
4.1.	Efecto del 2-AG en la expresión de CSPGs en astrocitos en cultivo. Implicación del receptor CB2.....	139

4.2.	Efecto de los inhibidores de la MAGL en la expresión de CSPGs en astrocitos en cultivo.....	143
4.3.	Efecto del 2-AG e inhibidores de su hidrólisis en la liberación del proteoglicano Neurocán al sobrenadante en astrocitos en cultivo.....	144
4.4.	Efecto del 2-AG sobre las vías de señalización implicadas en la síntesis deCSPGs.....	145
V.	DISCUSIÓN.....	151
1.	EXPRESIÓN DE LOS CSPGs Y SU INHIBICIÓN EN EL MODELO DE TMEV-IDD.....	155
2.	EFICACIA TERAPÉUTICA DEL INHIBIDOR DE LA MAGL EN DOS MODELOS DE EM.....	159
3.	EFEECTO DEL 2-AG EN LA SÍNTESIS DE CSPGs POR ASTROCITOS EN CULTIVO.....	165
VI.	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	173
VII.	REFERENCIAS.....	179
VIII.	ANEXOS	215
1.	<i>Curriculum vitae</i> del doctorando	
2.	Artículo original UCM03025 y EAE	
3.	Artículo original UCM03025 y TMEV-IDD	

ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
ABHD	α/β hidrolasa
AC	Adenilato ciclasa
ACEA	Araquidonil-2-cloroetilamida
ADAMTs	Desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Anandamida; Araquidonoiletanolamida
AG	Acetato de glatirámero
Akt	Proteína quinasa B
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
AP	Coordenada anteroposterior
AraC	Citosina-D-arabinofuranósido
Arg-1	Arginasa-1
ARN	Ácido ribonucleico
BDA	Del inglés Biotinilated Dextran Amine
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
CBD	Cannabidiol
CFA	Adyuvante completo de Freund
ChABC	Chondroitinasa ABC de <i>Proteus vulgaris</i>
COX	Ciclooxigenasa
CS	Condrotín sulfato
CSPGs	Condrotín sulfato proteoglicanos
CV	Coefficiente de variabilidad
DA	Cepa Daniel del virus TMEV

DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DEM	Desviación estándar de la media
DMEM	Del inglés Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNasa	Desoxirribonucleasa
dpl	Días postinmunización
dpi	Días postinfección
DTT	Ditiotreitol
DV	Coordenada dorso-ventral
EAE	Encefalitis autoinmune experimental
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF-R	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELISA	Enzimoimmunoensayo en fase sólida
EM	Esclerosis múltiple
EM-PP	Esclerosis múltiple primaria progresiva
EM-RR	Esclerosis múltiple remitente recidivante
EM-SP	Esclerosis múltiple secundaria progresiva
ERK	Kinasa regulada por señales extracelulares
FAAH	Hidrolasa de amidas y ácidos grasos
FBS	Suero fetal bovino
FCS	Suero fetal de ternera
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
GAGs	Cadenas de glicosaminoglicanos
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GlcUA	Ácido D glucurónico
GPR55	Receptor 55 acoplado a proteína G

GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
H/E	Hematoxilina/Eosina
HACTV	Actividad horizontal
HERVs	Retrovirus endógenos humanos
HHV-6	Virus del herpes humano-6
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HS	Suero de caballo
HSPGs	Heparán sulfato proteoglicanos
IFN	Interferón
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleuquina
I.P.	Intraperitoneal
NOS-II	Sintasa de óxido nítrico inducible
LAR	Del inglés leukocyte common antigen-related phosphatase
LC-MS	Cromatografía líquida con espectroscopía de masas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LFB	Del inglés Luxol Fast Blue
LINGO-1	Del inglés Leucine rich repeat and Immunoglobulin-like domain-containing protein 1
LPS	Lipopolisacárido
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
MBP	Proteína básica de mielina
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
ML	Coordenada medio-lateral
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MOG	Glicoproteína de los oligodendrocitos de mielina
MRI	Imagen de resonancia magnética
mTOR	Del inglés mammalian target of rapamycin
NAPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamida

NArPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa
NFκB	Factor nuclear de transcripción kappa B
NG2	Antígeno glial/neural tipo 2
NGF	Factor de crecimiento nervioso
Nogo-A	Proteína asociada a la mielina con efecto inhibitorio
Nrf2	Factor de transcripción nuclear eritroide-2
O2A	Oligodendrocito-astrocito tipo 2
Olig-2	Factor de transcripción de oligodendrocitos tipo 2
OPCs	Células progenitoras de oligodendrocitos
P/S	Penicilina/estreptomicina
PBS	Tampón fosfato salino
PBT	Tampón fosfato con tritón X-100 0,1%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEA	Palmitoiletanolamida
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinasa
PKA	Proteína kinasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PNNs	Redes perineuronales
PPAR	Receptor nuclear activado por proliferadores de peroxi somas
PSA-NCAM	Del inglés Polysialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule
Rho	GTPasa
ROCK	Proteína quinasa asociada a Rho
RPTP	Receptor de proteínas tirosina fosfatasas
RT	Retrotranscripción
RXR	Receptor X retinoico
SDS	Dodecil sulfato sódico

SEM	Error estándar de la media
Sema	Semaforina
SNC	Sistema nervioso central
SVZ	Zona subventricular
TBS	Tampón Tris Salino
TBST	Tampón Tris Salino con Tween-20 0,1%
TGF	Factor de crecimiento transformante
THC	Tetrahidrocannabinol
TMEV-IDD	Del inglés Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
Transportadores AMT	Transportador de anandamida
TRP	Receptores activados por potenciales transitorios
ufp	Unidades formadoras de placa
VACTV	Actividad vertical
VEB	Virus Epstein-Barr
VLA-4	Integrina $\alpha 4\beta 1$
Xt	Xilosiltransferasa

RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante y neurodegenerativa que afecta al sistema nervioso central (SNC) y que evoluciona de manera crónica hacia un declive neurológico progresivo desembocando en incapacidad permanente. A nivel histopatológico, la EM se caracteriza por presentar áreas multifocales de inflamación, desmielinización y daño axonal en la sustancia blanca del SNC que da lugar a la formación de lesiones donde se observan cicatrices glióticas crónicas con proliferación astrocítica.

En la EM junto con los procesos de desmielinización, tienen lugar procesos de reparación y remielinización, sin embargo, conforme la enfermedad progresa la remielinización resulta menos eficiente, cronificándose los déficits neurológicos con el desarrollo de la patología. Este fallo en la remielinización no parece ser debido a una ausencia de precursores de oligodendrocitos (OPCs) en la zona de lesión, sino más bien a problemas en su diferenciación. Se ha apuntado a la presencia de factores inhibitorios en las zonas desmielinizadas como los responsables de impedir la diferenciación de los OPCs entre los que se encuentran las proteínas denominadas condroitín sulfato proteoglicanos (CSPGs). Los CSPGs son unas macromoléculas que forman parte de la matriz extracelular (ECM) y la cicatriz glial y son consideradas factores determinantes del fallo en la remielinización y la regeneración axonal generando un ambiente no permisivo que limita la diferenciación de los OPCs y la supervivencia neuronal.

El modelo del virus de Theiler resulta especialmente adecuado para analizar aspectos de la formación de la cicatriz glial en lesiones inflamatorias y desmielinizantes y en la remielinización. El proceso de desmielinización durante la fase crónica del modelo de TMEV se ve acompañado por alteraciones en la ECM, como la acumulación de CSPGs y astrogliosis reactiva. Además, la limitada remielinización observada en el modelo se ha asociado a una insuficiente diferenciación de OPCs. Los cannabinoides han demostrado aliviar algunos aspectos de la sintomatología de la EM. Mientras que en modelos de EM los cannabinoides presentan propiedades antioxidantes, antiexcitotóxicas y neuroprotectoras y mejoran la remielinización, promoviendo la diferenciación de los OPCs, poco se sabe sobre sus efectos sobre las proteínas de matriz extracelular y en particular sobre los CSPGs.

El **objetivo global** de esta Tesis Doctoral es investigar la implicación de los CSPGs en el fallo de remielinización que tiene lugar en las fases crónicas del modelo de TMEV-IDD, así como el papel del endocannabinoide 2-AG en su regulación y modulación para promover los mecanismos de reparación y consecuente remielinización.

Los **objetivos específicos** incluyen:

- i) Análisis de la expresión de los CSPGs en la fase crónica del modelo de TMEV.
- ii) Estudio de la influencia de los CSPGs en los déficits neurológicos en el modelo de TMEV-IDD, haciendo uso de herramientas farmacológicas que impiden la acumulación de dichas macromoléculas.
- iii) Análisis del potencial terapéutico del inhibidor reversible de la enzima MAGL, UCM03025 y del propio 2-AG en los modelos de EAE y TMEV-IDD, estudiando su capacidad para modular la respuesta inflamatoria y la acumulación de CSPGs.
- iv) Puesto que los astrocitos son los principales productores de los CSPGs, se investigará la síntesis y liberación de los CSPGs, en cultivos de astrocitos, así como la modulación por 2-AG y por inhibidores de la MAGL estableciendo los receptores y las vías de señalización implicadas.

La **metodología** utilizada para el estudio de la implicación de los CSPGs en el modelo viral de EM, incluye: ratones infectados con TMEV tratados con compuestos que inhiben la síntesis de los CSPGs, así como con 2-AG y/o un inhibidor de la MAGL para analizar la progresión de la patología. Se utilizaron tests de función motora; el uso de diversos marcadores de células gliales, daño axonal, mielina y CSPGs mediante técnicas histológicas analizadas por microscopía óptica, confocal y electrónica; se realizaron estudios bioquímicos y de biología molecular utilizando técnicas de PCRs y western-blot, así como el uso de minibombas osmóticas para la liberación continua de 2-AG y trazadores axonales. La eficacia terapéutica del inhibidor de la MAGL también se evaluó en el modelo de EAE. Por último, para el estudio de la síntesis de CSPGs por 2-AG e inhibidores de la MAGL, se utilizaron cultivos de astrocitos identificándose las vías de señalización y receptores implicados.

Los **resultados** obtenidos indican que:

- i) En la fase crónica del modelo de TMEV-IDD existe astrogliosis reactiva y acumulación de CSPGs asociada a lesiones desmielinizadas en la médula espinal.
- ii) El tratamiento con dos inhibidores de la síntesis de CSPGs reduce la expresión de CSPGs y mejoran los déficits motores asociados a la patología.
- iii) El inhibidor reversible de la MAGL, UCM03025 mejora la sintomatología asociada a los modelos de EAE y TMEV-IDD. En el modelo de TMEV, el UCM03025 reduce la acumulación de CSPGs y la inflamación aumentando el número de oligodendrocitos proliferativos, así como el número de oligodendrocitos maduros, detectándose una menor pérdida axonal y una mejora en la remielinización.
- iv) Los astrocitos estimulados con TGF- β 1 incrementan los niveles de CSPGs, los cuales disminuyen en aquellos astrocitos tratados con 2-AG y con inhibidores de la MAGL. La disminución del Neurocán por 2-AG está mediado a través del receptor CB2 y las vías implicadas incluyen la ruta de TGF- β /SMAD, así como la vía de PI3K-Akt-mTOR.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral nos permiten **concluir** que:

- i) La mejora en la sintomatología en los animales infectados con TMEV tras la administración de inhibidores de la síntesis de CSPGs, evidencia la relevancia de esas moléculas inhibitorias en el desarrollo de la patología.
- ii) Los efectos terapéuticos ejercidos por el UCM03025 tanto en el modelo de EAE como en el modelo de TMEV-IDD muestran la importancia de aumentar el tono endocannabinoide del 2-AG como mecanismo para disminuir la inflamación y promover los mecanismos endógenos de reparación, reduciendo la astrogliosis y los niveles de CSPGs conduciendo todo ello a un menor daño axonal y a una mayor remielinización.
- iii) El mecanismo mediante el cual el 2-AG podría estar mediando sus efectos beneficiosos *in vivo* incluiría su acción sobre la producción de los CSPGs por parte de los astrocitos ya que se ha observado que la producción de estas macromoléculas por astrocitos *in vitro* se ve disminuida con 2-AG. Las vías de TGF- β /SMAD y PI3K-Akt-mTOR, así como el receptor CB2 parecen estar implicadas en estos efectos.

Conjuntamente estos resultados resaltan el interés de incrementar el tono endocannabinoide de 2-AG con el fin de modular las respuestas inflamatorias, así como para promover los mecanismos endógenos de reparación. Postulamos que el 2-AG podría favorecer dichos procesos reduciendo la acumulación de los CSPGs en las zonas desmielinizadas permitiendo a su vez una mayor diferenciación oligodendroglial y promoviendo así la remielinización y la regeneración axonal.

SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating and neurodegenerative disease that affects the central nervous system (CNS) and leads to a neurological decline and permanent disability. The pathologic hallmarks in MS include multifocal areas of inflammation, demyelination and axonal damage in the brain and spinal cord white matter that are also present in the gray matter at cortical levels and leads to the formation of lesions where gliotic scars with astrocytic proliferation are observed.

In MS, repair and remyelination processes occur spontaneously following demyelinating phases, but, as the disease progresses, remyelination becomes less efficient leading to increased disability in patients. The failure in remyelination does not seem to be due to an insufficient number of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) in the lesion site but a failure in their differentiation. There are different inhibitory molecules present in demyelinated areas that impede OPCs differentiation, among these, we can find the chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs). CSPGs are extracellular matrix proteins (ECM) that have been reported to accumulate in MS lesions and are considered important factors for the failure of remyelination and regeneration through the creation of a non-permissive environment that limits attachment, survival and differentiation of OPCs as well as neuron survival.

Theiler's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease (TMEV-IDD) is an experimental viral model of MS suitable to elucidate the role of glial scar formation in chronic inflammatory and demyelinating CNS lesions. The limited remyelination observed in TMEV-IDD has been associated to insufficient oligodendroglial differentiation. Moreover, the chronic demyelination is accompanied by astrogliosis and alterations in spinal cord ECM and accumulation of CSPGs which in turn may contribute to the failure of axon remyelination and regeneration. Cannabinoids are currently being studied for their potential benefits in the treatment of MS and other neuroinflammatory/neurodegenerative diseases. Although preclinical studies have demonstrated that cannabinoids can alleviate MS-associated symptoms like spasticity and exhibit anti-inflammatory, antioxidant, anti-excitotoxic properties and promote remyelination and differentiation of OPCs there is no evidence about their role over extracellular matrix proteins and CSPGs.

The **main objective** of this Doctoral Thesis is to evaluate the role of CSPGs in the remyelinating failure at the chronic phases of TMEV-IDD and the role of cannabinoids in its modulation to promote remyelination and repair mechanisms.

The **specific objectives** include:

- i) Analysis of CSPGs expression at the chronic phase of TMEV-IDD.
- ii) To study the role of CSPGs in the severity of TMEV-IDD motor dysfunction by inhibiting CSPGs synthesis and accumulation through pharmacological tools.
- iii) To study the therapeutic effect of a reversible inhibitor of MAGL, called UCM03025 and 2-AG itself in the EAE and TMEV-IDD models studying its ability to modulate the inflammatory response and CSPGs accumulation.
- iv) As the main source of CSPGs are astrocytes, we will analyze CSPGs synthesis and release by astrocyte cultures treated with 2-AG and inhibitors of MAGL, elucidating the receptors and signaling pathways involved.

The **methods** required to study the role of CSPGs in TMEV-IDD disease progression include TMEV infected mice treated with compounds that inhibit CSPGs synthesis, 2-AG and inhibitors of MAGL. Behavioral tests were carried out as well as immunohistochemistry techniques to analyze glial cells, axonal damage, myelin and CSPGs using optic, confocal and electron microscopy. Molecular biology and biochemistry techniques such as PCRs and western-blot were used as well as the implantation of osmotic pumps and axonal tracers. The therapeutic efficacy of MAGL inhibitor was also evaluated in the EAE model. Finally, astrocyte cultures were used to analyze CSPGs synthesis and its modulation by 2-AG and different MAGL inhibitors.

The **results** obtained in this study indicate that:

- i) There is prominent astrogliosis and CSPGs accumulation associated to demyelinated areas at the chronic phase of TMEV-IDD.
- ii) Treatment with two different CSPGs synthesis inhibitors reduce the expression of CSPGs and ameliorate motor deficits in TMEV model.
- iii) The reversible MAGL inhibitor, UCM03025, improves symptomatology in the EAE and TMEV models. UCM03025 reduces the expression of CSPGs, the inflammatory respon-

se and increases the number of proliferating oligodendrocytes as well as mature oligodendrocytes, leading to less axonal damage and remyelination in the TMEV-IDD model.

iv) TGF- β 1 treated astrocytes increase the expression of CSPGs which are reduced following 2-AG and MAGL inhibitors treatments. The diminished Neurocan by 2-AG depends on CB2 receptor. The TGF- β /SMAD and PI3K-Akt-mTOR signalling pathways may be involved in the effects described above.

The **results** obtained in this Thesis allow us to conclude that:

i) The symptomatology amelioration in the TMEV-IDD model by the treatment with inhibitors of CSPGs synthesis indicates the relevance of these molecules in this disease progression.

ii) The therapeutic effect exerted by UCM03025 in the EAE and TMEV-IDD models of MS, highlight the relevance of increasing the endocannabinoid tone of 2-AG as a tool to reduce inflammation and to promote repair mechanisms through the inhibition of astrogliosis and CSPGs accumulation, leading to less axonal damage and remyelination.

iii) The mechanisms by which 2-AG could mediate its beneficial effects *in vivo* would include their ability to reduce the synthesis of CSPGs by astrocytes as we have confirmed *in vitro*. TGF- β /SMAD and PI3K-Akt-mTOR signalling pathways as well as CB2 receptor may be involved in this effect.

Collectively, these findings highlight the importance of increasing the endocannabinoid tone of 2-AG, in order to modulate the inflammatory response and to promote the endogenous repair mechanisms. 2-AG could be involved in the above process by reducing CSPGs accumulation in demyelinating areas allowing oligodendrocytes to differentiate leading to greater remyelination and axonal regeneration.

I. INTRODUCCIÓN

1. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1.1 DEFINICIÓN, SÍNTOMATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria, desmielinizante y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC) que afecta a casi 2,5 millones de personas en todo el mundo, siendo la mayor causa de discapacidad no traumática en adultos jóvenes. Los patólogos a los que se les atribuye las primeras menciones a la EM fueron Robert Carswell en 1838 (Carswell, R. 1838) y a Jean Cruveilhier en el año 1841 (Cruveilhier, J. 1841). Sería el neurólogo Jean-Martin Charcot quien en la segunda mitad del siglo XIX describió y definió la llamada “tríada de síntomas de Charcot” constituida por nistagmo, disartria y ataxia, correlacionando además los síntomas de la enfermedad con hallazgos histopatológicos, definiéndola como la enfermedad de esclerosis en placas diseminadas (Charcot, JM 1868).

Los primeros síntomas de la EM aparecen como consecuencia de brotes desmielinizantes aislados que provocan déficits neurológicos del sistema afectado, entre los que se incluyen trastornos sensitivos, pérdida de visión, alteraciones motoras con afectación cortical, del tronco cerebral, cerebelo y vías cerebelosas. Además, en los estadios más avanzados puede encontrarse afectación medular que provoca debilidad motora, pérdida del equilibrio y coordinación, temblor, ataxia y parálisis. Aparte de los síntomas físicos discapacitantes, también se ha descrito una afectación tanto de la función cognitiva como de la labilidad emocional (Compston y Coles 2008).

En el diagnóstico de la EM se utilizan diferentes técnicas de imagen, analíticas y electrofisiológicas que incluyen la resonancia magnética para detectar las lesiones y determinar su distribución en espacio y tiempo (Charil, Yousry et al. 2006) y el examen en líquido cefalorraquídeo para detectar procesos inflamatorios y realizar un análisis de bandas oligoclonales (Freedman, Thompson et al. 2005, Villar, Sadaba et al. 2005). Así mismo, se utilizan los potenciales evocados para valorar la función de algunas vías nerviosas y la tomografía de coherencia óptica para medir el grosor y posible pérdida axonal de la capa de las fibras nerviosas de la retina (Sergott, Frohman et al. 2007).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN

Los estudios de prevalencia de la EM han permitido observar, como muestra la Figura 1, una distribución irregular de esta enfermedad en todo el mundo detectándose mayores frecuencias entre los 40^o y 60^o de latitud Norte, fenómeno similar en el hemisferio sur coincidiendo con zonas de baja radiación solar y déficit de vitamina D. En España la prevalencia oscila entre los 100-125 casos por cada 100.000 habitantes (Kingwell, Marriott et al. 2013, Kurtzke 1980, Otero-Romero, Ramio-Torrenta et al. 2015).

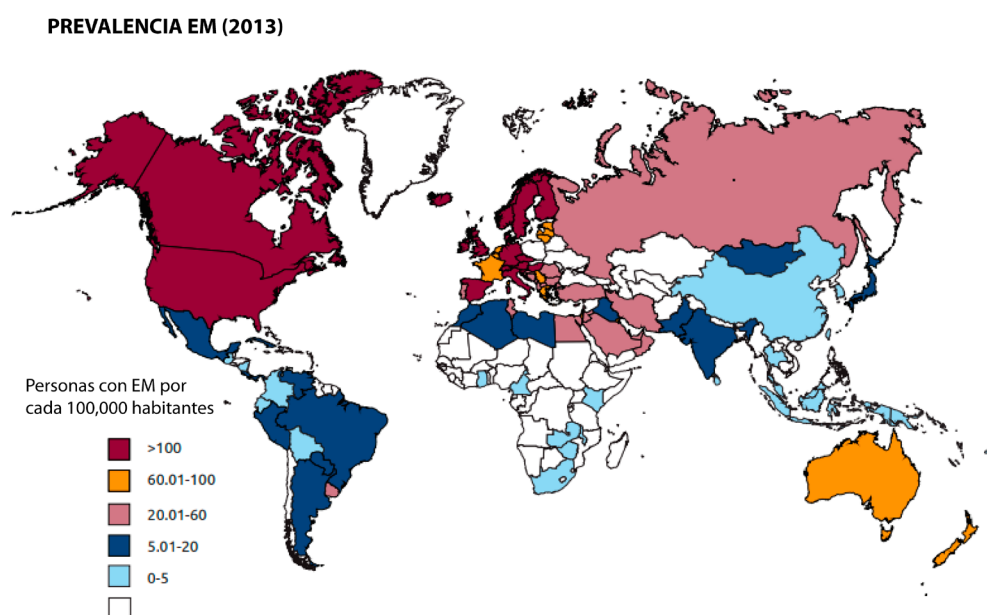


Figura 1. Prevalencia de la EM en el mundo (2013). Modificado de la página web de la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple: <http://www.msif.org/about-us/advocacy/atlas/>.

El curso clínico de la enfermedad es variable y debuta normalmente entre los 20 y los 40 años de edad, con episodios de brotes reversibles de déficits neurológicos que acaban evolucionando con el tiempo hacia un declive neurológico progresivo e irreversible. También se han observado casos de EM en niños (EM pediátrica), así como primeros brotes en personas mayores de 60 años. Además, afecta a las mujeres en triple proporción que a los hombres.

Teniendo en cuenta el modo de inicio de los síntomas clínicos y curso de la enfermedad, la EM se puede clasificar de diferentes formas; en primer lugar, el llamado síndrome neurológico aislado, el cual se identifica como la primera manifestación clínica de la enfermedad que muestra características de desmielinización inflamatoria que podría ser o no EM, pero que todavía no cumple los requisitos de dispersión en el tiempo para diagnosticarla como tal. Como mues-

tra la Figura 2, cuando estos pacientes tienen otro brote de disfunción neurológica pasarían a la siguiente clasificación de EM en forma de brotes y remisiones, remitente recidivante (EM-RR), que cursa con episodios de déficit neurológico seguidos de una recuperación completa o parcial (85 % de los casos), esta fase puede durar años o décadas. Por último, encontraríamos las EM progresivas, la primaria progresiva (EM-PP) que afecta al 10-15% de los pacientes y que incluye a aquellos que cursan desde el inicio con un empeoramiento progresivo de función neurológica, y aquellos que comienzan con brotes y derivan en la secundaria progresiva (EM-SP). Todas las formas se subdividen a su vez en activas o no activas, dependiendo de la existencia de brotes de disfunción neurológica o lesiones identificadas por resonancia (Lublin, Reingold et al. 2014).

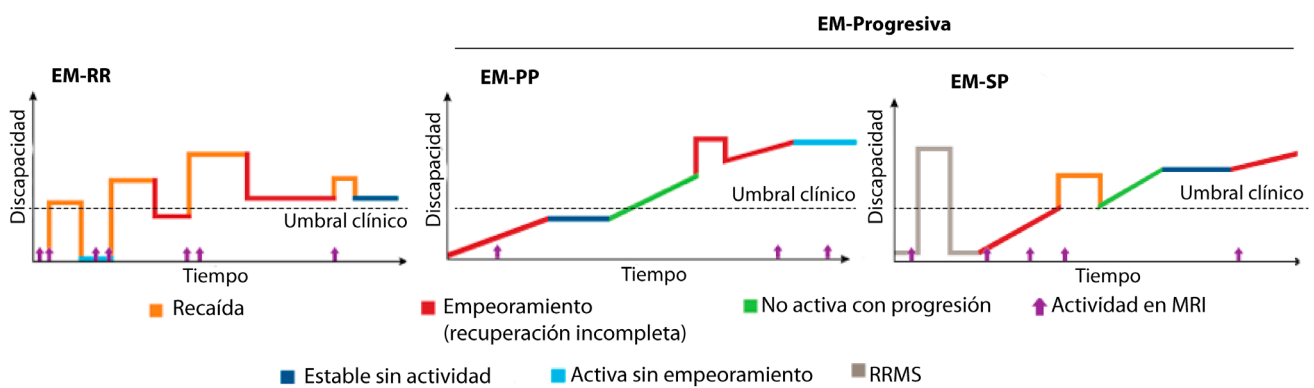


Figura 2. Evolución del deterioro neurológico en EM en función del tiempo y clasificación de los diferentes subtipos de la enfermedad. RR: Remitente-recurrente; SP: Secundaria-progresiva; PP: Primaria-progresiva. Fuente: Lublin et al. 2014.

1.3 ETIOLOGÍA

La EM es una enfermedad heterogénea y compleja de etiología aún desconocida que se desencadena como consecuencia de la confluencia de factores de predisposición genética y desencadenantes ambientales que aumentan la susceptibilidad a padecerla.

1.3.1 Factores genéticos

La existencia de factores genéticos de susceptibilidad se ve apoyada por datos que indican que, aunque el riesgo a padecer la EM en la población en general es del 0,1-0,2%, este porcentaje aumenta hasta un 3-5% en caso de tener familiares de primer grado afectados y hasta un 30% en aquellos hijos de ambos progenitores afectados. Además la concordancia entre gemelos monocigotos es del 30% frente al 3-5% en gemelos dicigotos (Dyment, Ebers et al. 2004

Sadovnick, Armstrong et al. 1993).

El gen que posee una mayor asociación hasta ahora con la EM es el alelo *HLA-DRB1* del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), localizado en el cromosoma 6p21. Este es el locus que explica entre el 16-60% de la susceptibilidad genética a padecer EM (Hafler, Compston et al. 2007, Sawcer, Hellenthal et al. 2011). Esa región del genoma ha sido ampliamente estudiada debido a su asociación con diferentes enfermedades autoinmunes, infecciosas e inflamatorias y aunque la asociación con este gen refuerza la etiología inmune, afectando a la presentación de antígeno, el mecanismo por el cual el *HLA-DRB1* contribuye a la susceptibilidad genética es aún desconocido. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) también han mostrado polimorfismos genéticos relacionados con el sistema inmune (Hollenbach and Oksenberg 2015, Sawcer, Franklin et al. 2014) entre los que destacan la cadena alfa del receptor de la IL-7 (Lundstrom, Highfill et al. 2013), la cadena alfa del receptor de la IL-2 (Dendrou, Plagnol et al. 2009, Hartmann, Khademi et al. 2014), la señalización por NFκB o el receptor de TNF1 (Gregory, Dendrou et al. 2012).

1.3.2 Factores ambientales

Muchos estudios apoyan también el papel del medio ambiente en la susceptibilidad a padecer EM. Se ha observado que esta susceptibilidad presenta una asociación geográfica y que la migración en la niñez o adolescencia hacia áreas de alta prevalencia influye en la probabilidad de desarrollo de la EM (Fernández y Rodríguez-Antigüedad, 2010). Según evidencias epidemiológicas, algunos factores que se han relacionado con un aumento en la susceptibilidad a padecerla serían el consumo de tabaco (Hernan, Jick et al. 2005, Poorolajal, Bahrami et al. 2017, Wingerchuk 2012,), los niveles de vitamina D (Thouvenot, Orsini et al. 2015), así como diversos agentes infecciosos. Aunque hasta el momento no existen evidencias definitivas que relacionen de forma inequívoca la infección por virus con la patogenia de la EM, los resultados acumulados parecen apoyar la implicación de uno o más de estos agentes infecciosos en la EM. Entre estos se encuentran infecciones virales por virus de la familia Herpesviridae, el virus de Epstein-Barr (EBV) y el herpesvirus humano 6 (HHV-6), así como por los retrovirus endógenos humanos (HERVs). Así, el riesgo de padecer EM es unas 10 veces mayor entre los individuos que experimentan una infección no diagnosticada por el virus de Epstein-Barr en la

infancia temprana y de 20 veces entre las personas que desarrollan mononucleosis infecciosa más tardíamente (Belbasis, Bellou et al. 2015, Libbey and Fujinami 2010). Por último, en los últimos años se ha asociado también el papel de la microbiota comensal en la contribución de la patogénesis de la EM mediante su interacción directa con el sistema inmune (Banati, Csecei et al. 2013, Calvo-Barreiro, Eixarch et al. 2017, Ochoa-Reparaz, Mielcarz et al. 2011).

Debido a que en la actualidad se considera que la EM es una enfermedad de naturaleza autoinmune, probablemente debida a una respuesta normal a un antígeno inadecuado o bien a una exposición antigénica inapropiada, se han propuesto tres teorías mediante las cuales un patógeno podría desencadenar una patología autoinmune: i) la teoría de los superantígenos virales, en la que se produciría la activación no específica de células T autorreactivas por moléculas inmunoestimuladoras producidas por el virus; ii) la teoría de la expansión de epítomos provocada por la activación de las células T autorreactivas frente a antígenos propios de mielina como consecuencia de una destrucción tisular mediada la respuesta inmune frente al agente infeccioso; y iii) la teoría del mimetismo molecular que implicaría la activación de las células T autorreactivas por epítomos del agente infeccioso que presentan cierta homología en su secuencia o en su estructura con epítomos de mielina (Chastain and Miller, 2012, Vanderlugt and Miller 2002, Von Herrath and Harrison 2003).

2. PATOGENIA

2.1 FISIOPATOLOGÍA

La EM se caracteriza a nivel histopatológico por presentar áreas multifocales de inflamación y desmielinización en la sustancia blanca, tanto a nivel de cerebro como de médula espinal (Frohman, Racke et al. 2006), donde se observan cicatrices glióticas crónicas con proliferación astrocítica (Compston y Coles 2008). Dichas lesiones se componen principalmente de infiltrados inflamatorios perivasculares del tipo macrófagos y linfocitos T, así como de células inmunes residentes del SNC como es la microglía. Además, junto con la desmielinización y el daño axonal se observa alteración y permeabilización de la barrera hematoencefálica (BHE) (Compston y Coles 2008).

Tal y como muestra la Figura 3, las placas desmielinizantes se clasifican en 4 tipos: i) placas

agudas, ii) placas crónicas activas, iii) placas crónicas inactivas y iv) placas fantasma. En la placa aguda se detectan infiltrados inflamatorios perivasculares, moderada desmielinización y daño axonal; estas placas son difíciles de observar ya que aparecen en las etapas iniciales de la enfermedad. Las placas crónicas activas muestran desmielinización activa en el borde de la placa junto a microglía reactiva; la mielina aparece alterada o siendo fagocitada por macrófagos, y se observa también una importante pérdida axonal. En este tipo de placa no se observan infiltrados inflamatorios perivasculares. La placa crónica inactiva es más extensa, con desmielinización completa, densidad de axones escasa y reducción en el número de oligodendrocitos. El borde de la placa está muy bien delimitado y no se observa desmielinización activa en él. Este tipo de placa está ocupada, en su mayor parte, por astrocitos, por lo que se denomina también placa gliótica. Por último, existe un porcentaje de las placas en fase crónica llamadas placa fantasma o “en sombra” que han conseguido remielinizar detectándose en ellas axones con finas vainas de mielina, ausencia de infiltrados inflamatorios perivasculares, desmielinización activa en el borde o gliosis (Frischer, Weigand et al. 2015, Lucchinetti, Bruck et al. 2000).

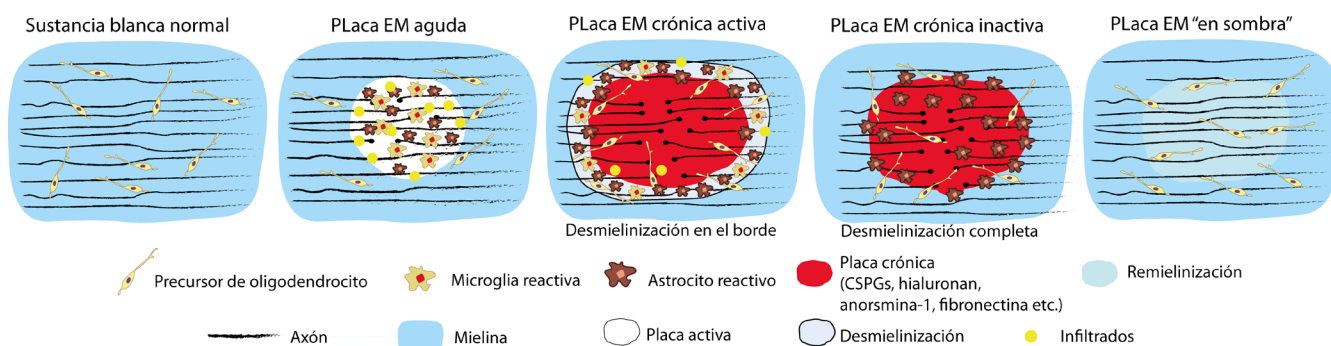


Figura 3. Clasificación de los tipos de placas en EM. Modificado de Clemente et al., 2013.

Se ha observado que las placas de desmielinización no solo tienen lugar en la sustancia blanca del SNC, sino que también pueden aparecer en la sustancia gris tanto en la corteza cerebral como en los ganglios basales, tronco encefálico y médula espinal (Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005). Las lesiones neocorticales se clasifican en función de su localización y extensión, definiéndose como lesiones leucocorticales o tipo I que abarcan tanto la sustancia blanca como la gris, lesiones intracorticales o tipo II perivasculares que se encuentran dentro de la sustancia gris, las lesiones subpiales o de tipo III que se extienden desde la pía hasta zonas de las láminas 3 o 4 corticales, y las lesiones de tipo IV transcorticales que son extensiones de las de tipo III que no sobrepasan la unión entre la sustancia gris y blanca, siendo estas dos

últimas las más abundantes en los pacientes de EM con formas progresivas (Bo, Vedeler et al. 2003, Zurawski, Lassmann et al. 2017). Se ha observado además que, en las placas corticales, es más infrecuente la presencia de infiltrados inflamatorios con una mayor participación de la microglía (Peterson, Bo et al. 2001). Por último, cabe destacar que al analizar la sustancia blanca y gris aparentemente normal se han observado cambios celulares y moleculares que podrían indicar déficits en el transporte axonal (Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005, Lassmann 2014, Zeis, Graumann et al. 2008).

2.2 INFLAMACIÓN

Durante muchos años se ha considerado al SNC un órgano con privilegio inmune, donde la BHE forma una barrera altamente selectiva y limitada para moléculas y células controlando su tráfico desde la circulación periférica al parénquima nervioso. Hoy en día, este concepto ha cambiado y hay evidencia suficiente que indica que dentro del SNC no solo existe un sistema linfático (Louveau, Smirnov et al. 2015), sino que además existen linfocitos T en situación basal responsables de desencadenar respuestas inmunes e inflamatorias frente a estímulos del tipo infeccioso, accidentes traumáticos e isquemia entre otros.

En situaciones en las que la tolerancia antigénica se ha perdido, se genera una respuesta autoinmune, que implica a linfocitos T CD4 y CD8 citotóxicos, así como a los linfocitos B, monocitos/macrófagos y microglía. De esta manera se postula que, en EM, los linfocitos T auto-reactivos específicos para componentes de la mielina interactuarían, mediante el MHC-II, con células presentadoras de antígeno en órganos linfoides periféricos, se activarían y migrarían al SNC a través de una BHE cuya permeabilidad estaría comprometida. Los linfocitos T una vez dentro del parénquima nervioso serían reactivados y proliferarían promoviendo la expresión de más moléculas MHC en microglía y astrocitos bajo la influencia del IFN- γ , amplificando así el reconocimiento antigénico. Se iniciaría además una cascada inflamatoria donde las citoquinas proinflamatorias del tipo IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-17 estimularían a su vez a macrófagos, microglía y astrocitos, así como a células endoteliales. Estas últimas sobreexpresarían moléculas de adhesión favoreciendo el reclutamiento de más linfocitos T CD4, monocitos y linfocitos B desde el sistema circulatorio. Los linfocitos B secretarían anticuerpos específicos anti-mielina y los linfocitos T CD8 citotóxicos producirían un daño directo sobre la mielina, los oligodendrocitos y

los axones mediante mecanismos que incluirían contacto celular, activación del complemento o mediante la liberación de mediadores solubles citotóxicos (Zamvil and Steinman 2003).

2.3 NEURODEGENERACIÓN

El daño axonal que conduce a la transección de los axones con la formación de esferoides en su parte más proximal del axón, es también característico de las placas escleróticas en la EM, junto con el daño a los oligodendrocitos y la mielina (Trapp, Peterson et al. 1998, Trapp, Ransohoff et al. 1999). La neurodegeneración y daño axonal en la EM fueron descritos por Charcot en 1868, sin embargo, el daño axonal siempre se ha considerado secundario a la inflamación y a la desmielinización. Actualmente, se ha demostrado que el daño y pérdida axonal es un proceso que se produce de manera temprana en la patología de la EM (Ferguson, Matyszak et al. 1997, Matthews, De Stefano et al. 1998, Trapp, Peterson et al. 1998) pudiendo alcanzar hasta un 65% de pérdida axonal en lesiones de EM en individuos sin síntomas neurológicos durante la fase inicial de episodios de RR de la enfermedad (Mews, Bergmann et al. 1998). Parece probable que, aunque el daño axonal pueda aparecer al inicio de la enfermedad, éste permanezca en forma subclínica durante la fase RR debido a mecanismos compensatorios del SNC, como la redistribución de los canales de sodio del axón o procesos de remielinización (Reddy, Narayanan et al. 2000, Waxman 1998). La transición desde la EM-RR hasta la EM-SP y el consecuente desarrollo progresivo de la discapacidad permanente podría ocurrir cuando se supera un umbral de pérdida neuronal o axonal, o cuando la respuesta adaptativa del SNC no es suficiente.

En lesiones inflamatorias, los responsables del daño axonal son las células inmunitarias como los linfocitos T citotóxicos y las células gliales (microglía y astrocitos), que liberan mediadores solubles tóxicos entre los que se encuentran el óxido nítrico, el glutamato, la perforina, citoquinas, enzimas proteolíticas, productos oxidativos, radicales libres o anticuerpos anti epítomos axonales. El daño axonal también puede generarse de manera secundaria a la desmielinización debido a la pérdida de factores tróficos o a una mayor exposición de los axones desnudos a los mediadores inflamatorios (Owens 2003).

A pesar de que en general, existe una correlación entre la inflamación y la neurodegeneración, la relación entre estos procesos en los diferentes estadios de la EM resulta cuanto

menos controvertida (Lassmann 2010, Tsunoda and Fujinami 2002, Trapp and Nave 2008). En este aspecto, sigue sin quedar claro si la inflamación es la causa o consecuencia de la neurodegeneración, o si ambas participan en un ciclo que se retroalimenta. Se baraja la posibilidad de que la inflamación pueda llegar a ser protectora frente a la neurodegeneración.

2.4 DESMIELINIZACIÓN / REMIELINIZACIÓN

La desmielinización es el proceso patológico por el cual, en el SNC, el oligodendrocito es dañado y la mielina que rodea a los axones es eliminada, y está generalmente asociado a la presencia de mediadores inflamatorios en la zona de lesión. Tanto en las placas agudas como en las crónicas activas, la mielina aparece desestructurada y en forma de vesículas que son fagocitadas por macrófagos. Además, la desmielinización no solo ocurre en la sustancia blanca (Lucchinetti, Bruck et al. 2000, Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000), sino también en zonas corticales y subcorticales de la sustancia gris del SNC (Peterson, Bo et al. 2001).

La remielinización es un proceso para el cual es necesario que los progenitores de oligodendrocitos (OPCs), que constituyen un 5 % del total de células en el SNC adulto, migren hacia la zona de lesión y se diferencien a oligodendrocitos maduros para sintetizar nuevas vainas de mielina que recubran aquellos axones previamente desmielinizados (Chang, Tourtellotte et al. 2002, Wolswijk 1998). La remielinización recupera la función axonal facilitando la conducción saltatoria y proporciona un soporte trófico a los axones protegiéndoles del daño y la pérdida axonal. Tras un episodio agudo de inflamación en EM, la resolución del proceso inflamatorio ayuda a que se produzca una remielinización espontánea parcial y una consecuente recuperación neurológica que se observa en los episodios de remisión. Se piensa que cerca de un 40 % de las placas escleróticas muestran signos de remielinización, en las denominadas placas fantasma (Barkhof, Bruck et al. 2003, Kotter, Stadelmann et al. 2011). Sin embargo, conforme la enfermedad progresa esa remielinización resulta ser menos eficiente y pasa a ser escasa e incompleta presentando vainas delgadas de mielina e internodos más cortos que la mielina normal. Por esta razón, las propiedades de conducción idóneas de los axones no son del todo recuperadas y los déficits neurológicos se acumulan y se cronifican con el desarrollo de la patología (Chang, Tourtellotte et al. 2002, Franklin 2002, Goldschmidt, Antel et al. 2009). Los datos clínicos y experimentales apuntan a que la incompleta remielinización no parece ser debida a

un fallo del reclutamiento de OPCs en la zona de lesión (Chang, Tourtellotte et al. 2002, Chang, Staugaitis et al. 2012), sino más bien a problemas en su diferenciación (Franklin 2002).

En este contexto, se ha apuntado a diversos factores inhibitorios presentes en la zona desmielinizada, como responsables de impedir la diferenciación de los OPCs, provocando que la remielinización y regeneración endógena en las zonas lesionadas sea incompleta. Entre esos factores se ha descrito un aumento de la señalización vía Notch, wnt/ β -catenina, LINGO-1, RXR, Nogo-A, un balance alterado de Semaforina3F/Semaforina3A, Anosmina-1, PSA-NCAM (Hanafy and Sloane 2011) o cambios en la composición de la ECM circundante con un aumento en la expresión de proteínas denominadas condroitín sulfato proteoglicanos (CSPGs) y hialuronán entre otros (Figura 4) (Haylock-Jacobs, Keough et al. 2011).

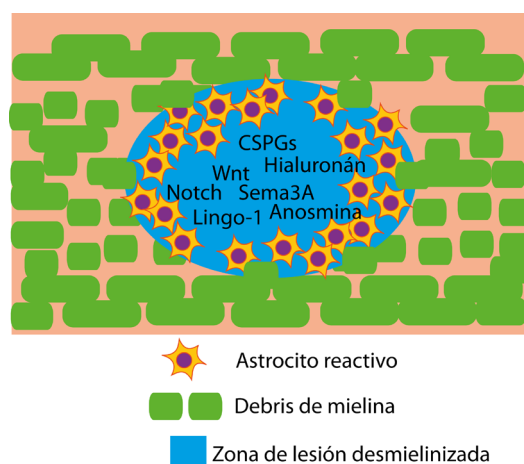


Figura 4. Moléculas inhibitorias de la remielinización y el daño axonal presentes en la zona de lesión.

3. CONDRITÍN SULFATO PROTEOGLICANOS (CSPGs)

Los CSPGs son unas proteínas de la ECM que se acumulan en las zonas de lesión en EM y se consideran factores determinantes en el fallo de la regeneración axonal y la remielinización (Chang, Staugaitis et al. 2012, Sobel and Ahmed 2001), ya que generan un ambiente no permisivo que limita la diferenciación de los OPCs.

3.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

La ECM del SNC sirve como soporte estructural celular, pero también puede afectar a la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular. La ECM está compuesta por: i) glicoproteínas del tipo fibronectina, laminina o tenascina, ii) proteínas fibróticas del tipo colágenos o elastina, y iii) glicosaminoglicanos (GAGs), entre los que se encuentran el hialuronan

y los proteoglicanos, como los CSPGs localizados en el espacio pericelular y los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs), asociados a la membrana celular (Bandtlow and Zimmermann 2000 ,Galtrey and Fawcett 2007).

Los CSPGs están constituidos por un esqueleto proteico al que se unen de forma covalente repeticiones de disacáridos llamados GAGs (Sherman and Back 2008). Estos disacáridos están formados por unidades de ácido D-glucurónico (GlcUA) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) (Galtrey and Fawcett 2007), y pueden variar en número entre 1 a 100 disacáridos en cada cadena de GAG anclada a la estructura proteica. Como muestra la Figura 5, la biosíntesis intracelular de estas cadenas de GAGs ocurre en el retículo endoplásmico, donde la enzima xilosiltransferasa une un grupo xiloso a la serina de la estructura proteica de los CSPGs. A continuación, dos residuos de galactosa se unen al grupo xiloso en la región cis/medial del aparato de Golgi mediante dos glicosiltransferasas, momento en el que se unen los disacáridos gracias a la acción de la condroitín sintasa (Galtrey and Fawcett 2007, Silbert and Sugumaran 2002). Se pueden producir modificaciones a posteriori mediante sulfataciones de las cadenas GAGs gracias a la acción de la enzima condroitín sulfotransferasa (Akita, von Holst et al. 2008, Gama, Tully et al. 2006), generando los diferentes condroitín sulfatos (CS) entre los que se encuentran el CS-A (sulfatado en posición 4), CS-C (en posición 6), CS-D (en posición 2 y 6), CS-E (en posición 4 y 6). La mayor actividad biológica de los CSPGs radica en sus cadenas GAGs y la funcionalidad global de los CSPGs varía en función de la estructura proteica, del número y localización de las cadenas GAGs y del patrón de sulfatación de las mismas (Galtrey and Fawcett 2007, Sherman and Back 2008).

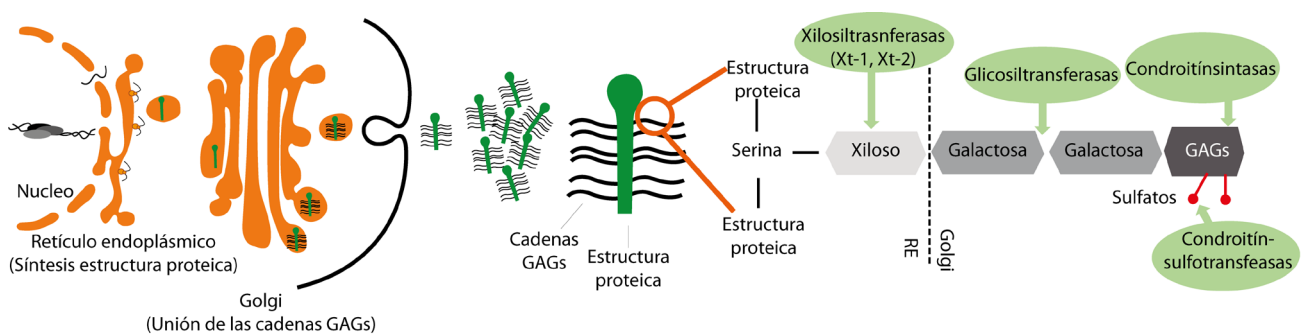


Figura 5. Ruta de la biosíntesis de CSPGs.

Dentro de los CSPGs existe la familia de los llamados lecticanos (Figura 6) que constituyen la mayor parte de los CSPGs, entre los que se encuentran el Neurocán y Brevicán, siendo éstos los CSPGs más abundantes del SNC. A esta familia también pertenece el proteoglicano Agrecán, expresado principalmente por neuronas y localizado en los espacios perineuronales (PNNs), y el proteoglicano Versicán, expresado por fibroblastos, pericitos y células inflamatorias (Wight, Kang et al. 2014, Yamaguchi 2000). Tanto NG2 como el Fosfacán son proteoglicanos independientes a esta familia, siendo NG2 un CSPG transmembrana expresado principalmente por los OPCs que no tiene homología ninguna con el resto de los CSPGs. El Fosfacán es el dominio extracelular del receptor tirosina fosfatasa β (RPTP β), que se genera como resultado de un procesamiento alternativo del gen que codifica para ese receptor (Maurel, Rauch et al. 1994).

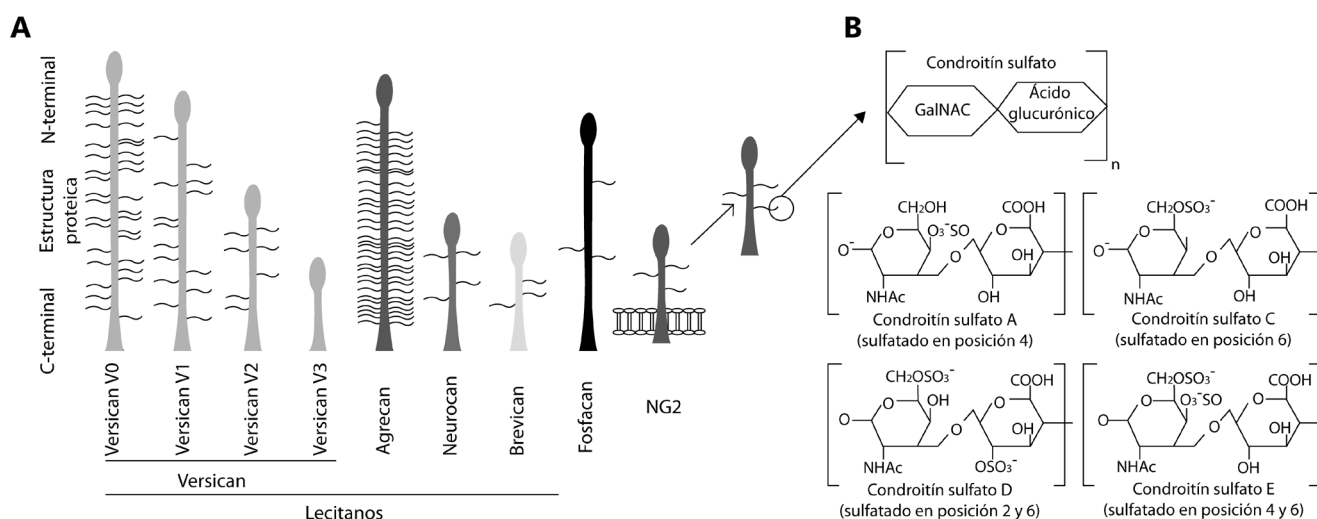


Figura 6. (A) Tipos de CSPGs, **(B)** Detalle de las cadenas de GAGs y patrones sulfatación. Modificado de Haylock-Jacobs S et al. 2011.

Los CSPGs son moléculas de gran importancia para la organización de la ECM, teniendo un papel determinante, no sólo en procesos patológicos, sino también en etapas del desarrollo y en el mantenimiento estructural normal del SNC. Los CSPGs sirven como guía para los conos axonales en desarrollo y en la migración celular, contribuyendo así a la formación de la arquitectura neural. Además, en el adulto, la producción basal de los CSPGs y hialuronán, en el PNNs, es necesaria para mantener las conexiones neurales estabilizando así las sinapsis (Carulli, Rhodes et al. 2006, Deepa, Carulli et al. 2006, Galtrey and Fawcett 2007, Matthews, Kelly et al. 2002, Rhodes and Fawcett 2004). Así mismo, la distribución y el patrón de sulfatación de estas moléculas resulta crítico para la regulación de la plasticidad sináptica (Miyata, Komatsu et al. 2012). Otra función de los CSPGs está relacionada con la modulación de la actividad de

los progenitores neurales en el SNC, pudiendo influir en su proliferación (Sirko, von Holst et al. 2007), así como en el mantenimiento, proliferación y diferenciación de los OPCs (Karus, Ulc et al. 2016, Lau, Keough et al. 2012, Pendleton, Shamblott et al. 2013, Siebert and Osterhout 2011).

3.2 CSPGs Y CICATRIZ GLIAL

El conocimiento del papel de los CSPGs y su función en la cicatriz glial proviene de los estudios realizados en el marco de lesión medular. De esta manera, se ha observado que ante un daño en el SNC se produce un aumento inmediato de los CSPGs, siendo los astrocitos reactivos la principal fuente de síntesis de los mismos (Herrmann, Imura et al. 2008, Li, Tang et al. 2011, McKeon, Schreiber et al. 1991). La principal ruta de activación de los astrocitos para la síntesis y liberación de CSPGs implica la señalización a través de TGF- β /SMAD (Schachtrup, Ryu et al. 2010, Susarla, Laing et al. 2011), aunque algunos estudios también han implicado a la vía de PI3K y mTOR en este proceso (Jahan and Hannila 2015). Este aumento en la expresión de CSPGs en la zona lesionada forma la cicatriz glial, cuya función es en principio beneficiosa ya que limita el daño y evita que éste se extienda a otras zonas del parénquima (Silver and Miller 2004). Sin embargo, si esta cicatriz glial se mantiene en el tiempo puede resultar perjudicial, ya que impediría la regeneración axonal y la remielinización (Back, Tuohy et al. 2005, Chang, Staugaitis et al. 2012, Siebert and Osterhout 2011, Sobel and Ahmed 2001), de tal manera que se considera a los CSPGs como el mayor componente inhibitorio de la cicatriz glial (Karimi-Abdolrezaee and Billakanti 2012, Lau, Keough et al. 2012, Sobel and Ahmed 2001, Sofroniew 2009, Siebert and Osterhout 2011).

En la EM, las lesiones desmielinizadas también contienen cicatrices gliales con acumulación de CSPGs del tipo Agregacán, Neurocán y Versicán, así como de hialuronán (, Back, Tuohy et al. 2005, Chang, Staugaitis et al. 2012, Sobel and Ahmed 2001). Además, la acumulación de CSPGs también se ha evidenciado en la fase desmielinizante de los modelos de lisolecitina y cuprizona, y su eliminación se ha relacionado con los periodos de remielinización (Larsen, Wells et al. 2003, Lau, Keough et al. 2012).

3.3 ESTRATEGIAS DE INHIBICIÓN DE LOS CSPGs

Se han desarrollado diversas estrategias para poder evitar la acumulación de los CSPGs tanto en el caso de la lesión medular, como en modelos experimentales de desmielinización y de EM. En primer lugar y como muestra la Figura 7, el tratamiento local con la enzima ChABC, la cual elimina las cadenas GAGs de los CSPG ya liberados al espacio extracelular (Bradbury, Moon et al. 2002), ha mostrado tener efectos beneficiosos, aumentando la regeneración axonal y promoviendo un aumento del número de OPCs y de la remielinización en el modelo de lesión medular (Barritt, Davies et al. 2006, Bartus, James et al. 2014, Bradbury, Moon et al. 2002, Cafferty, Bradbury et al. 2008, Houle, Tom et al. 2006, Karimi-Abdolrezaee, Schut et al. 2012, Moon, Asher et al. 2001, Siebert, Stelzner et al. 2011). Otra estrategia consiste en la administración del compuesto xilósido, el cual incide en la ruta de síntesis de los CSPGs, ya que se ha observado que mediante su administración se consigue una disminución en la acumulación de CSPGs, así como una mayor remielinización y regeneración en el modelo de lesión medular, en modelos desmielinizantes y de EM (Lau, Keough et al. 2012, Rolls, Shechter et al. 2008). Incidiendo en la misma ruta de síntesis de los CSPGs, mediante el uso del compuesto fluorosamina, un análogo de la UDP-N-acetil-glucosamina que impide su conversión a UDP-N-acetil-galactosamina y por tanto la formación de los disacáridos, se han obtenido efectos beneficiosos y una disminución en la producción de CSPGs en el modelo de EAE, así como en el modelo de desmielinización por lisolecitina (Barthel, Antonopoulos et al. 2011, Keough, Rogers et al. 2016, Nigro, Wang et al. 2009). Otra aproximación se basa en incidir en las vías de señalización para la síntesis de CSPGs a través de TGF- β y del EGF-R mediante la administración de decorina (Davies, Tang et al. 2004). Además, las enzimas metaloproteinasas MMPs y ADAMTs también han mostrado tener efectos positivos degradando la estructura proteica de los CSPGs (Cua, Lau et al. 2013, Lemarchant, Pruvost et al. 2014, Tauchi, Imagama et al. 2012). Por último, varios estudios han evidenciado procesos de regeneración y recuperación funcional tras inhibir los receptores a través de los cuales los CSPGs ejercen sus efectos inhibitorios sobre la remielinización y regeneración axonal (Dyck, Alizadeh et al. 2015, Fisher, Xing et al. 2011, Fry, Chagnon et al. 2010, Lang, Cregg et al. 2015).

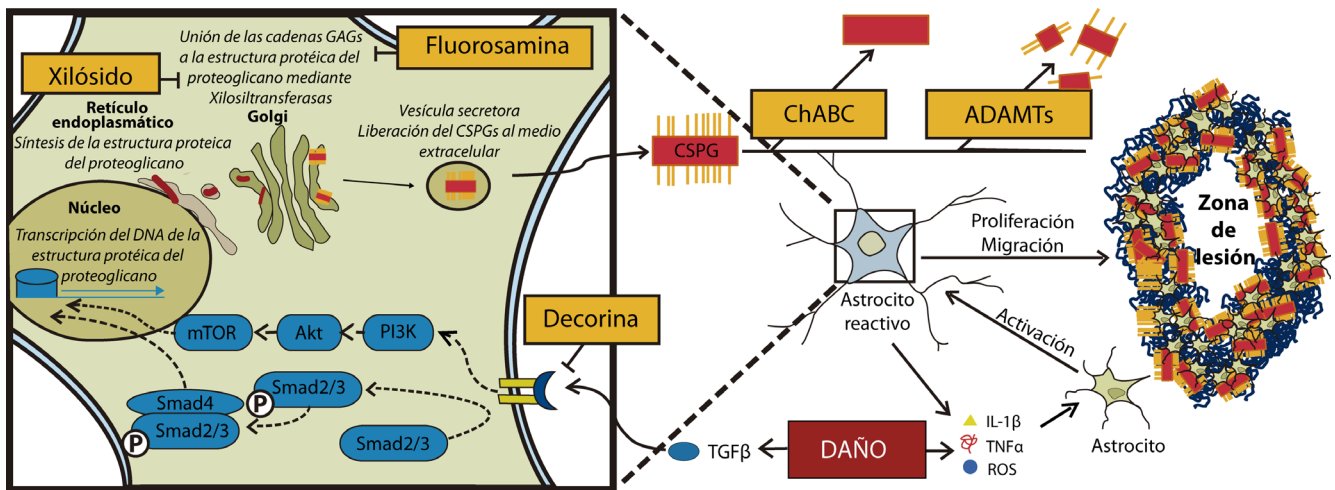


Figura 7. Rutas intracelulares de la síntesis de CSPGs y estrategias para su eliminación. Modificado de Dyck et al., 2015.

3.4 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS CSPGs

El mecanismo mediante el cual los CSPGs y el hialuronan impiden la regeneración axonal y la remielinización se conoce gracias a diversos estudios *in vitro*, donde se evidencia que estas macromoléculas impiden la adhesión y diferenciación de los oligodendrocitos, bloqueando así la remielinización (Karus, Ulc et al. 2016, Larsen, Wells et al. 2003, Lau, Keough et al. 2012, Pendleton, Shamlott et al. 2013, Siebert and Osterhout 2011). Otros estudios también han mostrado que los CSPGs y el hialuronan bloquean directamente el crecimiento del cono axonal y por tanto la regeneración (Dyck, Alizadeh et al. 2015, Lang, Cregg et al. 2015, Zhou, Li et al. 2014).

Entre los mecanismos propuestos (Figura 8) se incluyen la interacción con la laminina, fibronectina y NCAM, bloqueando así sus propiedades tróficas (Galtrey y Fawcett 2007). Además, se han identificado dos tipos de receptores a través de los cuales los CSPGs podrían estar ejerciendo principalmente esos efectos: el receptor tirosina fosfatasa sigma ($RPTP\sigma$) y el receptor LAR. Los receptores PTPs son una familia de receptores de superficie implicados en el desarrollo del SNC que controlan la migración, la formación sináptica y la plasticidad neural. Concretamente, se ha implicado directamente al $RPTP\sigma$ en la inhibición del crecimiento axonal mediada por los CSPGs (Lang, Cregg et al. 2015, Sapieha, Duplan et al. 2005, Shen, Tenney et al. 2009, Fry, Chagnon et al. 2010). La implicación de los receptores LAR en los efectos inhibitorios de los CSPGs proviene de estudios en los que mediante su inhibición o silenciamiento, se promueve la recuperación funcional en ratones con lesión medular, así como un aumento del crecimiento axonal *in vitro* (Fisher, Xing et al. 2011, Lang, Cregg et al. 2015, Xu, Park et al. 2015). También

se ha descrito que mediante la inhibición de los receptores LAR se promueve la supervivencia y crecimiento neuronal (Dyck, Alizadeh et al. 2015). Sin embargo, hay estudios que contrastan con los anteriores ya que implican a los receptores LAR en la promoción del crecimiento axonal. Por tanto, los efectos derivados de la activación de estos receptores parecen depender del contexto (Fisher, Xing et al. 2011, Yang, Yin et al. 2005).

Se sabe además que los CSPGs activan la vía de señalización Rho/ROCK a través de su interacción con los receptores LAR y RPTP σ (Dyck, Alizadeh et al. 2015, Fisher, Xing et al. 2011). Mediante la activación de esta vía, la proteína RhoA bloquea la distribución de microtúbulos, proceso necesario para la regeneración axonal generando, en último término, un colapso del cono axonal. Asimismo, mediante inhibición directa de la vía Rho/ROCK o de los RPTP σ y LAR, se bloquean las propiedades inhibitorias de los CSPGs sobre la supervivencia neural (Dyck, Alizadeh et al. 2015), el crecimiento axonal y la recuperación funcional en lesión medular (Lang, Cregg et al. 2015) y se promueve la maduración de los OPCs y la mielinización *in vitro* (Pendleton, Shamlott et al. 2013).

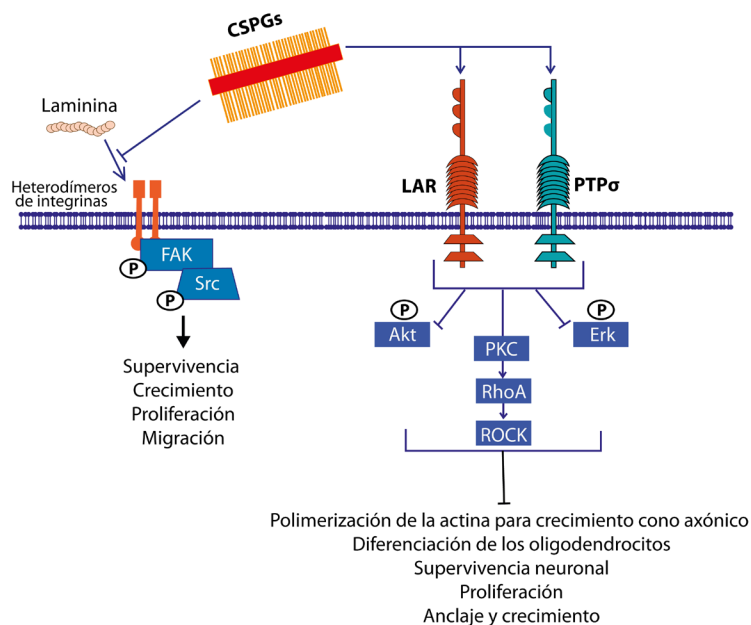


Figura 8. Vías de señalización inhibitorias propuestas de los CSPGs.

4. MODELOS EXPERIMENTALES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Para estudiar los mecanismos fisiopatológicos y las posibles estrategias terapéuticas de la EM, se utilizan diferentes modelos experimentales que se dividen en «inmunes» o «virales» en función del posible origen de la enfermedad. Los modelos «inmunes» se basan en la reacción autoinmune frente a la mielina que se desarrolla tras la inmunización activa con fragmentos de proteínas de la mielina, o bien mediante transferencia pasiva con linfocitos T autorreactivos frente a epítomos de mielina. El modelo de este tipo más utilizado para el estudio de la EM es el de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). Los modelos «virales» tienen en cuenta la teoría de un posible origen viral de esta enfermedad que desencadenaría un proceso autoinmune, siendo el más extendido el de la enfermedad desmielinizante inducida por la infección con el virus de Theiler (TMEV-IDD, del inglés Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinated disease)(Lassmann and Bradl 2017, Procaccini, De Rosa et al. 2015).

4.1 MODELO INMUNE DE ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del modelo inflamatorio de EAE es necesaria una inmunización activa con un emulsionado de antígenos del SNC, siendo el más utilizado el péptido MOG35–55. Este péptido de mielina se administra junto con adyuvante incompleto de Freund (CFA) que permite una liberación lenta y continua del antígeno (Billiau and Matthys 2001) junto con *Mycobacterium tuberculosis* como estimulador masivo de la respuesta inmune (Kabat, Wolf et al. 1951). Es necesaria así mismo la administración de toxina procedente de *Bordetella pertussis* que ayuda a permeabilizar la BHE (Lu, Pelech et al. 2008) y a inhibir la respuesta de los linfocitos T reguladores (Chen, Winkler-Pickett et al. 2006).

La inmunización activa con péptidos de mielina desencadena una respuesta inflamatoria mediada principalmente por linfocitos T CD4 autorreactivos que se extravasan a través de la BHE hacia el SNC, liberando una vez dentro, quimioquinas y citoquinas que atraen a su vez a monocitos/macrófagos periféricos, provocando así una inflamación desmielinizante y daño axonal. Aproximadamente a los 14 días de la inmunización, se alcanza el pico máximo de afectación clínica, cuya progresión depende de la especie y/o de la cepa de animal empleado, así como del antígeno, el sexo o el régimen de inducción, pudiendo presentar un curso monofásico, crónico o RR (Steinman and Zamvil 2006).

4.2 MODELO VIRAL DE LA ENCEFALOMIELITIS MURINA POR INFECCIÓN CON EL VIRUS DE THEILER

En relación a la hipótesis viral de la EM, existen modelos animales de EM entre los que se encuentra el modelo de Theiler, en el que mediante la inoculación intracerebral del virus TMEV en cepas de ratones susceptibles, se desarrolla una sintomatología desmielinizante crónica llamada TMEV-IDD, que modeliza la variante primaria progresiva de la EM (Dal Canto, Kim et al. 1996, Lipton 1975, Lipton and Jelachich 1997).

El virus de Theiler es un picornavirus entérico patógeno de los ratones del género cardiovirus formado por una única cadena de RNA de polaridad positiva (Lipton 1975, Theiler 1937). Existen varias cepas que se distinguen en función de su neurovirulencia entre las que se encuentran la TO, que es menos virulenta, y dentro de la cual se incluyen las cepas BeAn y DA utilizadas para inducir el modelo de EM (Oleszak, Chang et al. 2004). La inoculación del virus debe realizarse en una ventana de tiempo concreta que varía entre las seis y ocho semanas de edad, hecho que está en consonancia con la hipótesis de que el origen de la EM podría deberse a una infección viral durante la infancia y adolescencia temprana.

Ambas cepas de virus inducen, en ratones genéticamente susceptibles SJL/J, un trastorno bifásico que consta de una primera etapa aguda (polioencefalomielitis) que tiene lugar a la semana post-infección, seguida por una segunda fase crónica desmielinizante que afecta principalmente a la médula espinal y que comienza alrededor del segundo mes post-infección en el caso de la infección con la cepa Daniel (Figura 9) (Lipton 1975, Tsunoda and Fujinami 1996, Tsunoda and Fujinami 2010). Las deficiencias motoras generadas en la fase crónica desmielinizante incluyen con espasticidad, fallos de coordinación motora, debilidad en las extremidades, incontinencia urinaria y, finalmente, parálisis de las patas traseras (McGavern, Zoecklein et al. 1999).

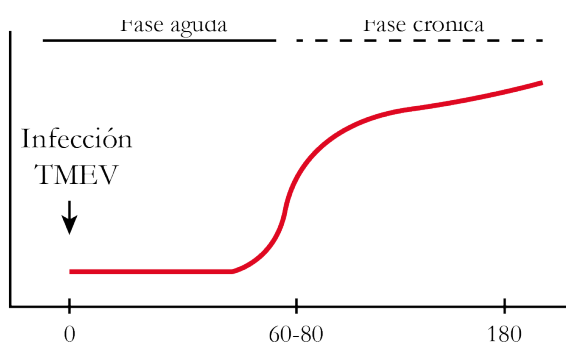


Figura 9. Curso temporal del TMEV-IDD.

En la fase aguda del TMEV-IDD, el virus de Theiler infecta principalmente a neuronas de la sustancia gris a nivel de corteza e hipocampo (Liu, Collins et al. 1967). En esta fase se observa inflamación en la sustancia gris no solo a nivel cerebral, sino también en la médula espinal (Lipton y Dal Canto 1976). Además, en esta fase, se produce infiltración de linfocitos T CD4, CD8, células B que producen citoquinas proinflamatorias que reclutan a su vez a monocitos, macrófagos y microglía, produciéndose finalmente una encefalitis como respuesta inmune frente al virus (, Oleszak, Chang et al. 2004, Schlitt, Felrice et al. 2003, Tsunoda and Fujinami 2010).

Tras la fase aguda, el sistema inmune no es capaz de eliminar el virus en ratones susceptibles, desarrollándose así la fase crónica en la cual se dan procesos de autoinmunidad debido a la expansión de epítomos (Miller, Katz-Levy et al. 2001, Olson, Eagar et al. 2002). Asimismo, se observa inflamación perivascular y subaracnoidal en la sustancia blanca particularmente en la zona ventral de la medula espinal, que generan desmielinización y daño axonal (Tsunoda and Fujinami 2002). El virus de Theiler persiste en reservorios como en oligodendrocitos, astrocitos, microglía y macrófagos, (Clatch, Miller et al. 1990, Jelachich, Bandyopadhyay et al. 1995, Oleszak, Chang et al. 2004, Rodriguez, Leibowitz et al. 1983) siendo estos últimos la principal reserva de virus y quienes determinan su persistencia en el SNC durante toda la vida del animal (Lipton, Kratochvil et al. 1984).

Las características patológicas del modelo de TMEV-IDD como son la inflamación, desmielinización y el daño axonal, no solo se restringen a la médula espinal, sino que también aparecen en corteza y tronco cerebral (Mecha, Carrillo-Salinas et al. 2013). Además, también tienen lugar procesos de remielinización espontánea incompleta (Bieber, Ure et al. 2005, Dal Canto and Lipton 1975) a pesar de que hay una mayor presencia de OPCs en las zonas de lesión, por

lo que se postula que la capacidad de estas células para diferenciarse se encuentra afectada en las zonas lesionadas (Ulrich, Seeliger et al. 2008).

5. TRATAMIENTO Y NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN EM

A pesar de que hoy en día se ha avanzado de manera considerable en las terapias de la EM existiendo diferentes terapias que alivian o retrasan los brotes de la EM, hoy en día no existe un tratamiento lo suficientemente efectivo para la fase progresiva de la enfermedad.

Los diferentes tratamientos que se administran en EM y que reducen la frecuencia de los brotes y por tanto la discapacidad de los pacientes, actúan generalmente como antiinflamatorios, inmunosupresores e inmunomoduladores. Desde la introducción de los interferones en el tratamiento de la EM ha habido un considerable desarrollo terapéutico que ha logrado controlar en buena medida la primera fase de la enfermedad. Sin embargo, es necesario el desarrollo de nuevas terapias para controlar la fase progresiva de la EM donde una combinación de estrategias antiinflamatorias, oligoprotectoras y neuroprotectoras deberían ser abordadas (Ziemssen 2005).

En los primeros síntomas de la enfermedad, los pacientes son tratados con altas dosis de corticoesteroides intravenosos entre los que se encuentran la metilprednisolona durante un periodo de 3 a 5 días. En casos particulares en los que la anterior medida no funcionase, se procede a la administración subcutánea o intramuscular de la hormona adrenocorticotrópica. Estos tratamientos antiinflamatorios actúan reduciendo rápidamente la sintomatología neurológica relacionada con el brote.

Por otro lado, como muestra la Figura 10, encontramos fármacos de primera línea entre los que se incluyen el IFN β -1b subcutáneo (Betaferón[®] y Extavia[®]), IFN β -1a intramuscular (Avonex[®]), IFN β -1a subcutáneo (Rebif[®]), interferones que suprimen la proliferación de los linfocitos autoreactivos, reducen la producción de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ) y promueven las antiinflamatorias (IL-10). También se incluye como fármaco de primera línea al acetato de glatirámico (AG, Copaxone[®]), mezcla de péptidos sintéticos que ejercen un papel inmunomodulador ya que compiten con la proteína MBP por ser reconocidos por el sistema inmunitario y favorecen la producción de citoquinas antiinflamatorias (Arnon and Sela 2003).

En el caso de progresión sintomática, donde los fármacos de primera línea no resultasen eficaces, se pasaría a fármacos de segunda línea entre los que se encuentran anticuerpos monoclonales dirigidos contra componentes del sistema inmunológico del tipo natalizumab (Tysabri®), que bloquea la integrina VLA-4 de los linfocitos evitando así su trans migración al parénquima nervioso; anticuerpo anti-CD25 o daclizumab (Zinbryta®); anti-CD52 de los linfocitos o alentuzumab (Lemtrada®); anticuerpo anti-CD20 inmunosupresor o Ocrelizumab (Ocrevus®). También se utilizaría el antineoplásico mitoxantrona (Novantrone®); el Fingolimod (Gilenia®), el cual retiene a los linfocitos en los ganglios linfáticos; la Teriflunomida (Aubagio®) cuya función es inhibir la proliferación de los linfocitos; el Dimetilfumarato (Tecfidera®) compuesto antiinflamatorio y antioxidante y el recientemente aprobado, pero no comercializado aún, la Cladribina (Mavenclad®), análogo de los nucleótidos purínicos que interviene en la proliferación de los linfocitos. En general los fármacos mencionados previenen la aparición de nuevos brotes pudiendo retrasar la aparición de la discapacidad.

El tratamiento de la EM en su forma progresiva supone todo un reto ya que el componente inflamatorio en esta fase es más residual, no teniendo los compuestos anteriormente mencionados un efecto significativo ya que en general actúan como agentes inmunosupresores y antiinflamatorios. Los únicos compuestos aprobados y dirigidos a tratar las formas progresivas de la enfermedad incluyen al antineoplásico Mitoxantrone y al anticuerpo monoclonal humanizado Ocrelizumab que reconoce el antígeno CD20 de los linfocitos B (Garg and Smith 2015).

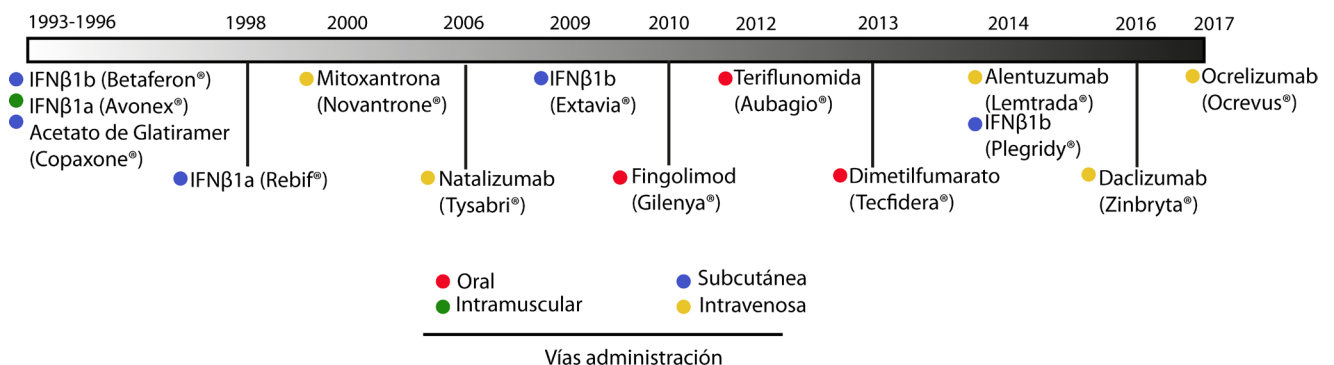


Figura 10. Tratamientos para la EM y vías de administración.

Cierto es que en una enfermedad tan heterogénea como la EM, donde la inflamación juega un papel determinante, aquellos fármacos dirigidos frente al componente inmunológico actuando como inmunomoduladores, ya sea impidiendo la proliferación linfocitaria, bloqueando su entrada al parénquima nervioso, impidiendo su trans migración a través de la BHE o mediante su retención en órganos linfoides, van a tener un efecto beneficioso reduciendo la aparición de brotes. Sin embargo, conforme la enfermedad progresa, estas terapias pierden eficacia y deberían ser complementadas por otras que no solo consigan cambiar el perfil proinflamatorio de las lesiones hacia un perfil antiinflamatorio, sino que también vayan dirigidas específicamente a reducir la neurotoxicidad mediante compuestos neuroprotectores que incidan directamente en aquellos procesos que producen directamente daño axonal. Entre ellos se incluirían agentes inhibidores del receptor de glutamato, inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS-II) y del óxido nítrico, antioxidantes, inhibidores de canales de Ca^{2+} , antiapoptóticos, así como la administración de factores de crecimiento y factores tróficos (Karussis, Grigoriadis et al. 2006).

Del mismo modo, resulta de gran importancia encontrar terapias capaces de incrementar los mecanismos endógenos de reparación que disminuyan o inhiban el daño al oligodendrocito y a la mielina, así como mecanismos que promuevan la remielinización espontánea. En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de utilizar la terapia celular para promover los mecanismos endógenos de reparación, mediante el uso de células madre mesenquimales y sus mediadores pro-regenerativos que incluyen citoquinas, quimioquinas y factores tróficos (Uccelli, Laroni et al. 2011). Además, con el fin de promover la remielinización, se ha barajado también el trasplante de oligodendrocitos, aunque como se ha mencionado anteriormente, el número de oligodendrocitos no se encuentra disminuido en áreas desmielinizadas. En los últimos años el control y la identificación de las moléculas inhibitorias de la regeneración axonal y la diferenciación de los oligodendrocitos presentes en las zonas desmielinizadas como son Nogo-A, Semaforina 3A o los CSPGs, han generado gran interés barajándose como posibles dianas para aumentar los mecanismos de reparación y remielinización en EM.

Teniendo en cuenta las posibles dianas terapéuticas mencionadas, los cannabinoides son buenos candidatos a tener en cuenta para el tratamiento en EM ya que han demostrado aliviar la sintomatología relacionada con la EM (Baker, Pryce et al. 2012), presentar propiedades

antiinflamatorias (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003, Croxford and Miller 2003), antioxidantes, antiexcitotóxicas y neuroprotectoras (Fernandez-Ruiz, Garcia et al. 2010, Loria, Petrosino et al. 2010, Pryce, Ahmed et al. 2003). Asimismo, su administración mejora los procesos de remielinización (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003), protege a los OPCs del daño inflamatorio in vivo e in vitro (Bernal-Chico, Canedo et al. 2015, Gomez, Arevalo-Martin et al. 2010, Mecha, Torrao et al. 2012, Molina-Holgado, Vela et al. 2002) y promueve su proliferación y diferenciación en cultivo (Gomez, Arevalo-Martin et al. 2010, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2011, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2015).

6. SISTEMA CANNABINOIDE

La planta *Cannabis sativa* L., contiene alrededor de 421 compuestos químicos entre los que se encuentran más de 90 terpeno-fenoles llamados fitocannabinoides encontrados exclusivamente en dicha planta (ElSohly y Waseem 2014). Gracias al descubrimiento, en el año 1964, por el grupo de Mechoulam del fitocannabinoide THC (Gaoni y Mechoulam 1964), principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta, así como del receptor mediante el cual ejerce sus efectos (Matsuda, Lolait et al. 1990), conocido como el receptor CB1, pudo abrirse paso al conocimiento del sistema cannabinoide endógeno constituido por ligandos endógenos, las enzimas de síntesis y degradación de los mismos, así como los receptores mediante los cuales ejercen sus efectos.

6.1 SISTEMA CANNABINOIDE Y FUNCIONALIDAD

Los cannabinoides son moléculas altamente hidrofóbicas, debido a su naturaleza lipídica, capaces de penetrar con facilidad en el SNC y atravesar las membranas celulares, (Pertwee 1999, Pertwee 2008, Pertwee 2010). Engloban a agonistas exógenos procedentes de la planta, cannabinoides sintéticos, así como a los endocannabinoides, todos ellos capaces de actuar sobre elementos del sistema endocannabinoide (Di Marzo y Piscitelli 2015). Debido a su amplia distribución tisular y celular, se ha involucrado a los cannabinoides en numerosos procesos fisiológicos tanto centrales como periféricos (Ligresti, De Petrocellis et al. 2016, Maccarrone, Bab et al. 2015), teniendo un papel modulador en el sistema inmunitario, en el sistema cardiovascular, reproductivo, y en el metabolismo energético y endocrino. Dentro del SNC, su acción no solo se restringe al nivel neuronal, sino que se extiende a las células gliales, provistas de la

maquinaria necesaria no sólo para responder, sino también para producir e inactivar endocannabinoides (Ligresti, De Petrocellis et al. 2016, Maccarrone, Bab et al. 2015). En este sistema, participan en la regulación de la actividad motora, en procesos de aprendizaje y memoria, en procesos cognitivos, control de la ingesta y el apetito así como en la regulación de la temperatura corporal, en la emesis, control de la nocicepción, regulación neuroendocrina y supervivencia neuronal (Ligresti, De Petrocellis et al. 2016).

6.2 RECEPTORES CANNABINOIDES

Los receptores mediante los cuales los cannabinoides ejercen principalmente sus efectos, son los denominados receptores CB1, y CB2. El receptor CB1 fue clonado por primera vez en el año 1990 por el grupo de Matsuda (Matsuda, Lolait et al. 1990) y pertenece a la familia de los receptores con siete dominios transmembrana, acoplados a proteínas G del tipo Gi/Go (Herkenham, Lynn et al. 1990, Howlett, Barth et al. 2002). Este receptor se encuentra a nivel periférico y está ampliamente distribuido en el SNC, expresándose en la corteza cerebral, ganglios basales y cerebelo, así como en el hipocampo, en estructuras límbicas e hipotalámicas. Además, resulta interesante destacar que existe una buena correlación entre la presencia de este receptor en estas áreas cerebrales y las acciones psicotrópicas asociadas al consumo de cannabis y en particular al efecto del THC (Mechoulam 2016).

Los endocannabinoides modulan la neurotransmisión sináptica actuando como mensajeros retrógrados mediante la activación del receptor CB1 en membranas presinápticas. Se impide de esta manera la liberación de neurotransmisores ejerciendo un papel esencial en el control de un exceso de transmisión excitatoria o inhibitoria regulando de esta manera la homeostasis neuronal (Katona and Freund 2012).

Respecto al receptor CB2, descrito en el año 1993 por Munro y colaboradores (Munro, Thomas et al. 1993), se expresa mayoritariamente en tejidos periféricos relacionados con el sistema inmune, así como en linfocitos B, monocitos y linfocitos T (Galiegue, Mary et al. 1995). También se ha identificado en la glía, en situaciones inflamatorias, incluyendo a astrocitos, microglía, y progenitores de oligodendrocitos (Benito, Tolon et al. 2008, Di Marzo, Stella et al. 2015, Lu and Mackie 2016, Sagredo, Gonzalez et al. 2009), así como en determinadas subpoblaciones neuronales (García, Cinquina et al. 2015, Lanciego, Barroso-Chinea et al. 2011, Zhang,

Gao et al. 2017) y progenitores neurales (Palazuelos, Aguado et al. 2006). El receptor CB2 es también un receptor con siete dominios transmembrana, acoplado a proteína G, que tiene una homología global del 44% con el receptor CB1.

Ambos receptores median su acción a través de la adenilato ciclasa y AMPc (Figura 11) y en el caso del CB1 inhibiendo también canales iónicos de Ca^{2+} y modulando los canales rectificadores de K^+ (Guo and Ikeda 2004, Howlett, Barth et al. 2002). Además, la señalización mediada por cannabinoides ha mostrado estimular la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) así como modular la cascada de señalización de la PI3K y Akt, vías que están íntimamente relacionadas con los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Iannotti, Di Marzo et al. 2016). Se ha identificado al receptor CB1 en mitocondrias señalizando a través de la inhibición de la AC y PKA regulando los procesos de memoria a través de la modulación del metabolismo energético (Hebert-Chatelain, Desprez et al. 2016, Mendizabal-Zubiaga, Melser et al. 2016).

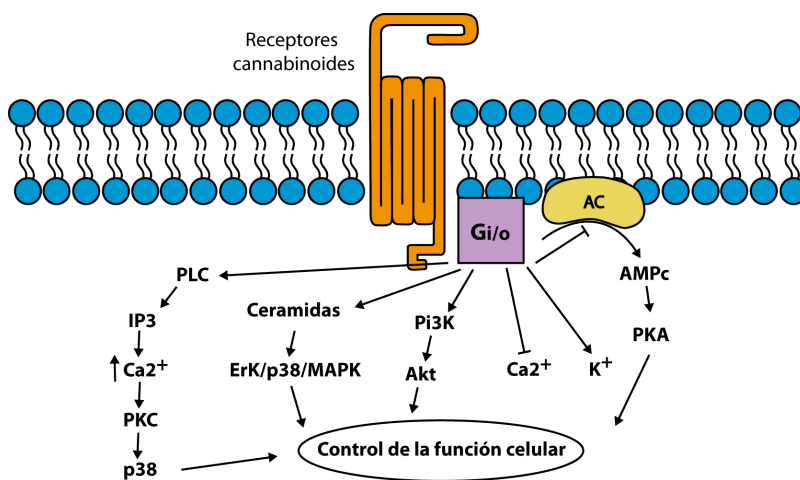


Figura 11. Principales vías de señalización de receptores cannabinoides.

Los cannabinoides también pueden actuar activando receptores de potencial transitorio V1 (TRPV1), canal iónico no selectivo, permeable tanto a Ca^{2+} como a Na^+ y H^+ (Zygmunt, Petersson et al. 1999) implicados en la modulación de la vasodilatación, nocicepción e inflamación. Los cannabinoides son también capaces de activar a otros receptores acoplados a proteína G como el receptor GPR55 o el GPR18, importantes en la función vascular, dolor y en la coordinación motora (Morales and Reggio 2017, Sharir and Abood 2010), a receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), implicados en regular la respuesta inmune e inflamatoria, así como en analgesia (O'Sullivan 2007, Sun and Bennett 2007), a la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina y a la subunidad $\beta 2$ del receptor GABA-A entre otros (Katona and Freund 2012). Además, se ha descrito que los receptores de cannabinoides pueden formar homodímeros o heterodímeros entre sí y con otros receptores formando complejos con los receptores GPR55, de serotonina 5-HT1a, 5HT2a, adenosina A2A, dopaminérgicos D2, entre otros (Ferre, Lluís et al. 2010, Morales and Reggio 2017, Vinals, Moreno et al. 2015).

6.3 ENDOCANNABINOIDES, ENZIMAS DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN

En el año 1992 el grupo de Raphael Mechoulam identificó y caracterizó la N-araquidonil etanolamida o anandamida (AEA) (Devane, Hanus et al. 1992), endocannabinoide con mayor afinidad por el receptor CB1 que por el CB2. Tres años más tarde se identificó el segundo endocannabinoide, el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), endocannabinoide más abundante del SNC que actúa con afinidad similar tanto por el receptor CB1 como por el CB2 (Mechoulam, Ben-Shabat et al. 1995, Stella, Schweitzer et al. 1997, Sugiura, Kondo et al. 1995, Sugiura, Kishimoto et al. 2006).

Estos ligandos endógenos son sintetizados y liberados a demanda a partir de fosfolípidos de membrana como consecuencia de incrementos en los niveles de calcio intracelular mediante activación de receptores unidos a proteínas G o despolarización celular (Basavarajappa 2007, Katona and Freund 2012). Sin embargo, algunos estudios también han indicado que, por ejemplo, la AEA podría almacenarse en adiposomas y unirse a transportadores intracelulares (Iannotti, Di Marzo et al. 2016). La enzima responsable de sintetizar la AEA es la enzima fosfolipasa D a partir de la N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE) (Basavarajappa 2007, Simon and Cravatt 2006, Simon and Cravatt 2008). En el caso del endocannabinoide 2-AG, la fosfolipasa C

(PLC) genera su precursor, el diacilglicerol (DAG), desde fosfoinosítidos de membrana que a su vez lo hidrolizan dos diacilglicerol lipasas (DAGL α y DAGL β) para generar 2-AG (Gao, Vasilyev et al. 2010, Tanimura, Yamazaki et al. 2010). Aparte de estos dos endocannabinoides, también existen lípidos derivados de ácidos grasos que pueden interactuar con receptores cannabinoides entre los que se encuentra el N-oleiletanolamina, la N-palmitoiletanolamina (PEA), la N-linoleiletanolamina y la N-estearoiletanolamina, cuya estructura está muy relacionada con la de la AEA.

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales se regula la señalización mediada por cannabinoides. Entre estos se incluyen la sensibilización e internalización de los receptores de cannabinoides o la eliminación del propio endocannabinoide del espacio extracelular mediante difusión pasiva o a través de sistemas de recaptación mediante transportadores AMT que lo dirige de nuevo al interior celular, aunque este último no ha sido caracterizado molecularmente hasta la fecha (Di Marzo, Stella et al. 2015). Dentro de la célula son hidrolizados mediante enzimas concretas, principalmente la FAAH en el caso de la AEA que la cataboliza a ácido araquidónico y etanolamina (Fezza, Bari et al. 2014). En el caso del 2-AG, es hidrolizado fundamentalmente a través de la serin hidrolasa monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Blankman, Simon et al. 2007, Dinh, Carpenter et al. 2002), responsable del 85 % de su degradación (Blankman, Simon et al. 2007) generando ácido araquidónico y glicerol. Existen así mismo otras serín-hidrolasas minoritarias que degradan el 2-AG entre las que se encuentran la alfa-betahidrolasa 12 (ABHD12), capaz de degradar hasta un 9 % del 2-AG, y la alfa-betahidrolasa 6 (ABHD6) capaz de degradar hasta un 3% del 2-AG (Blankman, Simon et al. 2007, Fezza, Bari et al. 2014, Marrs, Blankman et al. 2010). Las enzimas ABHD6 y ABHD12 tienen una distribución subcelular diferente a la MAGL, lo que sugiere que podrían controlar distintas fuentes de 2-AG dentro del SNC (Blankman, Simon et al. 2007, Marrs, Blankman et al. 2010, Savinainen, Saario et al. 2012). La MAGL se expresa en altos niveles en neuronas del hipocampo, corteza, tálamo y cerebelo (Dinh, Carpenter et al. 2002) y colocaliza normalmente con el receptor CB1 en terminales pre-sinápticos (Savinainen, Saario et al. 2012). Se ha descrito además que la MAGL de los astrocitos es la responsable de la fuente celular del ácido araquidónico, producto de degradación del 2-AG, y precursor de las prostaglandinas dentro del SNC (Viader, Blankman et al. 2015).

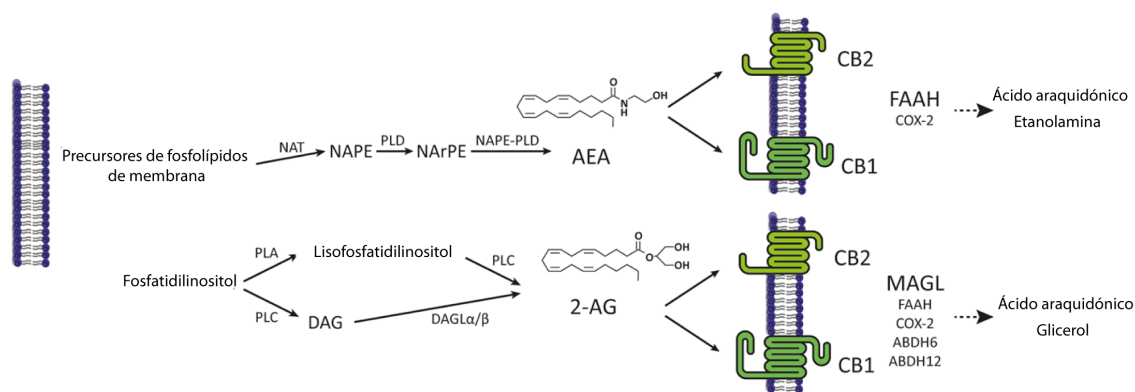


Figura 12. Sistema endocannabinoide. Enzimas de síntesis, enzimas de degradación, endocannabinoides y receptores. Modificado de Mecha et al 2017.

6.4 PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE LOS CANNABINOIDES

Hoy en día se pueden encontrar diferentes compuestos de uso terapéutico en clínica con base cannabinoidea, entre los que se encuentran el Cesamet® (nabilona), el Marinol® (dronabinol) ambos análogos sintéticos del THC, el Sativex® (nabiximols) que es un extracto completo de cannabis con una proporción 1:1 de THC y CBD y el Epidiolex®, constituido por CBD puro de la planta el cual se encuentra cerca de ser aprobado para su uso en síndromes epilépticos. El Cesamet® y el Marinol® se usan como antieméticos para la quimioterapia y como orexigénicos (Soderpalm, Schuster et al. 2001), mientras que el Sativex® es el único aprobado en numerosos países incluyendo España en el año 2010, para el tratamiento de la espasticidad en pacientes con EM (Wade, Makela et al. 2004), además también está aprobado su uso contra dolor neuropático asociado a la EM y cáncer (Collin, Ehler et al. 2010, Langford, Mares et al. 2013, Novotna, Mares et al. 2011).

El efecto terapéutico de los cannabinoides y de los moduladores del sistema endocannabinoide podría ser también aplicable a enfermedades agudas de tipo isquémicas, traumatismo cerebral, lesión medular o en enfermedades neurodegenerativas crónicas como la EM, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), Parkinson, Huntington o Alzheimer (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2015). Este efecto terapéutico se basaría en su perfil de amplio espectro que radica en su capacidad de afectar a múltiples procesos moleculares, entre los que se incluye su capacidad para modular la transmisión sináptica actuando a través del receptor CB1, regulando la homeostasis del glutamato y por tanto la excitotoxicidad, así como regulando la disfunción mi-

tocondrial. A lo anterior, se sumaría su capacidad para regular la actividad glial disminuyendo la toxicidad de la microglía a través del receptor CB2 (Fernandez-Ruiz, Romero et al. 2007) y modulando procesos neuroinflamatorios e induciendo neuroprotección. Por último, también se incluiría su efecto antioxidante y su capacidad para activar a las vías de Nrf-2, NFkB y receptores PPAR γ (Muñoz, Pollastro et al. 2017, O'Sullivan 2007).

6.5 CANNABINOIDES Y EM

Dado que los datos experimentales señalan que los componentes del sistema endocannabinoide se encuentran alterados tanto en modelos animales de EM (Centonze, Bari et al. 2007) como en lesiones desmielinizadas (Benito, Romero et al. 2007), plasma y LCR de pacientes (Centonze, Bari et al. 2007, Jean-Gilles, Feng et al. 2009), la administración de cannabinoides o de moduladores del sistema endocannabinoide se plantea como una buena estrategia para el tratamiento de esta enfermedad. Así, en el modelo de EAE y de TMEV-IDD se ha visto que mediante dichas estrategias se mejora la sintomatología motora en ambos modelos, y se disminuyen sus características histopatológicas ejerciendo efectos antiinflamatorios (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003, Croxford and Miller 2003) y neuroprotectores (Fernandez-Ruiz, Garcia et al. 2010, Loria, Petrosino et al. 2010, Mecha, Feliu et al. 2015, Pryce, Riddall et al. 2015, Pryce, Ahmed et al. 2003). Los cannabinoides regulan así algunos de los eventos involucrados en la EM, como son la limitación del tráfico leucocitario al parénquima nervioso actuando a nivel de BHE (Mestre, Inigo et al. 2011), regulando la respuesta inflamatoria modulándola hacia un perfil más antiinflamatorio y reparador (Mecha, Feliu et al. 2015), o promoviendo la proliferación y la diferenciación de los OPCs favoreciendo los procesos de remielinización (Gomez, Arevalo-Martin et al. 2010, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2015).

Concretamente, el 2-AG ha mostrado ejercer efectos inmunomoduladores y supresores de células inflamatorias regulando la actividad y proliferación de linfocitos (Kaplan, Ouyang et al. 2005, Lourbopoulos, Grigoriadis et al. 2011, Rockwell, Snider et al. 2006), de células microgliales (Carrier, Kearn et al. 2004) y de macrófagos (Gallily, Breuer et al. 2000), además de ejercer efectos neuroprotectores (Arevalo-Martin, Garcia-Ovejero et al. 2010, Panikashvili, Shein et al. 2006, Shohami and Mechoulam 2006). La administración de 2-AG también reduce el volumen de lesión en un modelo de lesión medular (Arevalo-Martin, Garcia-Ovejero et al.

2010). Inhibidores farmacológicos de la MAGL como el compuesto JZL184, han mostrado tener efectos terapéuticos mejorando la sintomatología motora en el modelo de EAE a través de la modulación de la respuesta inflamatoria de macrófagos y microglía hacia un perfil antiinflamatorio. También disminuye la infiltración de linfocitos T y la excitotoxicidad de los oligodendrocitos previniendo así la desmielinización (Bernal-Chico, Canedo et al. 2015, Lourdopoulos, Grigoriadis et al. 2011). Así mismo, el 2-AG y el inhibidor JZL184 también han mostrado inducir la proliferación y diferenciación de OPCs in vitro pudiendo promover la remielinización y los procesos de reparación (Bernal-Chico, Canedo et al. 2015, Gomez, Arevalo-Martin et al. 2010, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2011, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2015).

Durante la última década, se han desarrollado numerosos inhibidores selectivos de la MAGL, enzima de degradación del 2-AG (Tuo, Leleu-Chavain et al. 2017), como aproximación farmacológica para la obtención de efectos analgésicos, antiinflamatorios y neuroprotectores. Su uso resulta de gran interés terapéutico ya que, mediante su administración, se activan los receptores cannabinoides, pero se evita la aparición de efectos adversos psicotrópicos ejercidos por la acción de los agonistas sobre el receptor CB1 (Fernandez-Suarez, Celorrio et al. 2014, Chicca, Arena et al. 2016, Gaetani, Cuomo et al. 2003). El problema radica en que, los inhibidores descritos hasta la fecha actúan de manera irreversible pudiendo generar efectos antagónicos, así como tolerancia farmacológica y desensibilización de receptores tras su empleo crónico, perdiendo así la eficacia del inhibidor (Schlosburg, Blankman et al. 2010). Es por ello que supone de gran importancia desarrollar nuevos inhibidores selectivos, potentes y reversibles de la MAGL que carezcan de efectos adversos mediados por la activación central del receptor CB1. Este es el caso del compuesto UCM03025, inhibidor selectivo reversible de la MAGL, cuyo efecto terapéutico ha sido evaluado en la presente tesis doctoral. El UCM03025 es 50 veces más selectivo frente a la MAGL respecto a la FAAH con una IC₅₀ (MAGL) de 0,18 μ M, frente una IC₅₀ (FAAH) de 59 μ M. Actúa además como un inhibidor no competitivo con una K_i de 0,4 μ M y no es capaz de unirse a los receptores CB1 y CB2 teniendo en este caso una K_i mayor de 10 μ M. Por último, es capaz de detectarse en plasma tras 4 horas desde su administración (Hernandez-Torres, Cipriano et al. 2014) lo que posiciona a este inhibidor de la MAGL como un compuesto interesante para su uso terapéutico.

Tanto los cannabinoides como los inhibidores de la MAGL, en particular aquellos que

actúan de manera reversible, podrían ejercer efectos terapéuticos actuando no solo como inmunomoduladores, sino que podrían actuar también como neuroprotectores disminuyendo el daño axonal y promoviendo los mecanismos de reparación endógena y la remielinización.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Objetivos

La **hipótesis** de la presente Tesis doctoral postula que el fallo en la remielinización que acontece en las fases crónicas del modelo del virus de Theiler podría ser, en parte, consecuencia de una alteración de la ECM presente en las zonas de lesión, donde la acumulación de CSPGs y la formación de la cicatriz glial inducen una desregulación de la diferenciación de OPCs, dificultando los mecanismos endógenos de reparación y una remielinización efectiva.

El potencial de los cannabinoides como reguladores de la progresión de la enfermedad actuando como inmunomoduladores y antiinflamatorios podría incluir también un posible efecto terapéutico promoviendo los procesos de reparación a través de la modulación de los CSPGs y la cicatriz glial.

El **objetivo general** de la Tesis doctoral es evaluar la implicación de los CSPGs en el fallo de remielinización que acontece en las fases crónicas del modelo de EM del virus de Theiler, así como el papel del endocannabinoide 2-AG en su regulación y modulación para promover los mecanismos de reparación y consecuente remielinización.

Los **objetivos concretos** incluirán:

- i) El análisis de la expresión de los CSPGs en la fase crónica del modelo de TMEV.
- ii) Estudio de cómo la acumulación de los CSPGs influye en la funcionalidad motora en las fases crónicas del modelo de TMEV-IDD, haciendo uso de herramientas farmacológicas que impiden la acumulación de dichas macromoléculas.
- iii) Análisis del potencial terapéutico del UCM03025, inhibidor reversible de la enzima MAGL, y la administración del endocannabinoide 2-AG en el modelo de EAE, así como en el modelo del virus de Theiler, estudiando su capacidad para modular la respuesta inflamatoria, así como de regular la acumulación de CSPGs.
- v) Puesto que los astrocitos son los principales productores de los CSPGs, se analizará la síntesis y liberación de los CSPGs, en cultivo de astrocitos, así como su modulación por 2-AG y por inhibidores de la MAGL estableciendo los receptores y las vías de señalización implicadas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

1. MATERIAL

1.1 REACTIVOS

1.1.1 Cultivos celulares

- Dulbecco's modified Eagle's Media (DMEM, Lonza Ibérica S.A. Barcelona, España)
- Tampón fosfato salino (PBS, Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Suero fetal bovino (FBS Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)
- Suero de caballo (HS, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)
- Penicilina/estreptomicina (Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Poly-D-Lisina (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen S.A.; Barcelona, España)
- Citosina arabinósida AraC (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España)
- Azul de Tripán (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)

1.1.2 Procesamiento del tejido

- Paraformaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Sacarosa (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Tissue-Teck[®] (Sakura, Zoeterwoude, Holanda)
- Solución crioprotectora (polivinilpirrolidona 40 (PVP-40), sacarosa, polietilenglicol 400 y PB).
- Agar (Conda, Madrid, España)

1.1.3 Inmunocitoquímica inmunohistoquímica y otras tinciones

- Tampón fosfato salino (PBS, Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)

- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Paraformaldehído (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Suero normal de cabra (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- Suero normal de caballo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- Suero normal de conejo (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- Complejo avidina-biotina peroxidasa (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.)
- 3,3-Diaminobenzidina tetrahidrocloruro (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Xileno (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Etanol (Merck; Darmstadt, Alemania).
- DePeX® (AMS Biotechnology, Oxon, Reino Unido)
- Mowiol (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Carbonato de litio (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Alumbre de cromo (Panreac Química S.A.U.; Barcelona, España)

1.1.4 Inmunodetección por separación electroforética de proteínas (western- blot)

- Tampón RIPA pH 7.6 (10% glicerol, 1% NonideT P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA)
- Inhibidores de proteasas “Complete Mini” (Roche Diagnostics, S.L., Manheim, Alemania)

- Ácido okadaico (Calbiochem; Darmstadt, Alemania).
- Aprotinina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Benzamidina HCl (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Ditiotreitól (DTT; Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF; Boehringer Mannheim; Mannheim, Alemania).
- Leupeptina (Boehringer Mannheim; Mannheim, Alemania).
- Pirofosfato sódico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España)
- Hidróxido sódico (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Patrón de peso molecular de proteínas (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences Europe; Barcelona, España).
- Persulfato amónico (APS) (BioRad; Hercules, CA, EEUU)
- TEMED (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Tris base (Roche Diagnostics, S.L.; Mannheim, Alemania).
- Glicina (PanReac, Alemania)
- Glicerol (PanReac, Alemania)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (USB, Cleveland, Ohio, EE.UU.)
- Azul de Bromofenol (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Acrilamida al 30% (BioRad, CA, EE.UU.)

- Ácido clorhídrico (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Leche desnatada en polvo (PanReac AppliChem, Barcelona, España)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Solución de bloqueo (LI-COR Biotechnology, Germany)
- Solución de stripping NewBlot IR Stripping (LI-COR Biotechnology, Germany)
- Ácido p-cumárico (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Luminol (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Reactivo de Bradford (BioRad POWER-PAC300, CA, EE.UU.)
- Enzima Condroitinasa ABC de *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich; Saint Louis, Missouri, USA)
- Tampón condroitinasa (50 Mm Tris Ph8, 60Mm acetato sódico, 0,02% BSA)

1.1.5 Extracción de ARN, transcripción inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa

- β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Kit de extracción RNeasy[®] (Qiagen, Manchester, Reino Unido)
- QIAzol[®] (Qiagen, Reino Unido)
- Etanol (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Cloroformo (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- Desoxirribonucleasa I (DNasa I; Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, España)
- EDTA (Gibco-Invitrogen S.A. Barcelona, España)
- Sistema de transcripción inversa (Promega Biotech Ibérica, S.L., Madrid, España)

- Kit de alta capacidad R&D biosystems
- Power SYBR® Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido)

1.2 COMPUESTOS UTILIZADOS PARA EL DESARROLLO DE MODELOS ANIMALES DE EM

- Cepa Daniel (DA) del virus de Theiler, cedido por el Dr. Moses Rodríguez (Departamento de Inmunología y Neurología de la Clínica Mayo; Rochester, NY, EEUU).
- Dulbecco's modified Eagle's Media (DMEM, Lonza Ibérica S.A. Barcelona, España)
- Adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories; Detroit, MI, EEUU).
- MOG35-55 (Unidad de Desarrollo de Herramientas Proteicas, CNB, CSIC; Madrid, España/ ImmunoStep SL; Salamanca, España).
- Mycobacterium tuberculosis H37 RA (Difco Laboratories; Detroit, MI, EEUU).
- Toxina pertussis (Bordetella pertussis) (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).

1.3 DROGAS Y TRATAMIENTOS

1.3.1 Para los estudios in vitro

1.3.1.1 Citoquinas

- TGF- β 1 humana (Peprotech, Londres, Reino Unido)

1.3.1.2 Cannabinoides, inhibidores de la MAGL y antagonistas de los receptores cannabinoides

- 2-Araquidonoilglicerol (2-AG, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)
- UCM03025 (Cedido por la Profesora M^a Luz López Rodríguez, de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Químicas, Departamento de Química Orgánica)
- WWL-70 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

- JZL 184 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)
- SR14176 (cedido por Sanofi Recherche, Montpellier, Francia)
- AM630 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

1.3.1.3 Inhibidores de rutas de señalización

- SB431542 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA)
- LY294002 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

1.3.2 Para los estudios in vivo

1.3.2.1 Cannabinoides, inhibidores de la MAGL y antagonistas de los receptores cannabinoides

- 2-Araquidonoilglicerol (2-AG, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)
- UCM03025 (Cedido por la Profesora M^a Luz López Rodríguez, de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Químicas, Departamento de Química Orgánica)
- AM251(Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)
- AM630 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido)

1.3.2.2 Inhibidores de la ruta de síntesis de CSPGs

- 4-metilumbeliferil- β -D-16 xilopiranosido, xilósido (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA)
- Fluorosamina (Cedido por el Profesor VW Yong, Hotchkiss Brain Institute, Departamento de Neurociencia Clínica y Oncología de la Universidad de Cálgary, Canadá)

1.3.2.3 Otros

- Dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España).
- Salino (NaCl) 0,9% (Millipore, Alemania)
- Isoflurano (Esteve; Madrid, España).

- Pentobarbital (Dolethal; Cedex, Francia).

- BrdU (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA)

1.4 KIT DE INFUSIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR Y BOMBAS MINIOSMÓTICAS

- Bombas osmóticas tipo 1002 (Alzet, Cupertino, CA, USA)

- Kit de infusión cerebral tipo 1 (Alzet, Cupertino, CA, USA)

1.5 TRAZADOR ANTERÓGRADO DE ALTA RESOLUCIÓN BDA

- 10.000 MW Amino dextrano biotinilado (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU)

1.6 OLIGONUCLEÓTIDOS

Las sondas para SYBR® en tiempo real se diseñaron utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems, Reino Unido), a partir de las secuencias publicadas en la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI, EE.UU.) y fueron suministradas por Integrated DNA technologies, Iowa, USA. Los nombres y secuencias de las sondas en dirección 5'-3' de los genes analizados se describen en la siguiente tabla:

Producto	Especie	Cebadores	Secuencia
Neurocan	Ratón	Sentido Antisentido	5'-CGGATGAAGTGGACTAAGGT-3' 5'-CGCACCACGTTGTCTTTGG-3'
Fosfacan	Ratón/Rata	Sentido Antisentido	5'-TCCTCGCGTGCCTTCAG-3' 5'-ATAGGACCAGCCAATCTCTTCA-3'
Brevican	Ratón/Rata	Sentido Antisentido	5'-CCATCCAGAACCCACGAGA-3' 5'-ACCCACCACTCCGTAATTCC-3'
Versican	Ratón	Sentido Antisentido	5'-TCCTGATTCGATTAGTGAAG-3' 5'-CTGGTCTCCGCTGTATCC-3'
Xt-1	Ratón	Sentido Antisentido	5'-GAGAAAAGCCACAGGAACAGT-3' 5'-TGCCATGGCTGTGTCTTGA-3'
Olig-2	Ratón	Sentido Antisentido	5'-GACTCCCCCTCCGTCTAAG-3' 5'-CGCAGTAAAGCCACGTTGT-3'
Nkx2.2	Ratón	Sentido Antisentido	5'-CGCCGACACAGGTCAAGAT-3' 5'-CCATCCGTCGGTTTTGAAAT-3'
TNF- α	Ratón	Sentido Antisentido	5'-AGAGGCACTCCCCAAAAGA-3' 5'-CGATCACCCGAAGTTCAGT-3'
IL-1 β	Ratón	Sentido Antisentido	5'-TGGTGTGTGACGTTCCCA TT-3' 5'-TCCATTGAGGTGGAGAGC TTTC-3'
NOS-II	Ratón	Sentido Antisentido	5'-CCCTTCAATGGTTGGTACATG-3' 5'-ACATTGATCTCCGTGACAGCC-3'
IL-10	Ratón	Sentido Antisentido	5'-TGAATCCCTGGGTGAGAAGCTGA-3' 5'-TGGCCTTGAGACACCTTGGTCTT-3'
18S	Ratón/Rata	Sentido Antisentido	5'-ATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCG-3' 5'-ATTCTAGCTGCGGTATCCAGG-3'
RPS29	Ratón	Sentido Antisentido	5'-GCCGCTCTGCTCAA-3' 5'-ACATGTTACGCCGTATTTC-3'
Arginasa-1	Ratón	Mm 00475988	Taqman, Applied 24 Biosystems, California, USA

Tabla1. Cebadores o primers utilizados para la RT-PCR.

1.7 MARCADORES (ANTICUERPOS Y OTROS)

	Anticuerpo (Western blot)	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo
Anticuerpos primarios	Neurocan 1F6	Ratón	Developmental studies Hybridoma Bank	1:1.000
	Brevican	Ratón	BD Bioscience	1:1.000
	Fosfacan	Ratón IgM	Millipore	1:1.000
	MBP	Ratón	Millipore	1:500
	α -Tubulina	Ratón	Sigma-Aldrich Química, S.A	1:10.000
	Pan-actina	Conejo	Cell signaling technology	1:1.000
	Smad2 total	Ratón	Thermofisher	1:1.000
	p-Smad2	Conejo	Cell Signalling	1:1.000
	Smad3	Ratón	Abcam	1:1.000
	p-Smad3	Conejo	Cell Signalling	1:1.000
	Akt	Ratón	Thermofisher	1:1.000
	p-Akt	Conejo	Cell Signalling	1:1.000
	mTOR	Ratón	Cell Signalling	1:1.000
	p-mTOR	Conejo	Cell Signalling	1:1.000
	Anticuerpos secundarios	Anti ratón IgM-HRP	Cabra	BioRad
Anti ratón-HRP		Cabra	BioRad	1:2.000 / 1:8.000
Anti ratón IRDye® 800CW		Cabra	LI-COR	1:15.000
Anti conejo IRDye® 680LT		Cabra	LI-COR	1:15.000

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para western-blot.

	Anticuerpo (IHQ/ICC)	Huésped	Distribuidor	Dilución de trabajo
Anticuerpos primarios	Iba-1	Conejo	Wako Chemical Pure Industry	1:1.000
	Neurofilamento-H	Conejo	Millipore	1:1.000
	MBP	Ratón	Millipore	1:1.000
	GFAP	Conejo	Sigma-Aldrich Química, S.A	1:1.000
	Vimentina	Conejo	Sigma-Aldrich Química, S.A	1:1.000
	CS-56	Ratón IgM	Sigma-Aldrich Química, S.A	1:250
	Olig-2	Conejo	Santa Cruz	1:500
	BrdU	Ratón	Developmental studies Hybridoma Bank	1:1000
	CC1	Ratón	Calbiochem	1:1000
	Neurocan 1F6	Ratón	Developmental studies Hybridoma Bank	1:1000
Anticuerpos secundarios	Anti conejo biotinilado	Cabra	Vector Laboratories	1:1.000
	Alexa 488 Anti conejo	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Alexa 488 Anti ratón	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Alexa 594 Anti ratón	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1.000
	Alexa 594 Anti ratón IgM	Burro	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:500
	Alexa 594 Anti conejo	Cabra	Invitrogen Molecular Probes Inc.	1:1000
Otros marcadores	Hematoxilina		Sigma-Aldrich Química, S.A	
	Eosina		Panreac	
	Dapi		Roche Diagnostics, S.L.	1:1.000
	Luxol fast blue		BDH Laboratory supplies	

Tabla 3. Anticuerpos y otros marcadores utilizados para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

1.8 ENZIMOINMUNOENSAYO EN FASE SOLIDA (ELISA)

- Kit anti Neurocán de rata MBS 450382 (MyBiosource)

1.9 EQUIPOS

- Actímetro (Activity Monitor System Omnithech Electronics, Inc., Columbus, OH, EE.UU.)
- Criostato (Leica Microsystems CM1900, Barcelona, España)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss Microscopy, LLC, EE.UU.)
- Microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemania)
- Microscopio de fluorescencia invertido (Leica Microsystems, GMBH; Wetzlar, Alemania).
- Equipo electroforético (BioRad POWER-PAC300, CA, EE.UU.)
- Sonicador (Sonics & Materials Inc, Vibra Cell, Danbury, CT, EE. UU)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen EBA 12, Tübingen, Alemania)
- Campana de flujo laminar (Steril, Mazzo di Rho, MI, Italia)
- Incubador (RS Biotech Galaxy S, Scotland, Reino Unido)
- Termociclador (MJ Research PTC-100, Watertown, MA, EE.UU.)
- Sistema de PCR a tiempo real 7500 (Applied Biosystems, Reino Unido).
- Escáner GS-800 (BioRad; Hercules, CA, EEUU).
- Espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop Technologies, EEUU).
- Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR Biotechnology, Germany)
- Philips EM208S electron microscope
- Espectrofotómetro Multiskan FC (ThermoFisher, Massachusetts, USA)
- Vibratomo VT1000S (Leica Microsystems, Alemania)

- HPLC unido a espectroscopia de masas (LC-MS). Instrumento Agilent 1200 LC-MSD VL (Santa Clara, USA)

2. MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1 ANIMALES

Para la experimentación in vivo, fueron utilizados ratones hembra *Mus musculus* de la cepa SJL/J de 6-8 semanas de edad (Harlan Laboratories; Barcelona, España) para desarrollar el modelo de TMEV-IDD. Para los experimentos realizados en el modelo de EAE, se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 6-8 semanas (Harlan Laboratories; Barcelona, España). Los animales tuvieron acceso a agua y comida ad libitum, y fueron mantenidos en el animalario del Instituto Cajal (CSIC) en condiciones controladas de temperatura (22 oC), en un ciclo diario de luz/oscuridad de 12 horas, en jaulas con enriquecimiento ambiental.

Para la experimentación in vitro fueron utilizadas ratas postnatales entre P0-P2 de la cepa Wistar para el desarrollo de cultivos primarios mixto y de astrocitos.

Todos los experimentos se han realizado según la regulación del gobierno y la Unión Europea (Decreto 53/2013 BOE nº34 y Comunidad de Madrid: ES280790000184). El comité de ética sobre experimentación animal del Instituto Cajal (CSIC) aprobó todos los experimentos realizados en esta Tesis doctoral.

El servicio de Animalario del Instituto Cajal cumple todas las recomendaciones sobre alojamiento del convenio del Consejo de Europa ETS 123 y la normativa vigente sobre Experimentación y Protección de los Animales utilizados en Experimentación y otros Fines Científicos reflejada en el RD 53/2013 y la Ley 6/2013.

2.2 MODELOS ANIMALES DE EM

2.2.1 Modelo de encefalomiелitis murina desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD)

El virus de Theiler (cepa DA), cedido por el Dr. Moses Rodríguez (Clínica Mayo; Rochester, NY, EEUU), fue inoculado intracranealmente en el hemisferio cerebral derecho en ratones de la cepa susceptible SJL/J, a una dosis de 2×10^6 unidades formadoras de placa (ufp) en 30 μ l de

medio DMEM enriquecido con 5% de suero fetal de ternero (FCS, del inglés Fetal calf serum) (Lledo, Borrell et al. 1999). Los ratones Sham fueron inoculados sólo con vehículo (DMEM + 5% FCS). La evolución de estos animales se controló periódicamente hasta su sacrificio.

2.2.1.1 Diseño experimental

Una vez iniciada la sintomatología, evaluada mediante el test de la caja de actividad, y que tuvo lugar entre los 70-75 días post-infección (dpi), se procedió a tratar a los ratones con inhibidores de la síntesis de los CSPGs; xilósido (120 mg/kg) o fluorosamina (50 mg/kg) durante 10 días consecutivos por vía intraperitoneal (i.p.) o con sus respectivos vehículos (DMSO/PBS) y salino al 0,9%.

Con el fin de evaluar el potencial terapéutico del endocannabinoide 2-AG en el modelo de TMEV-IDD una vez comenzados los síntomas motores, se procedió a administrar por vía i.p. un inhibidor reversible de su enzima de hidrólisis MAGL, el compuesto UCM03025 (5 mg/kg) o bien el vehículo (DMSO/salino) durante 10 días consecutivos. En los experimentos en los que se utilizaron antagonistas del receptor CB1 (AM251, 2 mg/kg en PBS) o del receptor CB2 (AM630, 2 mg/kg en PBS), los animales fueron tratados i.p. con los antagonistas 30 minutos antes de la administración de UCM03025. Con el fin de determinar si el tratamiento con el inhibidor de la MAGL podría afectar el proceso de remielinización un grupo de animales fueron tratados de la misma manera, durante 10 días con el compuesto UCM03025 (5 mg/kg) y se mantuvieron sin tratamiento durante los 20 días consecutivos posteriores sacrificándose a los 105 dpi tal y como muestra la Figura 13. Para determinar las células proliferativas mediante histología se procedió a administrar a los ratones BrdU, 50 mg/kg i.p. diariamente durante los 10 días de tratamiento junto con el UCM03025 o con el correspondiente vehículo.

Para evaluar el efecto del 2-AG administrado de manera directa y continua en el ventrículo lateral de los ratones se usó un kit de infusión intracerebroventricular mediante catéter e implantación de minibombas osmóticas una vez comenzada la sintomatología clínica siguiendo el tratamiento durante 10 días.

La eficacia terapéutica de los compuestos se analizó evaluando las deficiencias motoras de los animales mediante el test de la caja de actividad una vez finalizados los tratamientos, a

los 80-85 dpi y 20 días después, a los 105 dpi. Una vez evaluada la actividad motora se procedió al sacrificio de los animales con una sobredosis de anestésico (Pentobarbital 50 mg/kg), se realizó la perfusión y obtención del tejido para su posterior análisis.

En cada experimento se utilizaron 5-6 animales por grupo en cada tiempo y tratamiento. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes para el estudio del efecto terapéutico del compuesto UCM03025.

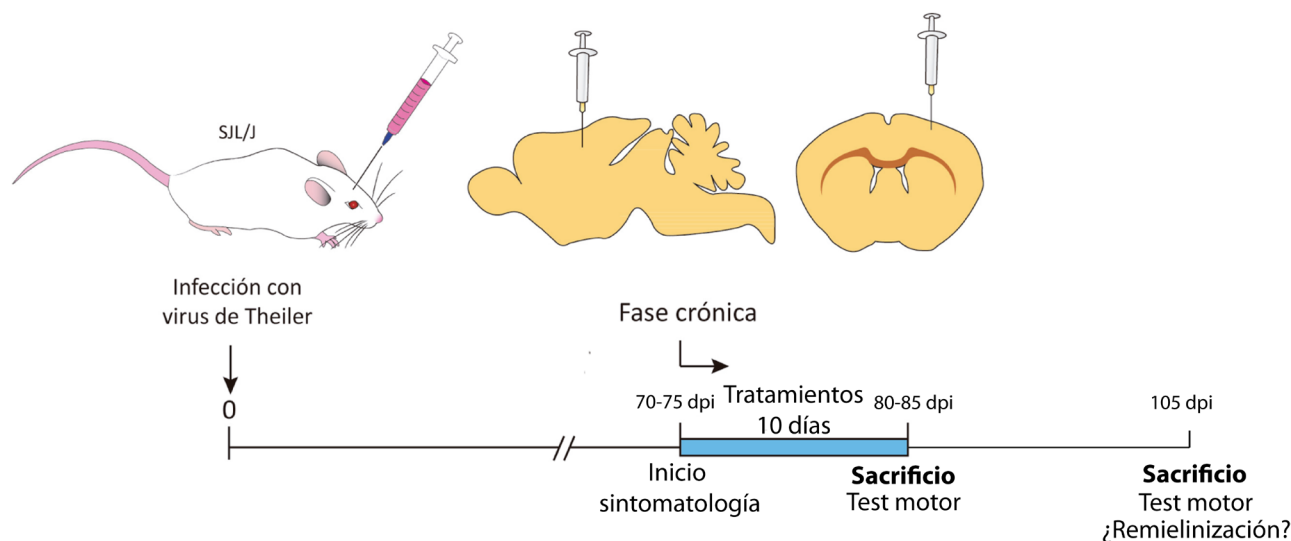


Figura 13 Diseño experimental en el modelo de TMEV-IDD.

2.2.1.2 Evaluación de la función motora (caja de actividad)

Para evaluar las deficiencias motoras generadas en los ratones infectados con el virus de Theiler, se utilizó la prueba de la caja de actividad motora o actímetro (Figura 14; Activity monitor System Omnitech electronics, Inc.; Columbus, OH, EEUU), introduciendo a los animales en una caja de metacrilato con sensores, que detectan la actividad horizontal del animal (HACTV, exploración espontánea) y la actividad vertical (VACTV, compromiso de las extremidades inferiores) como el número de interrupciones del haz del láser del sensor, durante dos ciclos consecutivos de 5 minutos cada uno. Los resultados se analizaron con el software Digiscan.

El porcentaje de deficiencias motoras se calculó comparando la actividad motora registrada antes y después del tratamiento de cada animal y se analizó en relación al grado de afectación motora del animal infectado con el virus de Theiler y tratado con vehículo.

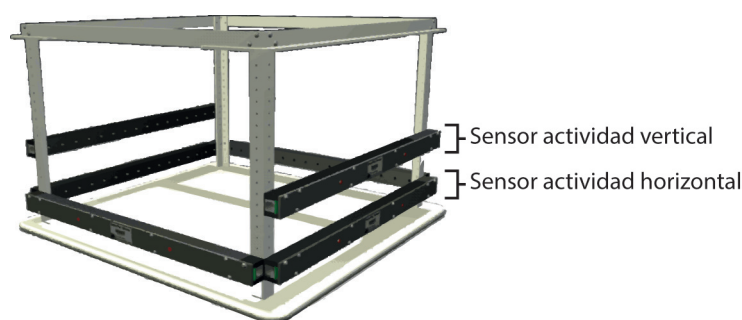


Figura 14 Esquema del actímetro y localización de los sensores en la caja.

2.2.2 Modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Para el desarrollo del modelo de EAE se utilizó MOG₃₅₋₅₅, 300 µg/ratón en PBS (100 µl/ratón), y 800 µg/ratón de Mycobacterium tuberculosis H37 RA en adyuvante incompleto de Freund (100 µl/ratón). El eppendorf que contenía la mezcla de Mycobacterium y adyuvante incompleto de Freund se sonicó con ultrasonido para disolverlo mejor, y se traspasó a un tubo de cristal. A continuación, se añadió gota a gota la MOG₃₅₋₅₅, agitando con vortex en todo momento para conseguir una mezcla bien emulsionada. De esta suspensión se inyectó subcutáneamente 200 µl a cada ratón, en el flanco de la pata, previamente anestesiados mediante inhalación de Isoflurano. Finalizada la inmunización, se inyectó i.p. la toxina pertúsica para amplificar la respuesta inmune (200 ng/100 µl de PBS por ratón). A las 48 horas post-inmunización se volvió a inyectar la toxina. Los animales CFA fueron inoculados con la misma emulsión que los demás grupos inmunizados, pero sin MOG, y no recibieron la toxina pertúsica.

2.2.2.1 Diseño experimental

Una vez comenzada la sintomatología característica del modelo de EAE, evaluada mediante una puntuación clínica y correspondiente a los 6 días post-immunización (dpi), se dio comienzo al tratamiento. Los ratones fueron tratados diariamente i.p. con el compuesto UCM03025 (5 mg/kg) o el vehículo (DMSO/PBS), según el grupo correspondiente y durante 21 días hasta el día 27 dpi en el que se procedió a su sacrificio (Figura 15). Se utilizaron 5-6 animales por grupo.

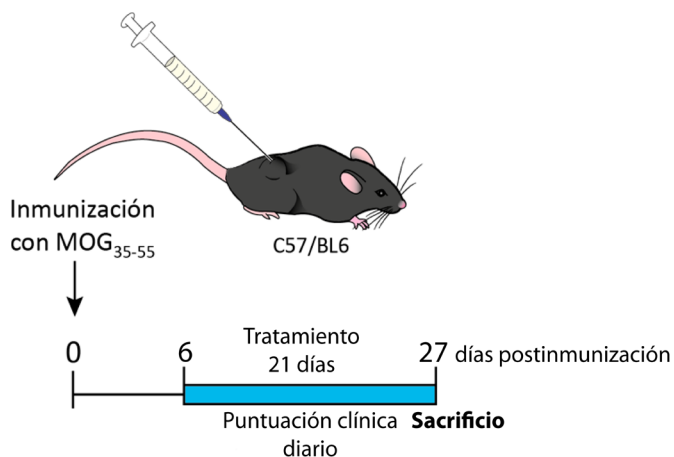


Figura 15. Diseño experimental en el modelo de EAE.

2.2.2.2 Evaluación de la función motora (puntuación clínica)

Los déficits neurológicos de los ratones se examinaron diariamente mediante una escala clínica que permitía la valoración de una parálisis creciente (Figura 16). Se otorgaron las siguientes puntuaciones:

- 0 - No evidencias clínicas neurológicas.
- 1 - Parálisis total de la cola.
- 2 - Paraparesia trasera leve.
- 3 - Parálisis total de una de las extremidades posteriores.
- 4 - Parálisis total de ambas extremidades posteriores.
- 5 - Muerte o criterio de punto final.

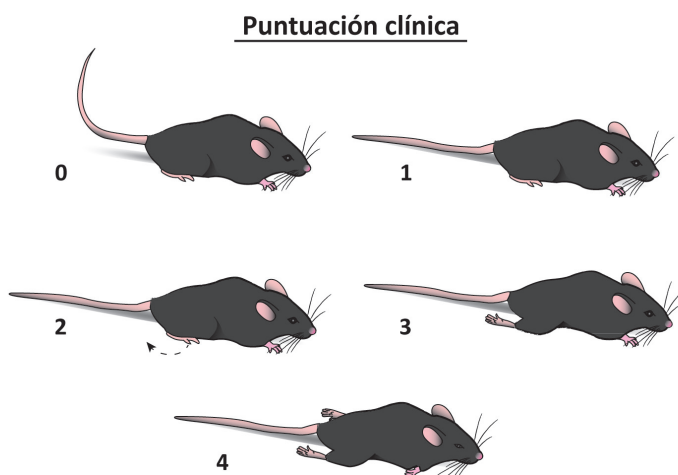


Figura 16. Imágenes representativas de los signos clínicos y su correspondiente puntuación de los ratones EAE.

2.3 CIRUGÍA E IMPLANTACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE CATÉTERES Y MINI-BOMBAS OSMÓTICAS PARA LA LIBERACIÓN DE 2-AG

Con el fin de determinar el efecto directo de la administración de 2-AG en cerebro, se utilizó, en animales infectados con el virus de Theiler, un kit de infusión cerebral (tubo de polícloruro de vinilo unido a una cánula de infusión de 4 cm de tubo, calibre 28, y jeringa larga de 5mm) junto con minibombas osmóticas del modelo 1002 de la casa comercial Alzet (Cupertino, CA, USA), de liberación continua 0.25 $\mu\text{l/h}$ y capacidad de volumen total de 101 μl por bomba (Figura 17). Una vez comenzados los síntomas motores asociados al modelo de TMEV, se anestesió a los ratones mediante inhalación de Isoflurano, se colocaron en un soporte estereotáxico y se procedió a la implantación de la cánula y las bombas osmóticas. El catéter fue introducido en el ventrículo lateral derecho según las siguientes coordenadas (AP: -0,6; ML:1; DV:1,8) y se aseguró con pegamento. Las bombas osmóticas que contenían 2-AG (5 mg/kg) o el vehículo de las bombas (DMSO/Etanol/PBS) fueron implantadas de manera subcutánea en el lomo de los ratones Sham o infectados con el virus de Theiler y conectadas al catéter directo al ventrículo. Las bombas liberaron 2-AG o vehículo de manera continua durante 10 días, desde los 75 dpi hasta los 85 dpi momento en el que se procedió al sacrificio de los ratones. En el caso de los animales que se mantuvieron hasta los 105 dpi se retiró la bomba osmótica una vez finalizado el tratamiento a los 85 dpi.

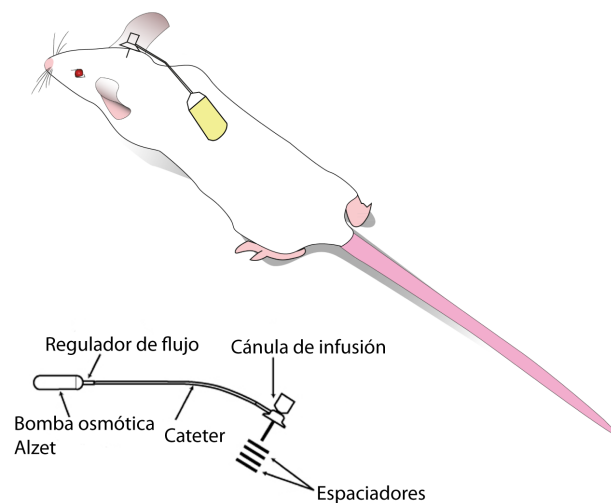


Figura 17 Esquema del sistema de infusión y bombas osmóticas

2.4 TRAZADOR ANTERÓGRADO BDA

Aquellos ratones tratados desde los 75 dpi hasta los 85 dpi y que fueron mantenidos hasta los 105 dpi, se anestesiaron con isoflurano 15 días antes de su sacrificio y se colocaron en un soporte estereotáxico para inyectarles de manera bilateral el trazador de alta resolución anterógrado BDA (10.000 MW dextrano amino biotililado: Molecular Probes, Eugene, OR) administrando 1,2 μ l de un 10% de solución de BDA diluida en PBS. Como muestra la Figura 18, el trazador se inyectó en ambas cortezas motoras con una aguja Hamilton de 5 μ l profundizando 1mm en la corteza (4 inyecciones, 0,3 μ l por inyección) en un perímetro definido coronalmente por Bregma (1,7mm a -0,7mm y 0,5mm a 1,5mm) desde la sutura Sagital. Tras la inoculación del trazador, se mantuvo la aguja durante 3-5 min antes de su retirada lentamente (Rolls, Shechter et al. 2008).

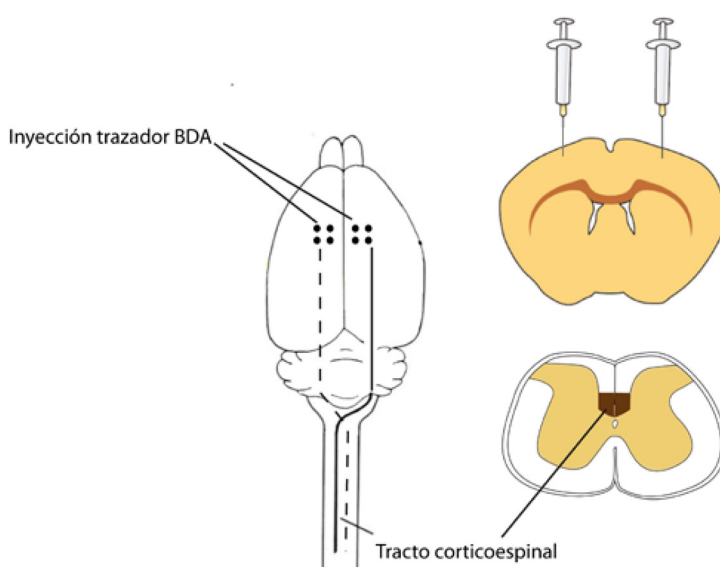


Figura 18. Esquema de la inyección del trazador anterógrado BDA y zona de análisis en médula espinal.

2.5 ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

2.5.1 Procesado del tejido

Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg). Se perfundieron transcardíacamente con salino 0,9%, y a continuación, se extrajeron las médulas espinales por extrusión con salino. Parte de la sección cervical de la médula espinal fue congelada inmediatamente y guardada a -80 °C para su posterior utilización para el aná-

lisis de western-blot y RT-PCR. La sección cervical restante se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 0,1 M a 4°C en agitación durante toda la noche. Posteriormente, se crioprotegió con soluciones crecientes de sacarosa (15% y 30%) diluida en PBS 0,1 M y se congeló a -80 °C hasta su posterior utilización. Secciones de 30 µm de grosor fueron obtenidas mediante criostato tras embeber el tejido en resina O.C.T. y fueron almacenadas a -20 °C en una solución crioprotectora, hasta su utilización.

En el caso del análisis del trazador anterógrado BDA, la médula espinal cervical fue embebida en Agar (Conda, Madrid, España) tras ser fijada en PFA 4% a 4°C en agitación durante toda la noche y se obtuvieron secciones de 50 µm de grosor mediante el vibratomo Leica VT1000S.

2.5.2 Inmunohistoquímica

2.5.2.1. Marcaje con inmunofluorescencia

Las secciones cervicales de las médulas espinales (30 µm de grosor) en flotación se lavaron 3 veces durante 10 minutos, con PB 0,1 M. Se permeabilizó el tejido con 3 lavados de 10 minutos con PBT (PB 0,1 M + 0,1% Tritón X-100). Para evitar uniones inespecíficas, se bloquearon con PBT + 5% de suero animal, y se incubaron con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras dicha incubación, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBT, y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente. Una vez finalizado este paso, se procedió a lavar 3 veces durante 10 minutos con PB 0,1 M y se incubaron con DAPI durante 10 minutos. Para finalizar, los cortes se volvieron a lavar con PB y fueron montados sobre portaobjetos con una solución 1:1 de glicerol y PB 0,1 M, o Mowiol.

2.5.2.2. Marcaje con diaminobenzidina (DAB)

Las secciones cervicales en flotación de las médulas espinales (30 µm) se lavaron 3 veces durante 10 minutos, con PB 0,1 M. A continuación, se procedió a inhibir la peroxidasa endógena durante 1 hora con una solución de 50 % metanol y 1,66 % H₂O₂ en PB 0,1 M, a temperatura ambiente y en oscuridad. Se permeabilizó el tejido con 3 lavados de 10 minutos con PBT, y posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas con el tampón de bloqueo (PBT + 5 % de suero animal). Una vez finalizado este paso, se incubaron con el anticuerpo pri-

mario en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras dicha incubación, las secciones se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBT para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a biotina y diluido en tampón de bloqueo. A continuación, se procedió a lavar 3 veces durante 10 minutos con PBT, y a incubar el tejido con avidina-peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad. Se repitieron los 3 lavados de 10 minutos cada uno con PB 0,1 M y se procedió con el revelado con DAB (diaminobenzidina al 0,025 % y H₂O₂ al 0,003 % en PB 0,1 M). Se lavaron las secciones 3 veces durante 10 minutos con PB 0,1 M y se montó el tejido sobre portaobjetos gelatinizados al 2 %. Una vez secados a temperatura ambiente, se procedió a deshidratar el tejido, sometiéndolo a pases de alcohol crecientes (70 %, 96 %, 100 % por duplicado) y por xileno (por duplicado), durante 10 minutos por solución. Finalmente, se cubrieron los cortes de los portaobjetos con DePeX[®] y se colocó el cubreobjetos.

Para el análisis histológico del trazador anterógrado BDA se utilizó un anticuerpo conjugado a la avidina-peroxidasa junto con el cromógeno DAB.

En todos los casos la especificidad de los anticuerpos fue confirmada omitiendo el anticuerpo primario.

2.5.2.3 Hematoxilina/Eosina

Para las tinciones de H/E, se montaron las secciones de 30 µm de grosor en portaobjetos (previamente gelatinizados al 2 %), y se dejaron secar toda la noche. A continuación, se sumergieron los portaobjetos en hematoxilina durante 3 minutos. Una vez pasado este tiempo, se realizó un lavado con agua para eliminar el exceso de hematoxilina, y se sumergieron los portaobjetos en eosina al 1 % durante 1,5 minutos. Al igual que antes, se procedió a lavar con agua destilada durante 30 segundos. Una vez teñidos los cortes, se sometió a los portaobjetos a pases en un gradiente creciente de alcoholes: 70 %, 96 %, 100 % (2 veces) y xileno (2 veces), durante 10 minutos cada uno para deshidratarlos. Finalmente, se cubrieron con DePeX[®] y los cubreobjetos y se dejaron secar.

2.5.2.4 Evaluación de la infiltración celular

Se cuantificó la cantidad de infiltrados celulares en médula espinal mediante la tinción

con H/E. El criterio de cuantificación de la infiltración seguido fue el siguiente (Figura 19):

- 0 - Sin evidencias de infiltrados celulares.
- 1 – Infiltrados sólo en meninges.
- 2 - Número reducido de infiltrados celulares en pa-rénquima.
- 3 - Infiltración moderada en sustancia blanca.
- 4 - Infiltración severa en sustancia blanca.

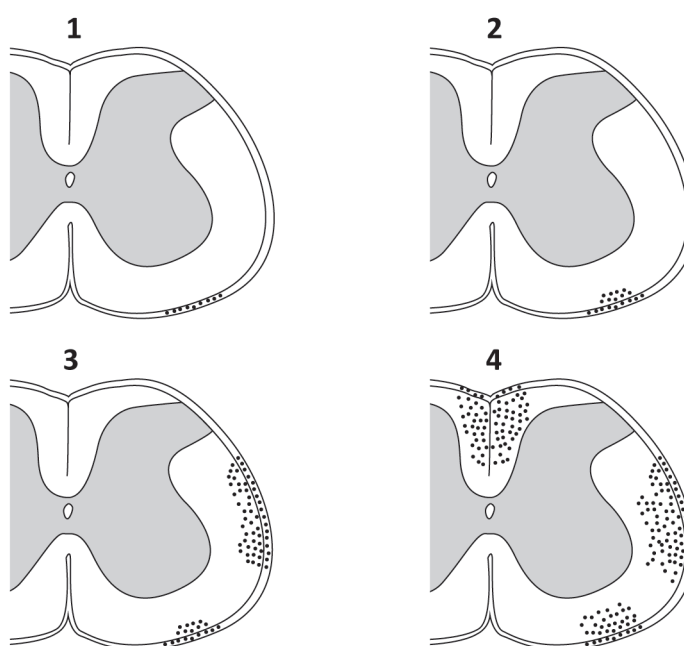


Figura 19. Esquema del criterio de evaluación utilizado para determinar el grado de infiltración celular.

2.5.2.5 Marcaje de Luxol Fast Blue (LFB)

Las secciones torácico-lumbares en flotación de las médulas espinales (15 μm de grosor) se lavaron tres veces durante 10 minutos con PB 0,1 M. Las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol, de 70 % a 95 %, y se incubaron en la solución de LFB durante una noche a 56 $^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, el exceso de tinción se eliminó utilizando etanol

al 95 %, y las secciones se diferenciaron en una solución de carbonato de litio durante 30 segundos. Las secciones se deshidrataron, se aclararon con xileno, se montaron con DePeX® y se colocaron los cubreobjetos.

2.6. MICROSCOPIA

2.6.1 Microscopía óptica y análisis de imagen

Para la adquisición de las imágenes de tinciones con DAB, así como para aquellas teñidas con Hematoxilina/Eosina, se utilizó un microscopio Zeiss acoplado a un sistema de captura de imágenes Nikon de alta resolución. Para el análisis, se utilizaron entre cinco y seis secciones de médula espinal cervical de 5-6 animales por grupo. Para la cuantificación del marcaje se usó el software de análisis de imagen ImageJ (NIH; Bethesda, MD, EEUU), manteniendo el mismo umbral de intensidad para todas las imágenes del mismo experimento. El resultado se expresa como porcentaje del área total marcada.

2.6.2 Microscopía confocal y análisis de imagen

En el caso de las imágenes obtenidas de tinciones con fluorescencia, se analizaron entre cinco y seis secciones de médula espinal cervical por animal, de 5-6 ratones por grupo experimental. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS SP5. El área marcada fue cuantificada con el software de análisis de imagen ImageJ (NIH; Bethesda, MD, EEUU), manteniendo el mismo umbral de intensidad para todas las imágenes del mismo experimento. El resultado se expresa como porcentaje del área total marcada. La cuantificación del número de células marcadas por fluorescencia se evaluó por mm² del asta ventral de la sustancia blanca de la médula espinal cervical.

2.6.3 Microscopía electrónica

2.6.3.1 Procesamiento del tejido para análisis mediante microscopía electrónica de transmisión

Los ratones infectados con el virus de Theiler y sacrificados a los 105 dpi fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con ketamina/xilacina (80/10 mg/kg) y perfundidos transcardíacamente a temperatura ambiente (20-25 °C) con PBS durante 20 segundos seguido

de una solución de fijación con un 4% de PFA, 0,2% ácido pícrico y 0,1 % de glutaraldehído en tampón fosfato durante 10-15 minutos. A continuación, se sacó la médula espinal de los ratones y se postfijó en la misma solución de fijado durante una semana a 4 °C siendo guardadas a 4 °C hasta su posterior utilización.

Las secciones de médula espinal cervical se cortaron en vibrátomo con un grosor de 50 μm y se guardaron en PBS a temperatura ambiente. Las secciones se osmificaron en una solución del 1 % de tetróxido de osmio en PBS durante 20 minutos y se deshidrataron en concentraciones graduales de alcoholes hasta óxido de propileno y fueron embebidas en resina Epon 812. Secciones ultrafinas de 50 nm se colocaron en mallas de níquel y se marcaron con 2,5% de citrato de plomo durante 20 minutos. Las secciones se examinaron mediante un microscopio electrónico Philips EM208S.

2.6.3.2. Análisis semicuantitativo de axones mediante TEM

La sustancia blanca de la médula espinal cervical fue evaluada mediante una cámara digital Olympus SIS Morada acoplada al microscopio electrónico Philips EM208S. Se analizaron 1000 axones del asta ventral de la sustancia blanca de la médula espinal de animales Sham o infectados con el virus de Theiler tratados o no con el compuesto UCM03025 (dos animales por grupo). El número de axones desmielinizados y mielinizados fue cuantificado y se calculó el g-ratio de los axones mielinizados. El g-ratio se define como el radio entre el diámetro del axón y el diámetro del axón más la unidad de mielina. Los axones con mielina bien preservada y compacta fueron analizados mediante Image-J (1.43u versión; NIH, USA) dibujando dos diámetros perpendiculares de cada axón y del axón junto con la mielina.

2.7. TÉCNICA DE INMUNODETECCIÓN POR SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS (WESTERN-BLOT)

Para la extracción de la proteína de los astrocitos en cultivo, las células se despegaron de las placas de cultivos con 30 μl de tampón de lisis RIPA e inhibidores de proteasas y se pasaron a un tubo Eppendorf. En el caso de la extracción de la proteína de la médula espinal cervical de los animales infectados con el virus de Theiler, el tejido fue sonificado en 500 μl de tampón de lisis RIPA con inhibidores de proteasas. Tras sonificar las muestras, se centrifugaron durante 15

minutos a 13.500 rpm a 4 °C para obtener el extracto de proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó mediante la reacción de Bradford. Posteriormente, a cada muestra se le añadió tampón de carga Laemli 5X y fueron hervidas durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, 30 µg de proteína se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida al 10 ó 12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (90 V durante 70 minutos).

En el caso de la detección de los CSPGs, las muestras una vez sonicadas y centrifugadas se resuspendieron en tampón de Condroitinasa y se trataron con la enzima proteasa Condroitinasa ABC de la bacteria *Proteus vulgaris* a una concentración de 0,1U/ml durante 3h a 37 °C. La reacción se paró con 5X del tampón de carga Laemli y fueron hervidas durante 5 minutos. 15 µg de proteína fueron separadas electroforéticamente en geles de acrilamida al 6% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBS (solución de Tris Base 25 mM y NaCl 137 mM), y se permeabilizaron con 3 lavados de 10 minutos con TBST (TBS + Tween-20 al 10 %). Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas con tampón de bloqueo (5 % de leche desnatada) durante 1-2 horas. A continuación, se incubaron las membranas durante la noche a 4 oC con el anticuerpo primario en solución de bloqueo. Tras realizar 3 lavados durante 10 minutos con TBST, se procedió a la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano y diluido en tampón de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas y la inmunodetección de las proteínas de estudio se realizó mediante reve-lado por quimioluminiscencia (con una solución de luminol y ácido p-cumárico). Las membranas que iban a ser reutilizadas con otros anticuerpos fueron sometidas a un proceso de stripping leve con un tampón de pH 6,8 que contenía glicina, SDS, Tween-20 y agua destilada. Por último, la señal se cuantificó por densitometría mediante un escáner GS-800 de BioRad.

En el caso del uso de anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos se utilizó la solución de bloqueo de LI-COR durante 1 hora para la detección de señal mediante Odyssey. Para el proceso de stripping se utilizó el reactivo NewBlot IR Stripping (LI-COR), durante 30 minutos a temperatura ambiente y para visualizar y cuantificar la señal se utilizó el escáner Odyssey®

CLx Imaging System.

2.8 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA (qPCR)

2.8.1 Extracción del ARN

La extracción de ARN de la médula cervical espinal de los animales infectados con el virus de Theiler se llevó a cabo homogeneizando el tejido con QIAzol (QIAGEN, Reino Unido) y usando el protocolo de extracción de ARN utilizando cloroformo y etanol.

El ARN tanto del tejido homogeneizado como de astrocitos primarios en cultivo se extrajo utilizando el kit de columnas RNeasy (QIAGEN, Reino Unido), eliminando la posible contaminación de ADN degradado con el tratamiento con DNasa I (QIAGEN, Reino Unido). La concentración de ARN y su pureza fueron valorados por las medidas de A260/A280 realizadas con un espectrofotómetro Nanodrop® (Nanodrop Technologies, EEUU).

2.8.2 Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Se usó 1 µg de ARN total, que fue retrotranscrito a ADNc mediante el kit de Transcripción Reversa de Promega (Promega, España) y utilizando secuencias poly-dT. Las secuencias de los cebadores (primers) se detallan en la Tabla 1. La expresión de los genes de estudio por PCR en tiempo real fue detectada usando SYBR Green (Applied Biosystems, Reino Unido), utilizando 1 µl de ADNc y con los primers en una concentración final de 200 nM. Las condiciones de los ciclos de la PCR consistieron en un paso inicial de activación a 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos seguidos de periodos de alineamiento y extensión a 60 °C durante 1 minuto. Estos ensayos de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Reino Unido). Cada muestra se analizó en triplicado y la expresión génica se calculó usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y la expresión relativa se obtuvo calculando el ratio entre los valores obtenidos de cada gen y aquellos del gen control interno. Los resultados están expresados como el porcentaje de expresión respecto a los animales Sham.

2.9 CULTIVOS CELULARES

Para el desarrollo de los cultivos primarios se utilizaron ratas Wistar postnatales de 0 a 2

días de edad criadas en el animalario del Instituto Cajal (CSIC).

2.9.1 Cultivo primario mixto

Los cultivos primarios mixtos fueron preparados a partir de encéfalos de ratas P0-P2, desechando los bulbos olfativos y el cerebelo, siguiendo las modificaciones que Molina-Holgado y cols. (Molina-Holgado, Vela et al. 2002) y (Mecha, Iñigo et al. 2011) realizaron del protocolo de (McCarthy and de Vellis 1980).

Una vez extraído, el encéfalo se colocó en DMEM frío, y se retiraron las meninges y vasos sanguíneos asociados a ellas. Los encéfalos fueron disgregados mecánicamente con una pipeta Pasteur previamente recubierta con medio, filtrado con una malla de 150 μm de tamaño de poro y las células resultantes fueron resuspendidas en DMEM con 10 % de suero de caballo (HS, del inglés horse serum), 10 % de suero fetal bovino (FBS, del inglés fetal bovine serum) y 1% de penicilina/estreptomicina (DMEM 10:10:1), y sembradas en frascos de 75 cm^2 (previamente cubiertos con poli-D-lisina, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los frascos se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ en condiciones controladas de humedad y 5% de CO_2 .

Tras 7-10 días, se observó una estratificación de células. En el fondo, una monocapa confluyente de astrocitos, sobre la que se situaban las células O2A (del inglés Oligodendrocyte-type 2 astrocyte), adheridas a ellos. Estas células O2A pueden diferenciarse a oligodendrocitos o a astrocitos tipo 2, dependiendo del medio de cultivo. Las células microgliales poseen una adherencia débil a la monocapa de astrocitos y también pueden estar en suspensión en el medio de cultivo.

2.9.2 Cultivo primario de astrocitos a partir del cultivo mixto

Pasados 7-10 días, el cultivo fue agitado a 230 rpm durante 3 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ para levantar las células microgliales y fueron descartadas mediante aspiración. Tras reponer el medio de cultivo (DMEM 10 % FBS, 10 % HS, 1 % P/S), se mantuvieron las células en agitación durante toda la noche a 280 rpm a 37 $^{\circ}\text{C}$ con el fin de separar los oligodendrocitos de los astrocitos. Una vez descartados los oligodendrocitos por aspiración, se obtuvieron los astrocitos al ser tratados con tripsina (0,05 %) /EDTA (0,02 %) durante 3 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Pasado ese tiempo se agitó enérgicamente el frasco con el fin de levantar los astrocitos y se añadió medio con

suero para inactivar la enzima tripsina. Los astrocitos se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/cm² en el caso de los ensayos para extracción proteica y 5×10^4 células/cm² para inmunocitoquímica, en medio DMEM 5 % FBS, 5 % HS, 1% P/S sobre placas tratadas con 0,1% Poli-D-lisina y lavadas con agua Mili-Q. Transcurridas 3 horas se cambió el medio de cultivo a un medio enriquecido en AraC (10 μ M) y pasadas 72h se realizaron los ensayos correspondientes. En todos los casos, una hora antes de la administración de cualquier tratamiento, las células fueron sometidas a un medio libre de suero.

2.10. ENZIMOINMUNOENSAYO EN FASE SÓLIDA (ELISA)

Para la determinación del proteoglicano Neurocán, se guardaron a -80 °C los sobrenadantes de los cultivos de astrocitos tras 24 horas del tratamiento correspondiente. Se utilizó el kit comercial de detección de Neurocán (MBS 450382 My Biosource), siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar, se añadió a la placa de ELISA 100 μ l de las diluciones estándar y de las muestras y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el líquido de los pocillos y sin lavar se añadió 100 μ l del buffer de detección A incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras aspirar el volumen se procedió a lavar 3 veces con 300 μ l de solución de lavado y se añadió 100 μ l del buffer de detección B incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se aspiró y lavó cada pocillo hasta 5 veces y se añadió 50 μ l de la solución de sustrato incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras añadir 50 μ l de la solución stop para detener la reacción, se procedió a obtener las mediciones de densidad óptica de cada pocillo en el Multiscan a una absorbancia de 450 nm. La sensibilidad del kit de Neurocán fue de 0,055 ng/ml, el rango de detección 0,156-10 ng/ml y los coeficientes de variabilidad (CV) intra-ensayo e inter-ensayo fueron 10 % y 12 %, respectivamente.

2.11. CUANTIFICACIÓN DE 2-AG EN TEJIDO (HPLC UNIDO A ESPECTROSCOPIA DE MASAS LC-MS)

El tejido se pesó y se disgregó en hielo con un homogeneizador en un volumen de 2:2:1 de cloroformo/metanol/Tris HCl 50 Mm (pH 7,5), 2ml por cada 80-120 mg de tejido. Se utilizó un estándar de d8-2AG (200 pmol o 400 pmol) para realizar el ensayo. Se separó la fracción orgánica de la acuosa mediante centrifugación (6000g, 2 minutos) y la fracción orgánica se

pasó a un tubo nuevo y se dejó secar y evaporar. A continuación, se reconstituyó en 50 μ l de acetonitrilo y se analizó mediante HPLC acoplada a espectroscopía de masas (LC-MS). La espectroscopía de masas se llevó a cabo usando el sistema Agilent 1200LC-MSD VL.

La separación LC se realizó usando una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm x 50 mm). El gradiente de elución de la fase móvil consistía en A (95:5 agua: acetonitrilo) y B (95:5 acetonitrilo: agua), con un 0,1% de ácido fórmico como modificador del solvente. El gradiente (tasa de flujo de 0,5 mL/min) comenzó a 0% B (durante 5 minutos) y aumentó de manera lineal hasta 100% B durante 45 minutos y descendió a 0%B durante 10 minutos antes de equilibrarse durante 5 minutos con un gradiente isocrático de 0%B.

El análisis de MS se realizó usando una fuente de ionización de electrospray. El voltaje del capilar se estableció en 3.0 kV, y el voltaje de fragmentación en 70 V. La temperatura del gas de secado fue de 350 oC con una velocidad de flujo de 10 L/min, y la presión del nebulizador fue de 20 psi. El análisis de LC-MS se realizó mediante la monitorización de iones selectivos en modo positivo. Las fracciones se cuantificaron midiendo el área bajo el pico y normalizándolo al estándar. Los niveles absolutos de 2-AG se estimaron en comparación con el estándar deuterizado.

2.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se representan como la media aritmética \pm error estándar de la media (SEM, del inglés Standard error of the mean) salvo los referidos a la puntuación clínica en el modelo de EAE que se representan como la media aritmética \pm desviación estándar de la media (DEM). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 24 (SPSS Inc-IBM; Chicago, IL, EEUU). Para hacer comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba paramétrica t de Student, y si la comparación era de más de dos grupos, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con las pruebas a posteriori de Bonferroni o Tuckey. En aquellos casos en los que la prueba de homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene) fue significativa (menor de 0,05), se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de una comparación por parejas con el test de U de Mann-Whitney. Para el análisis de las diferencias entre los g-ratios evaluados mediante microscopía electrónica se utilizó un Kruskal-Wallis ANOVA de una vía y las comparaciones múltiples fueron analizadas siguiendo el método de Dunn.

IV. RESULTADOS

PARTE 1. FISIOPATOLOGÍA Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE CSPGs EN LA FASE CRÓNICA DEL MODELO DE TMEV-IDD.

1.1 Fisiopatología de la encefalomielitis murina desmielinizante por infección con el virus de Theiler.

El modelo murino de EM por infección con el virus de Theiler modeliza la variante primaria progresiva de la enfermedad y presenta una patogenia similar a la que subyace en la EM. En dicho modelo, los ratones infectados desarrollan una patología crónica desmielinizante cuyos síntomas clínicos de disfunción motora comienzan entre los días 60-80 post-infección.

Con el objetivo de valorar esos déficits motores, ratones hembra SJL/J fueron infectados intracranalmente con la cepa DA del virus de Theiler y se procedió a su valoración motora en la fase crónica de la enfermedad mediante la caja de actividad. Como se observa en la Figura 20, los animales infectados con el virus de Theiler presentaron déficits motores significativos, en comparación con los animales control o Sham, en la fase crónica del modelo, a los 85 dpi, evidenciados mediante la actividad horizontal (A) y la actividad vertical (B).

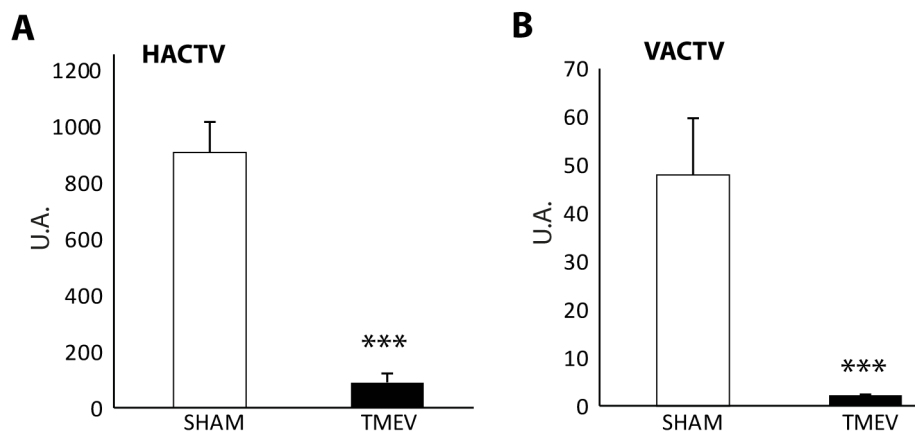


Figura 20. Evaluación de la función motora mediante el test de la caja de actividad en la fase crónica de ratones TMEV-IDD. La inoculación intracerebral con el virus de Theiler genera, en ratones de la cepa susceptible SJL/J déficits motores a los 85 dpi, mostrados mediante (A) disminución de la actividad horizontal y (B) disminución de la actividad vertical. *** $p \leq 0,001$ vs SHAM.

El componente inflamatorio es determinante en la EM, así como en sus modelos experimentales. En la fase crónica del modelo de TMEV-IDD se detectan infiltrados de células mononucleares, entre las que se incluyen monocitos, linfocitos T y linfocitos B en la sustancia blanca de la médula espinal coincidiendo con una activación de la microglía, como respuesta

de la inmunidad innata (Oleszak, Chang et al. 2004). Nos propusimos por tanto evaluar y confirmar la presencia de infiltrados inflamatorios, así como el perfil de activación de la microglía en nuestro modelo. Por último, se llevaron a cabo marcajes para mielina y axones para confirmar la presencia de desmielinización y daño axonal. Todos los análisis que se muestran a continuación fueron realizados en la médula espinal de los animales de estudio ya que es el área del SNC más afectada en las fases crónicas del modelo de TMEV. Como se observa en la Figura 21, el estudio histopatológico mostró infiltrados leucocitarios en la sustancia blanca de la médula espinal de los animales infectados (A), así como una fuerte reactividad microglial evaluada mediante el anticuerpo de Iba-1 (B). Del mismo modo se observaron focos de desmielinización y pérdida axonal analizados mediante marcadores de Neurofilamento-H (C) y marcadores para mielina (MBP) (D).

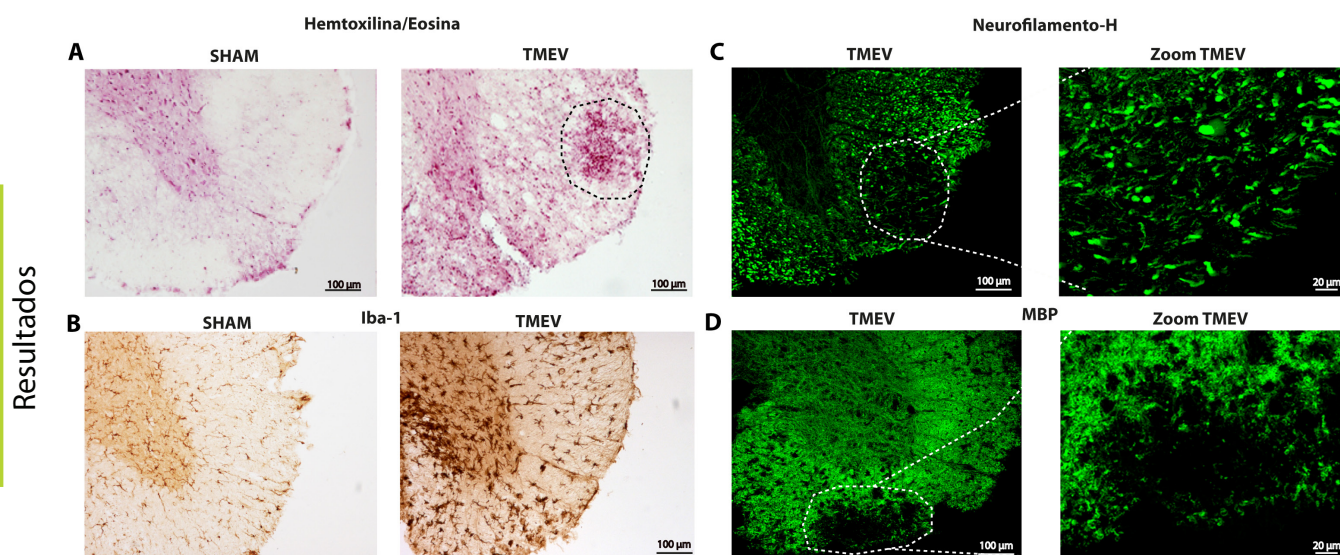


Figura 21. Estudio histopatológico de inflamación, pérdida axonal y desmielinización en la médula espinal en la fase crónica de los ratones TMEV-IDD. Microfotografías representativas de secciones transversales de médulas espinal cervical de animales infectados con el virus de Theiler donde se observa infiltración leucocitaria (A; Hematoxilina/eosina), reactividad microglial (B; inmunohistoquímica para Iba-1), pérdida axonal (C; Neurofilamento-H) y zonas desmielinizadas (D; evaluadas mediante el anticuerpo de MBP). Barra de calibración 100 y 20 μm .

1.2 Análisis de la expresión de CSPGs en médula espinal en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD.

Junto con la inflamación que acontece en el modelo de TMEV-IDD y en la EM, se producen procesos de desmielinización y daño axonal en las llamadas placas escleróticas. En estas zonas, se generan cicatrices gliales donde los CSPGs se acumulan generando un ambiente no permisivo que impide la regeneración axonal y la remielinización (Lau, Keough et al. 2012,

Siebert and Osterhout 2011). La astrogliá forma parte de la mencionada cicatriz glial y son las principales células responsables de la síntesis de los CSPGs en situación de daño (Susarla, Laing et al. 2011). Debido a la gran importancia generada en torno a estas moléculas que impiden los mecanismos de reparación, se llevaron a cabo marcajes, tanto a 85 como a 105 dpi, para evaluar astrogliosis (GFAP y Vimentina) (Karimi-Abdolrezaee and Billakanti 2012), así como un estudio de la expresión de los CSPGs mediante uso del anticuerpo CS-56, el cual detecta las cadenas GAGs de los CSPGs.

Como se observa en la Figura 22 A y B, el análisis inmunohistoquímico y su cuantificación en la médula espinal de los ratones infectados con el virus de Theiler, mostró una prominente astrogliosis que resultó significativa al analizar el área marcada para GFAP a los 85 dpi. De igual manera, el área marcada para Vimentina, marcaje característico de astrocitos reactivos, se encontró significativamente aumentada tanto a los 85 como a los 105 dpi. La astrogliosis descrita se acompañó de una acumulación de CSPGs analizados mediante el anticuerpo de CS-56, cuyo aumento fue significativo en ambos tiempos. Además, se observó que en aquellas zonas donde se producía una mayor expresión y acumulación de proteoglicanos, coincidían con focos de desmielinización, en donde la ausencia de marcaje de la proteína de mielina MBP era evidente (Figura 22A). Así mismo, los astrocitos reactivos marcados con el anticuerpo de Vimentina fueron positivos para el CS-56 confirmando que aquellos astrocitos reactivos expresaban CSPGs (Figura 22C).

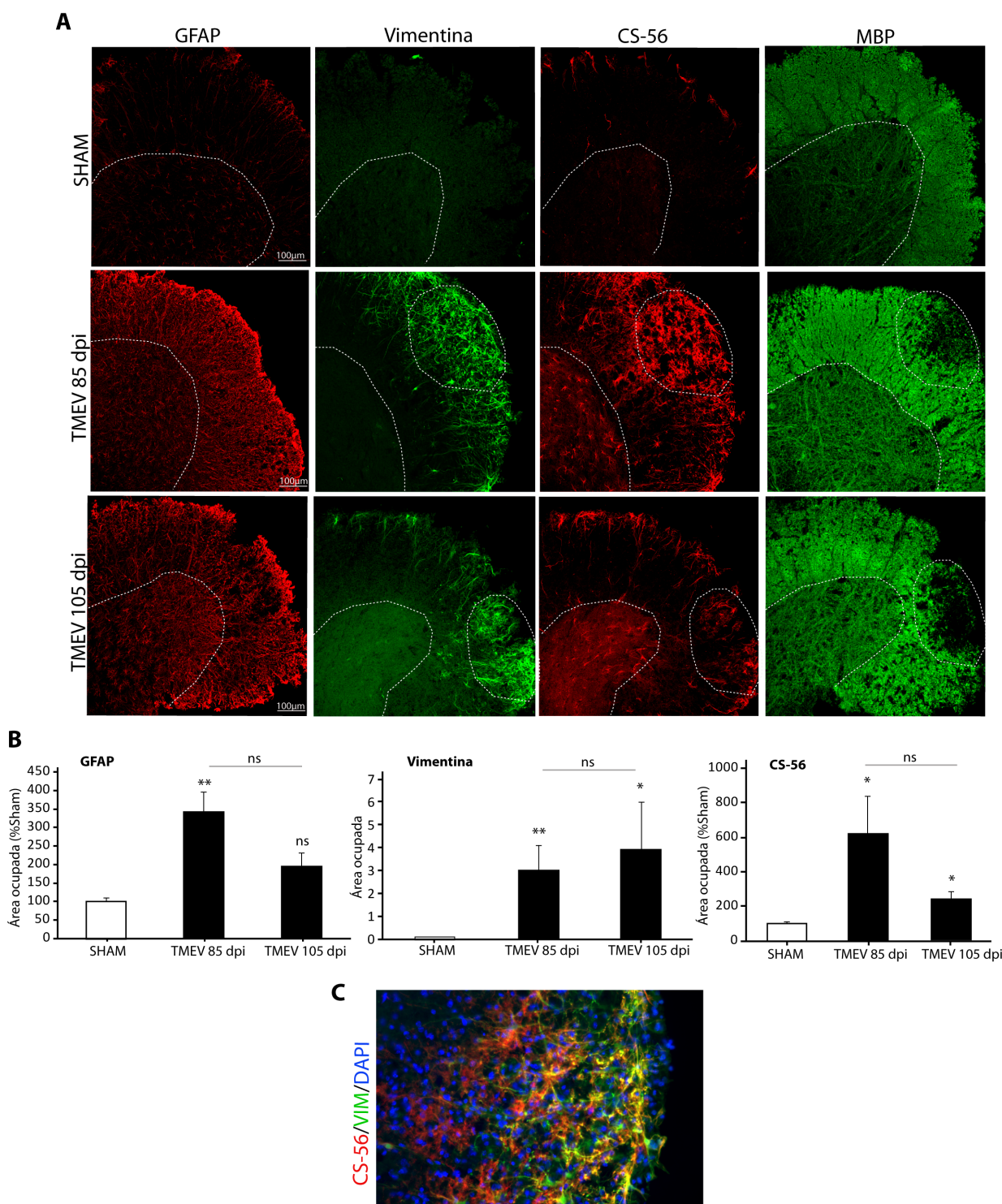


Figura 22. La astrogliosis que se observa en la médula espinal y en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD está asociada a una acumulación de CSPGs y a procesos de desmielinización. (A) Fotomicrográficas representativas de secciones transversales de médulas espinal cervical de 30µm de grosor donde se observan astrocitos marcados para GFAP, Vimentina y CS-56 y que muestran que la astrogliosis detectada coincide con depósitos de CSPGs en zonas desmielinizadas. (B) Cuantificación del área total marcada para GFAP, Vimentina y CS-56 donde se observa que hay un incremento de la reactividad astrogliosa, así como de la expresión de CSPGs marcados con el anticuerpo CS-56 en dos tiempos (85 y 105 dpi) de la fase crónica del modelo de TMEV-IDD en comparación con los ratones Sham. (C) Fotomicrografía representativa de la sustancia blanca de médula espinal cervical marcada para CS56 y Vimentina donde se observa que aquellos astrocitos reactivos Vimentina positivos expresan CSPGs. Los datos se representan como la media ± SEM: **p<0,01; *p<0,05 vs sham. Barra de calibración= 100 µm, 50µm. La línea punteada delimita la sustancia gris de la blanca de la médula espinal, así como las zonas desmielinizadas.

Se ha descrito que los CSPGs más abundantes dentro del SNC son el Neurocán y el Brevicán, de la familia de los lecitanos (Yamada, Watanabe et al. 1994). Además, existen otros CSPGs, entre los que se incluye el Fosfacán, proteoglicano no perteneciente a la mencionada familia. Para profundizar en el estudio de expresión de los CSPGs en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD, quisimos evaluar la expresión a nivel de ARN mensajero, así como el nivel proteico de los distintos proteoglicanos, Brevicán, Neurocán y Fosfacán, a los 85 y 105 dpi. Como se observa en la Figura 23A, la expresión relativa del ARN mensajero de los proteoglicanos Brevicán y Fosfacán estaba significativamente aumentada tanto a los 85 como a los 105 dpi, observándose un incremento en el caso del Neurocán únicamente a los 105 dpi. El análisis a nivel proteico de los diferentes CSPGs evaluados mediante la técnica de western-blot indicó que, si bien el análisis de manera individual de cada proteoglicano no resultó ser significativo, su análisis sumatorio alcanzó significancia estadística a los 85 dpi y no a los 105 dpi (Figura 23B).

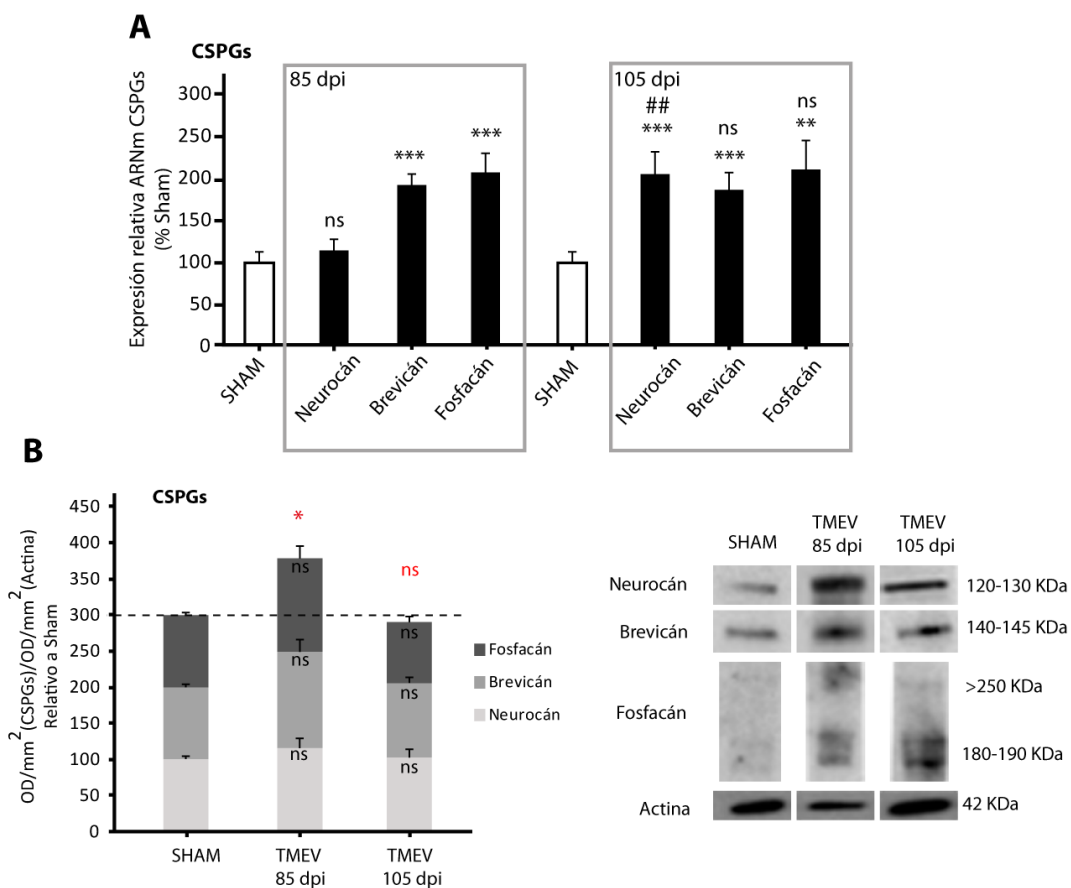


Figura 23. Análisis de la expresión de diferentes CSPGs en la médula espinal cervical y en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD. Análisis de (A) la expresión de ARN mensajero y (B) proteína de los CSPGs Neurocán, Brevicán y Fosfacán mediante RT-PCR y western-blot respectivamente a 85 y 105 dpi. Se observa un aumento de la expresión génica de Brevicán y Fosfacán tanto a 85dpi como a 105 dpi, incrementándose Neurocán únicamente a 105 dpi. Observamos aumento significativo de los CSPGs a nivel proteico cuando los evaluamos de manera conjunta. Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs sham. La significancia en color rojo señala en análisis de los CSPGs en conjunto. ns: no significativo.

Los astrocitos reactivos son los principales responsables de sintetizar Brevicán, Neurocán y Fosfacán en situación de daño, mientras que los macrófagos vasculares, así como la microglía reactiva y los OPCs aumentan la expresión de Versicán y NG2. Con el fin de identificar las células responsables de la síntesis de los CSPGs en nuestro modelo se llevaron a cabo dobles marcajes de CS-56 junto con GFAP e Iba-1. El resultado obtenido indicó que, a nivel de la sustancia blanca de la médula espinal cervical, las células positivas para el marcador de CSPGs (CS-56) fueron astrocitos GFAP⁺ resultando negativos para microglía (Iba1⁺) (Figura 24).

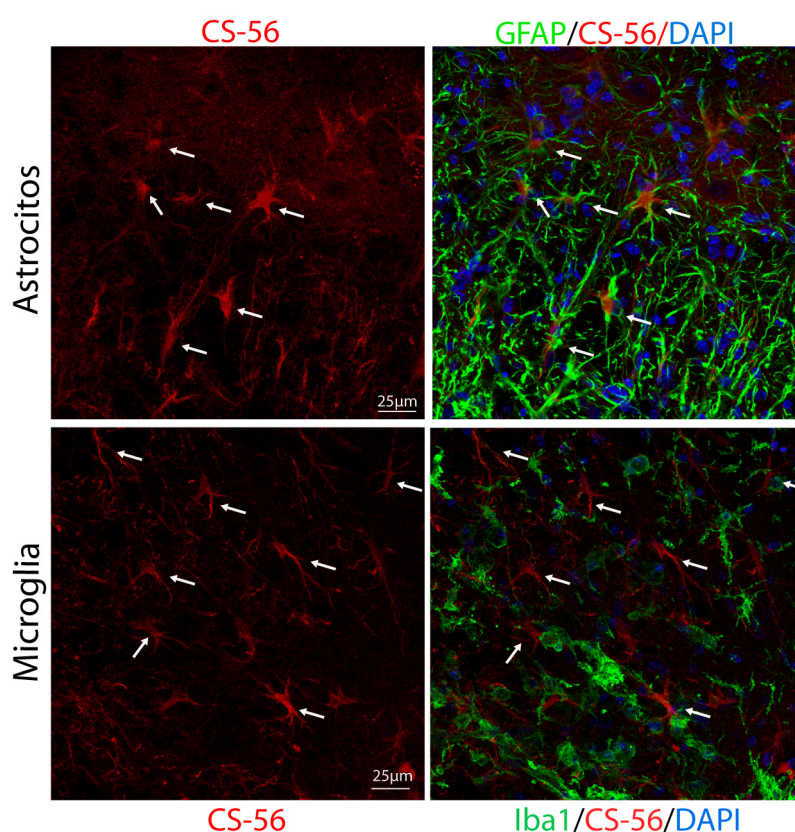


Figura 24. Las células que expresan CSPGs en la médula espinal de los ratones TMEV-IDD corresponden a **astrocitos y no a microglía**. Fotomicrográficas representativas de secciones transversales de médulas espinal cervical de 30µm de grosor donde se muestran astrocitos marcados para GFAP, positivos para el anticuerpo de CS-56 y microglía marcada con el anticuerpo de Iba-1 negativa para CS-56. Barra de calibración= 25µm.

RESUMEN PARTE 1:

Los animales susceptibles SJL/J infectados con el virus de Theiler presentaron déficits motores significativos en la fase crónica del modelo. Además, se observó infiltración leucocitaria a nivel de médula espinal, así como reactivación microglial y astrogial asociada a un aumento de expresión de CSPGs, en zonas desmielinizadas. Las células que colocalizaron con la expresión de CSPGs fueron astrocitos y no microglía.

PARTE 2. ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE CSPGs EN LA FASE CRÓNICA DEL MODELO DE TMEV-IDD.

Debido a que la alteración de la matriz extracelular y la acumulación de CSPGs en zonas de lesión impiden los procesos de regeneración (Dyck, Alizadeh et al. 2015), se han generado nuevos estudios para el desarrollo de terapias que disminuyan la síntesis y degraden los CSPGs para promover así los procesos de reparación y remielinización.

Han sido varios los métodos utilizados para reducir la expresión de CSPGs y/o degradar los ya liberados a la ECM en situaciones de daño. Los tratamientos locales con la enzima chondroitinasa ABC (Bradbury, Moon et al. 2002, Karimi-Abdolrezaee, Schut et al. 2012, Siebert and Osterhout 2011) o sistémicos con xilósido y fluorosamina han mostrado resultados significativos al reducir la acumulación de CSPGs en lesiones desmielinizadas, promoviendo la remielinización y la regeneración axonal en modelos de desmielinización por lisolecitina y cuprizona, así como en modelos de daño agudo en médula espinal y en el modelo de EAE (Keough, Rogers et al. 2016, Lau, Keough et al. 2012, Rolls, Shechter et al. 2008).

Con el fin de evaluar la relevancia de la producción de CSPGs en la sintomatología clínica asociada al modelo de TMEV-IDD, quisimos incidir en la ruta de síntesis de los mismos mediante la administración sistémica, en los animales infectados, de los compuestos xilósido y fluorosamina.

2.1 Inhibición farmacológica de la expresión de CSPGs por xilósido en el modelo de TMEV-IDD.

El glicósido 4-metilumbeliferil-beta-D-xilopiranosido o xilósido supone una herramienta de gran utilidad para comprobar el efecto inhibitorio de los CSPGs en los procesos de reparación y regeneración en situación de daño del SNC. Este compuesto impide la unión del grupo xiloso por parte de las enzimas xilosiltransferasas a la serina de la estructura proteica de los proteoglicanos, impidiendo así el primer paso de la síntesis y unión de las cadenas de condroitín sulfato al esqueleto proteico de los proteoglicanos y evitando como consecuencia su secreción a la ECM. Su administración se ha utilizado además para estudiar el papel de los CSPGs en el crecimiento axonal, tanto in vivo como in vitro (Zuo, Hernandez et al. 1998, Mendes, Onofre

et al. 2003).

Nos propusimos utilizar el xilósido como herramienta farmacológica para inhibir la síntesis de CSPGs en la fase crónica del modelo de TMEV y determinar así el papel de estas moléculas en la progresión de la enfermedad. Con este fin, tratamos a los animales infectados con el virus de Theiler con el compuesto xilósido (120 mg/kg) por vía i.p., en la fase crónica del modelo (75 dpi) durante 10 días. Finalizado el tratamiento, se procedió a la valoración motora de los ratones de experimentación mediante el test de la caja de actividad. Tal y como muestra la Figura 25, los déficits motores que se observaron en los animales infectados tratados con vehículo fueron significativamente revertidos en aquellos tratados con el inhibidor de la síntesis de CSPGs a los 85 dpi.

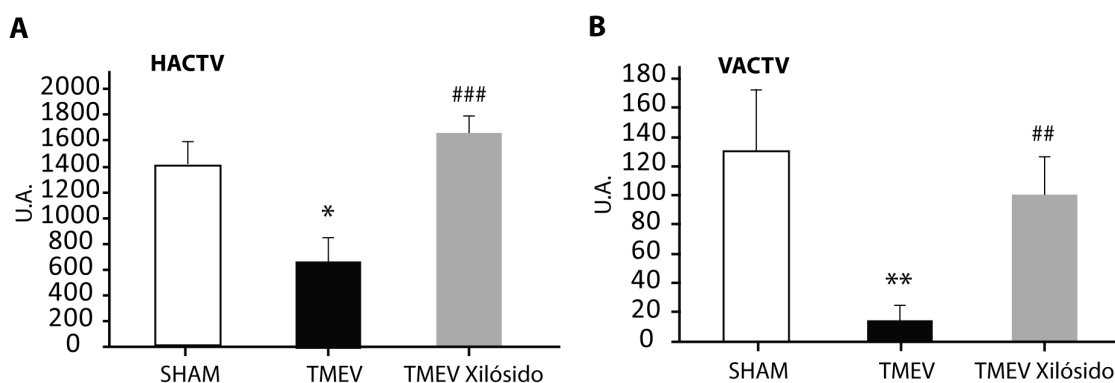


Figura 25. El tratamiento con xilósido en la fase crónica del TMEV-IDD mejora los déficits motores asociados al modelo. El análisis mediante el test de la caja de actividad muestra los déficits motores (A; actividad horizontal) (B; actividad vertical) que presentan aquellos animales infectados con el virus de Theiler en comparación con los animales Sham, así como la mejora significativa en aquellos tratados con xilósido a 85 dpi. Los datos se representan como la media \pm SEM: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs sham; ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ vs TMEV.

A continuación, quisimos valorar si el tratamiento con xilósido disminuía los niveles de CSPGs y la astrogliosis observada en el modelo a los 85 dpi. De esta manera y como muestra la Figura 26, tanto la astrogliosis, analizada por inmunohistoquímica mediante el marcaje con GFAP y Vimentina, como los CSPGs evaluados mediante el anticuerpo de CS-56, disminuyeron significativamente, a excepción del GFAP, en la médula espinal cervical de los animales infectados (Figura 26 A, B). Del mismo modo los niveles de los CSPGs Brevicán y Neurocán, analizados mediante la técnica de western-blot, estaban disminuidos en los animales que habían sido tratados con xilósido respecto a los que habían sido tratados con vehículo, no observándose ningún efecto significativo a nivel de Fosfacán. Además, el nivel de los tres proteoglicanos

analizados de manera sumatoria por western-blot, indicó una disminución significativa de los mismos en aquellos ratones que recibieron este compuesto (Figura 26C).

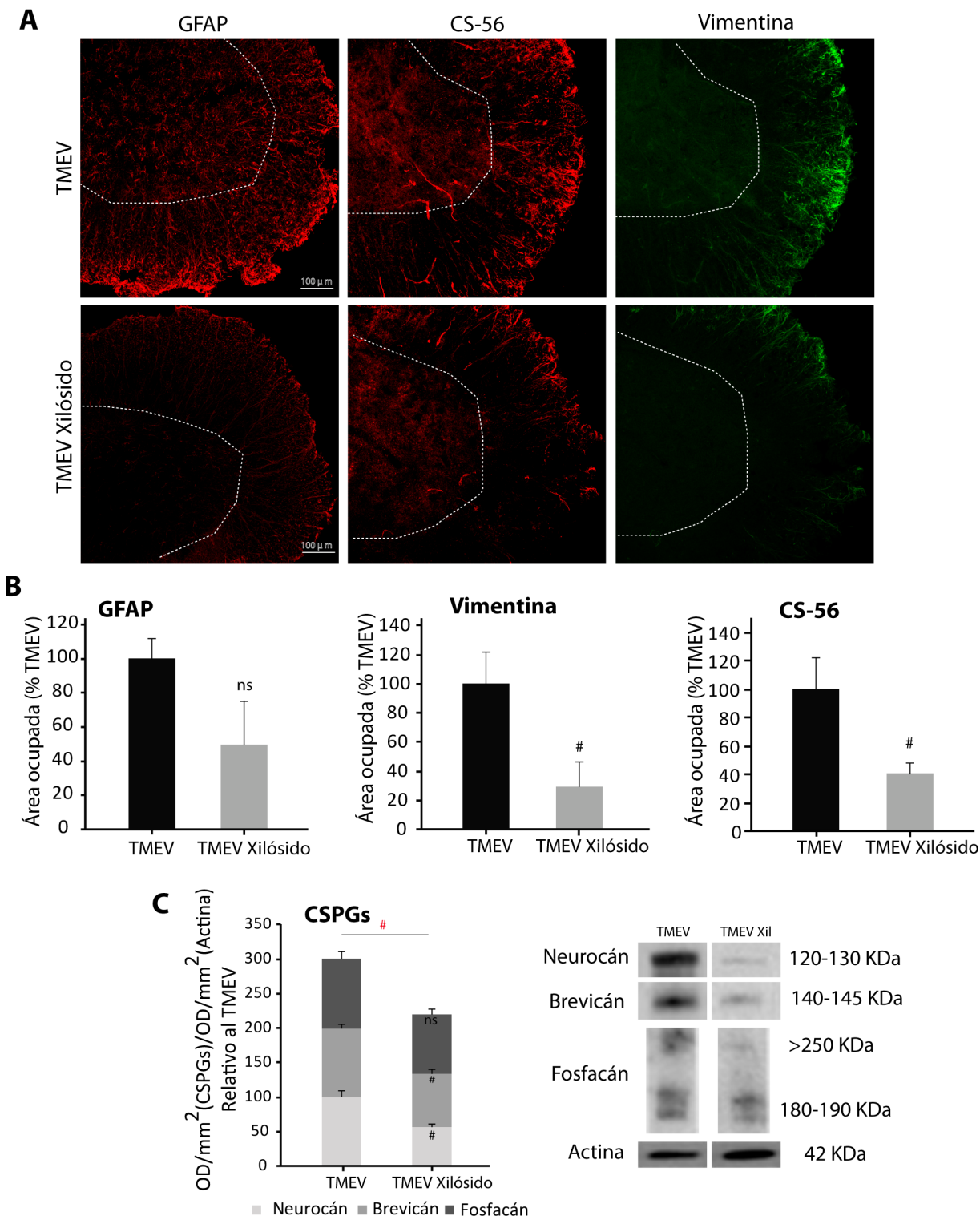


Figura 26. (A) El tratamiento con xilósido en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD disminuye la expresión de CSPGs. (A) Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal donde se marcan astrocitos (GFAP, Vimentina) así como CSPGs (CS-56) y que muestran que tras la administración de xilósido se produce una reducción de la astrogliosis, así como de la expresión de CSPGs a 85 dpi. (B) La cuantificación del área total marcada para GFAP, Vimentina y CS-56 revela que hay una disminución de la reactividad astrogliosa, así como de la expresión de CSPGs marcados con el anticuerpo CS-56 en comparación con los ratones tratados con vehículo. (C) El análisis de los niveles proteicos de Neurocán, Brevicán y Fosfacán mediante western-blot evidencia una

disminución de los mismos a 85 dpi Los datos se representan como la media \pm SEM: # $p < 0,05$. La significancia en color rojo indica en análisis de los CSPGs en conjunto. ns: no significativo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se sugiere que el efecto del compuesto xilósido mejorando los déficits motores en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD está asociado a una disminución de la astrogliosis y de la producción de los CSPGs en la médula espinal de los animales infectados.

2.2 Inhibición farmacológica de la expresión de CSPGs por fluorosamina en el modelo de TMEV-IDD.

Recientemente se ha sintetizado un análogo del precursor de la N-acetil-galactosamina, componente del disacárido que forma parte de las cadenas de condroitín sulfato de los proteoglicanos, llamado fluorosamina (Barthel, Antonopoulos et al. 2011, Nigro, Wang et al. 2009). Este compuesto impide que las enzimas glicosiltransferasas elonguen las cadenas de polisacáridos inhibitorias de condroitín sulfato, impidiendo así la síntesis y liberación de los CSPGs. Se ha descrito previamente la efectividad de la fluorosamina disminuyendo la síntesis de CSPGs por astrocitos murinos y astrocitos humanos in vitro, así como in vivo en modelos de desmielinización por lisolecitina y de EM, como la EAE (Keough, Rogers et al. 2016) promoviendo los procesos de remielinización y recuperación funcional.

Quisimos por tanto utilizar el compuesto fluorosamina para disminuir la producción de CSPGs en la fase crónica de nuestro modelo de TMEV y evaluar así la relevancia de la producción de CSPGs en la sintomatología clínica asociada al modelo. Para ello tratamos a animales infectados con el virus de Theiler con el compuesto fluorosamina, (50 mg/kg) por vía i.p., en la fase crónica del modelo (70 dpi) durante 10 días y una vez comenzada la sintomatología clínica. Finalizado dicho tratamiento se procedió a su valoración sintomatológica mediante la caja de actividad. Tal y como muestra la Figura 27, los déficits motores evaluados mediante la actividad vertical fueron reducidos significativamente con la fluorosamina (B) sin tener efecto significativo en el caso de la actividad horizontal (A).

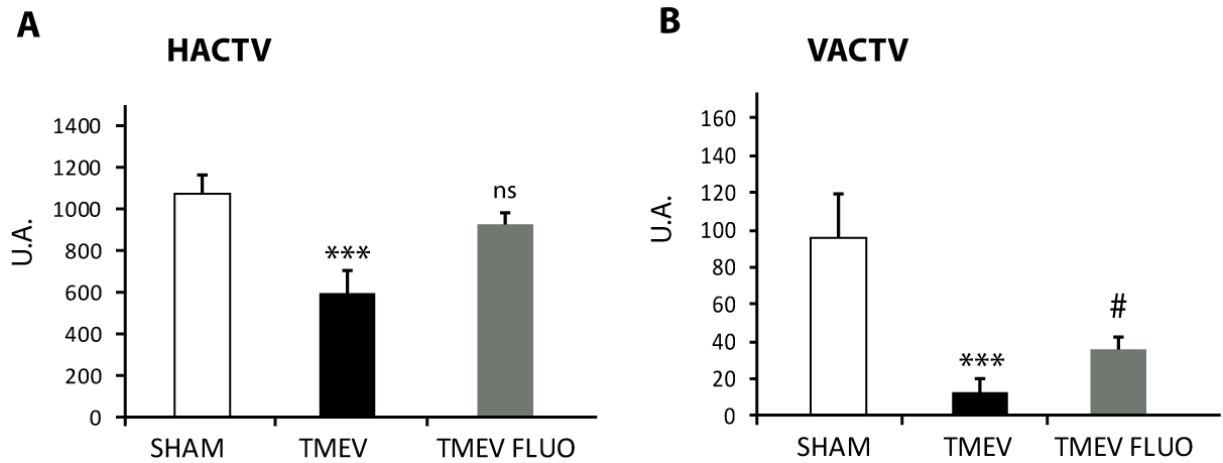


Figura 27. El tratamiento con fluorosamina en la fase crónica del TMEV-IDD mejora los déficits motores asociados al modelo. El análisis mediante el test de la caja de actividad muestra los déficits motores (A; actividad horizontal) (B; actividad vertical) que presentan aquellos animales infectados con el virus de Theiler en comparación con los animales Sham, así como la mejora significativa en aquellos tratados con fluorosamina a 80 dpi. Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs sham; # $p < 0,05$ vs TMEV.

Además, cuando evaluamos mediante RT-PCR los niveles de ARNm de la enzima xilosiltransferasa 1, enzima encargada de unir un grupo xiloso a la serina del esqueleto proteico de los proteoglicanos (Gris, Tighe et al. 2007), primer paso imprescindible para la elongación de las cadenas de condroitín sulfato, observamos que ésta se encontró aumentada en los animales infectados con el TMEV, pero disminuida en aquellos tratados con la fluorosamina. Así mismo, se observó un aumento del ARNm de los proteoglicanos Fosfacán y Versicán en los animales infectados que fue disminuido en aquellos tratados con fluorosamina. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en cuanto al estudio de Neurocán y Brevicán (Figura 28).

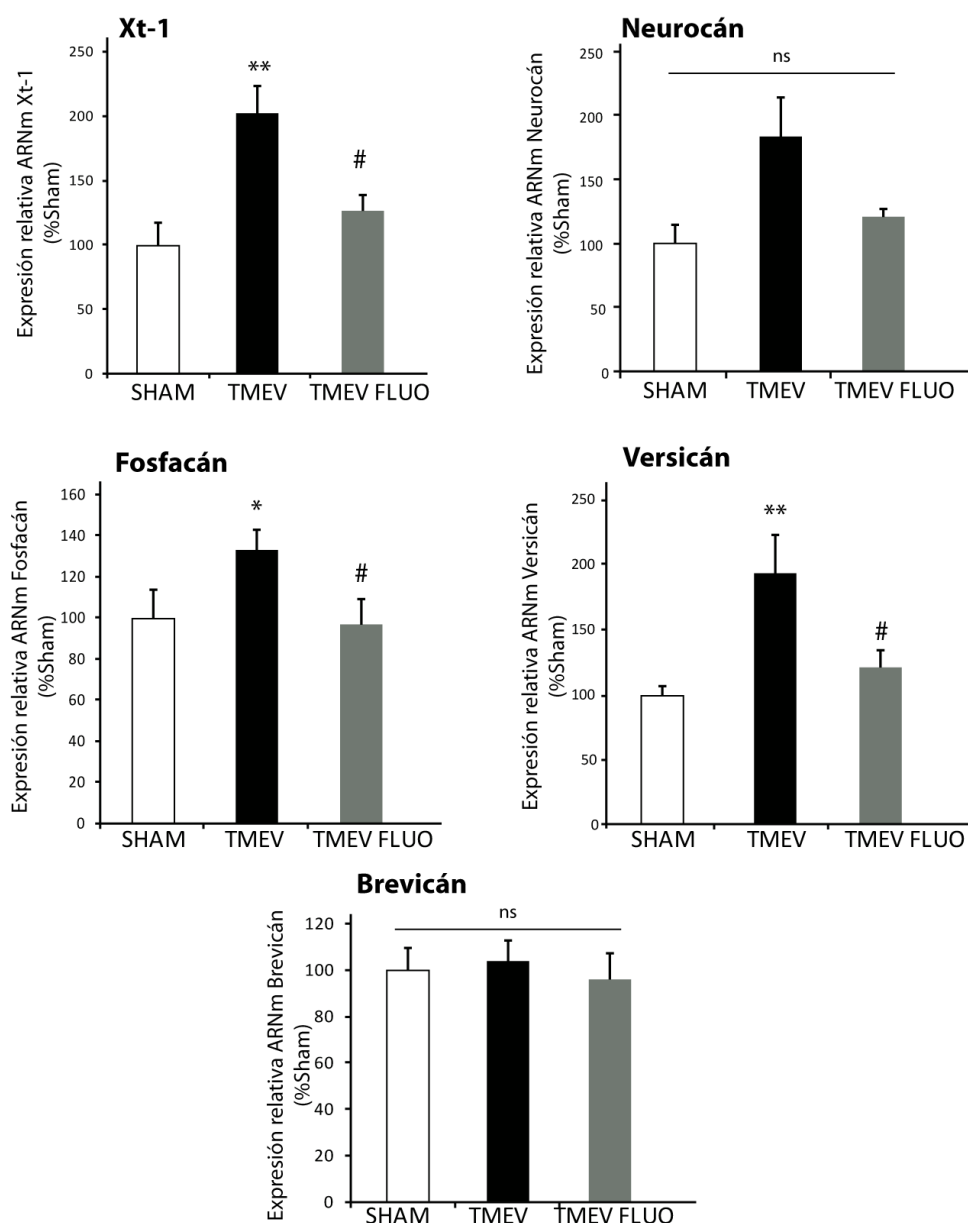


Figura 28. El tratamiento con fluorosamina en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD disminuye la expresión de CSPGs y de su enzima de síntesis Xt-1. El análisis a nivel del ARNm de la enzima de síntesis de CSPGs Xt-1 así como de Neurocán, Brevicán, Vesicán y Fosfacán mediante RT-PCR evidencia un aumento tanto de la enzima Xt-1 así como de los CSPGs Fosfacán y Versicán que se ven disminuidos tras tratamiento con fluorosamina sin verse efecto en cuanto a Neurocán y Brevicán a 80 dpi. Los datos se representan como la media \pm SEM: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs sham; # $p < 0,05$ vs TMEV. ns: no significativo.

RESUMEN PARTE 2:

Como resumen de esta parte de la Tesis Doctoral se indica que el tratamiento con dos compuestos diferentes que inciden en la ruta de síntesis de los CSPGs, el xilósido y la fluoro-samina, administrados en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD y una vez comenzada la sintomatología clínica, mejoran los déficits motores asociados al modelo siendo más efectivo el tratamiento con xilósido. Además, ambos reducen la expresión de CSPGs evidenciando la relevancia de estas moléculas inhibitorias en el desarrollo de la patología del modelo de TMEV-IDD.

PARTE 3. POTENCIAL TERAPÉUTICO DEL ENDOCANNABINOIDE 2-AG Y SU EFECTO SOBRE LOS CSPGs EN MODELOS MURINOS DE EM

Los cannabinoides han sido objeto de estudio durante años para el tratamiento en EM y en otras enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas por sus efectos no solo sobre la espasticidad sino también por su acción como potentes antioxidantes, anti-inflamatorios (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003, Croxford and Miller 2003), anti-excitotóxicos y neuroprotectores (Fernandez-Ruiz, Garcia et al. 2010, Loria, Petrosino et al. 2010, Pryce, Ahmed et al. 2003). El potencial terapéutico de los cannabinoides en base a resultados en modelos animales como reguladores de la progresión de la EM podría incluir también un efecto en los procesos de reparación modulando los CSPGs y la cicatriz glial.

El 2-AG es el endocannabinoide endógeno mayoritario del SNC y ha mostrado tener efectos terapéuticos in vivo en modelos experimentales de daño agudo en médula espinal (Arevalo-Martin, Garcia-Ovejero et al. 2010) así como en el modelo de EM de EAE (Lourbopoulos, Grigoriadis et al. 2011). La MAGL es la enzima responsable de la degradación del 2-AG e inhibidores farmacológicos de esta enzima como el JZL184 han mostrado tener efectos beneficiosos en el modelo de EAE, así como el modelo de desmielinización por cuprizona (Bernal-Chico, Canelo et al. 2015). Ya que los inhibidores farmacológicos de la MAGL sintetizados hasta la fecha son irreversibles y pueden inducir tolerancia al inducir una pérdida funcional de los receptores cannabinoides (Schlosburg, Blankman et al. 2010) perdiendo por lo tanto su potencial efecto terapéutico, en este estudio se ha analizado el posible efecto terapéutico del aumento del tono endógeno del 2-AG mediante el uso de un inhibidor selectivo de la MAGL reversible, de síntesis reciente denominado UCM03025, tanto en el modelo de EAE como en el modelo TMEV-IDD. Asimismo, se ha llevado a cabo un estudio del efecto de dicho inhibidor en la acumulación de los CSPGs para determinar su potencial para generar un ambiente permisivo y promover así mecanismos de reparación y remielinización en el modelo de TMEV.

3.1 Potencial terapéutico del UCM03025, inhibidor de la MAGL, en el modelo de EAE

Para evaluar el efecto terapéutico del compuesto UCM03025 en la fase crónica del modelo de EAE, inmunizamos ratones hembra de la cepa C57BL/6J de manera subcutánea con

la glicoproteína oligodendroglial de mielina (MOG₃₅₋₅₅). El tratamiento con el compuesto UCM03025 (5 mg/kg i.p.) comenzó a los 6 días postinmunización, una vez comenzados los síntomas motores y se mantuvo durante los 21 días posteriores. Los ratones fueron evaluados diariamente mediante la escala clínica descrita en la sección de materiales y métodos.

En primer lugar y para comprobar que la administración del UCM03025 aumentaba los niveles endógenos del 2-AG, las médulas espinales de ratones tratados y sin tratar con el inhibidor de la MAGL fueron analizadas mediante la técnica de HPLC acoplada a espectroscopía de masas y se observó, como muestra la Figura 29A, que el tratamiento con el inhibidor reversible de la MAGL aumentaba significativamente los niveles los niveles endógenos de 2-AG.

Como evidencia del potencial terapéutico del UCM03025, se observó además que aquellos animales inmunizados y tratados con vehículo desarrollaron una sintomatología clínica con una puntuación clínica máxima cercana a 3, déficits motores que se vieron reducidos en aquellos animales tratados con el compuesto UCM03025. La mejoría motora comenzó a ser significativa a los 6 días del comienzo del tratamiento y se mantuvo hasta la finalización del experimento (Figura 29B).

Resultados

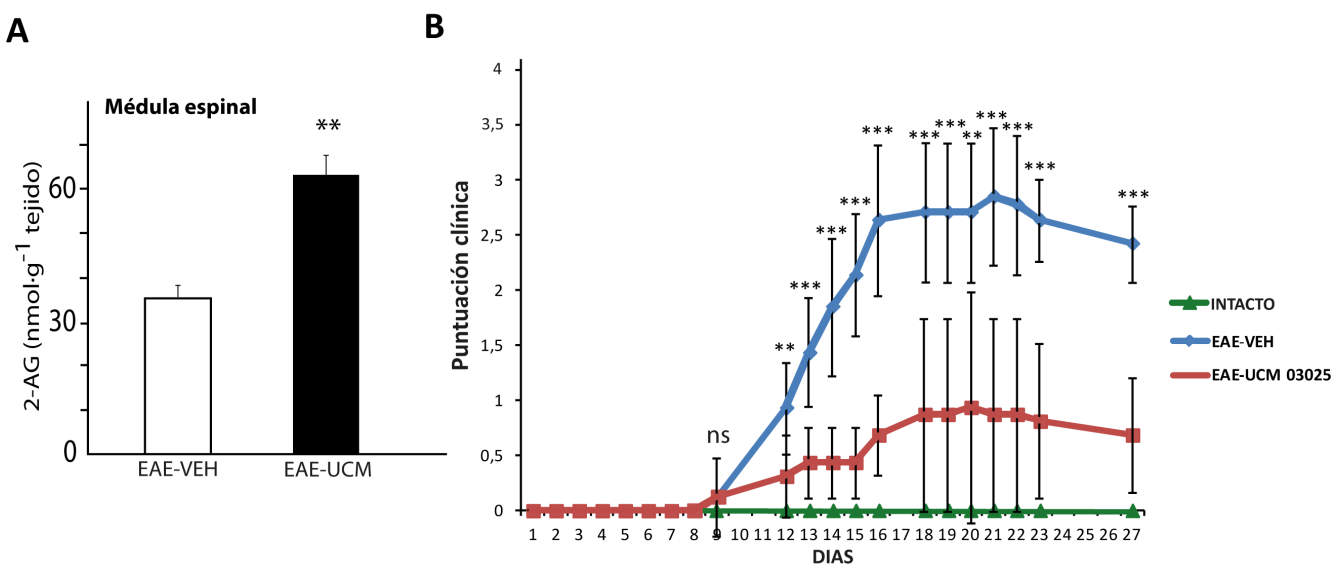


Figura 29. El tratamiento con el compuesto UCM03025 aumenta los niveles endógenos de 2-AG y mejora significativamente los síntomas motores asociados al modelo de EAE. (A) Análisis de los niveles de 2-AG a nivel de médula espinal de los ratones tratados con vehículo o con el compuesto UCM03025. (B) El inhibidor de la MAGL redujo los déficits motores asociados al modelo. Los datos se representan como la media \pm DEM en el caso del análisis clínico y media \pm SEM en el caso de los valores de 2-AG: *** p <0,001; ** p <0,01; vs Intacto. ns no significativo.

Para determinar si el aumento endógeno del 2-AG era capaz de modular la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el modelo de EAE, se evaluó histológicamente, a los 27 dpi, la médula espinal cervical de los animales de estudio con el fin de analizar el grado de infiltración de leucocitos al parénquima así como la reactividad microglial.

Como muestra la Figura 30 A y B, el análisis de infiltrados evaluado en secciones teñidas con Hematoxilina/Eosina indicó que aquellos animales inmunizados con MOG y tratados con el compuesto UCM03025 mostraron niveles parcialmente inferiores de infiltración celular que los animales tratados con vehículo aunque no se detectó significancia estadística entre los grupos de estudio.

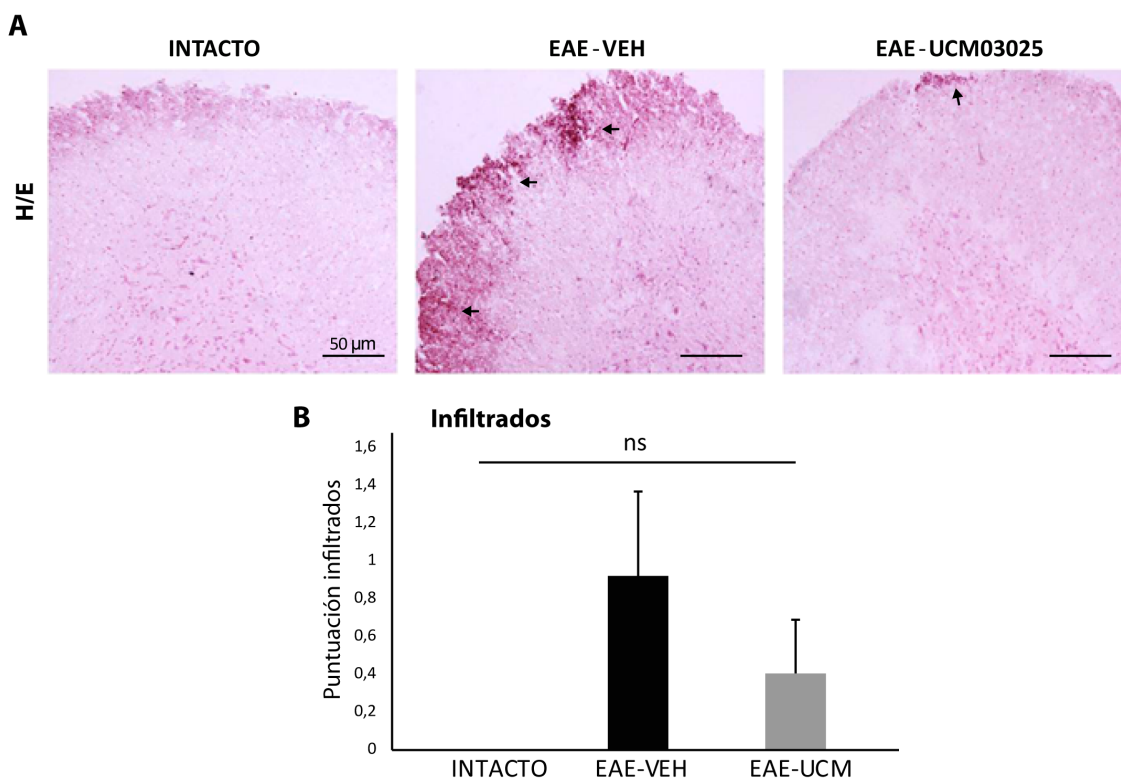


Figura 30. El inhibidor de la MAGL reduce a modo de tendencia el número de infiltrados en la médula espinal de los animales inmunizados. Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal cervical teñidas con Hematoxilina/eosina. (B) El análisis del grado de infiltración celular indica una tendencia al aumento de leucocitos en aquellos ratones inmunizados y tratados con vehículo y una reducción parcial, aunque no significativa en aquellos tratados con el UCM03025. Barra de calibración 50µm.

El análisis histopatológico para evaluar la reactividad microglial mediante el anticuerpo Iba-1 (Figura 31 A, B) mostró que el área ocupada por la microglía era significativamente mayor en los animales tratados con vehículo, indicando un mayor grado de reactividad microglial y que esta se encontraba significativamente disminuída en aquellos animales tratados con el inhibidor de la MAGL.

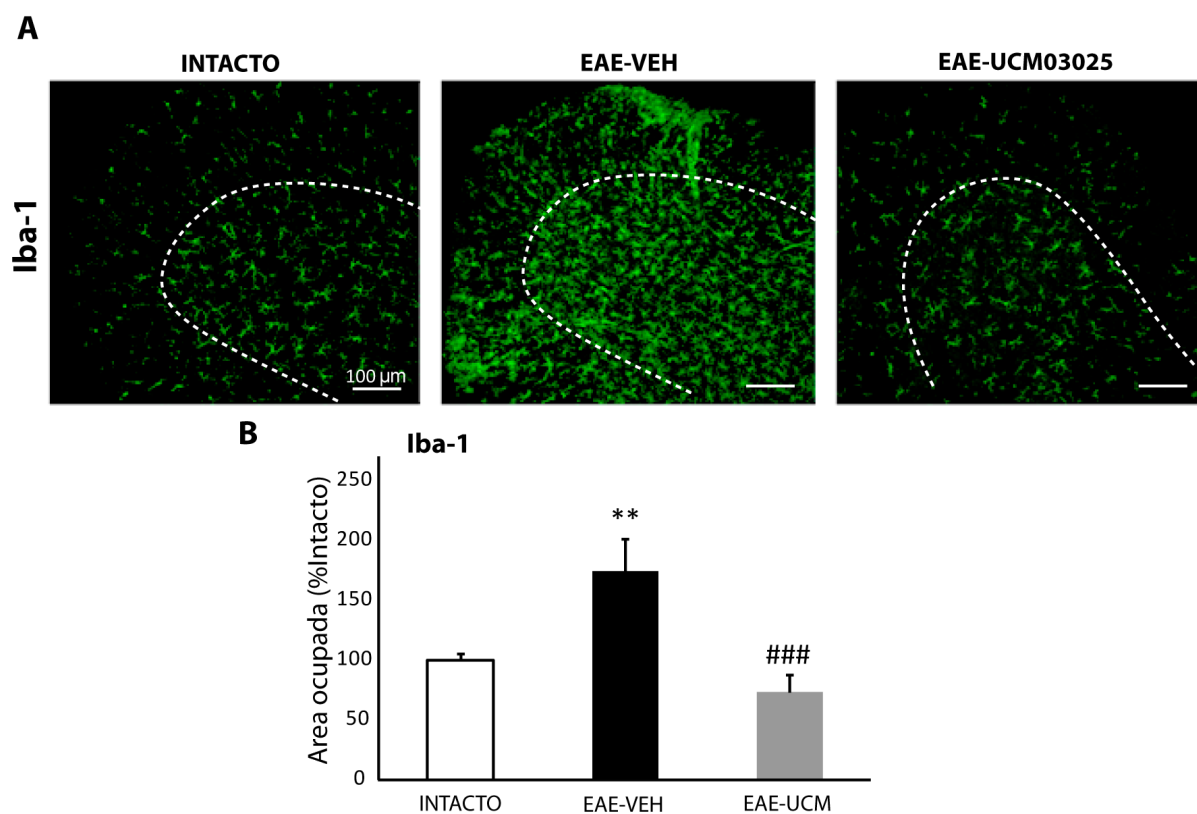


Figura 31. UCM03025 reduce la reactividad microglial en el modelo de EAE. (A) Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal cervical marcadas con el anticuerpo de Iba-1. (B) El análisis para Iba-1 revela que en aquellos ratones inmunizados hay un aumento significativo de la reactividad microglial que se encuentra reducida en aquellos que recibieron el compuesto. Los datos se representan como la media \pm SEM: ** $p < 0,01$ vs CFA; ### $p < 0,001$ vs EAE. Barra de calibración 100 μ m.

Dado el efecto del compuesto UCM03025 en la mejoría de los déficits motores y la modulación de la respuesta inflamatoria, se analizó su posible efecto a nivel de neuroprotección mediante tinciones para Neurofilamento-H así como para marcadores para mielina en la médula espinal de los animales de estudio.

Como muestra la Figura 32 A y B, en los animales inmunizados con MOG₃₅₋₅₅ y tratados con vehículo se observó una pérdida de marcaje para Neurofilamento-H indicativo de alteración axonal. En aquellos animales inmunizados y tratados con el inhibidor de la MAGL, dicho

marcador se restauró a niveles control indicando una prevención de la pérdida axonal.

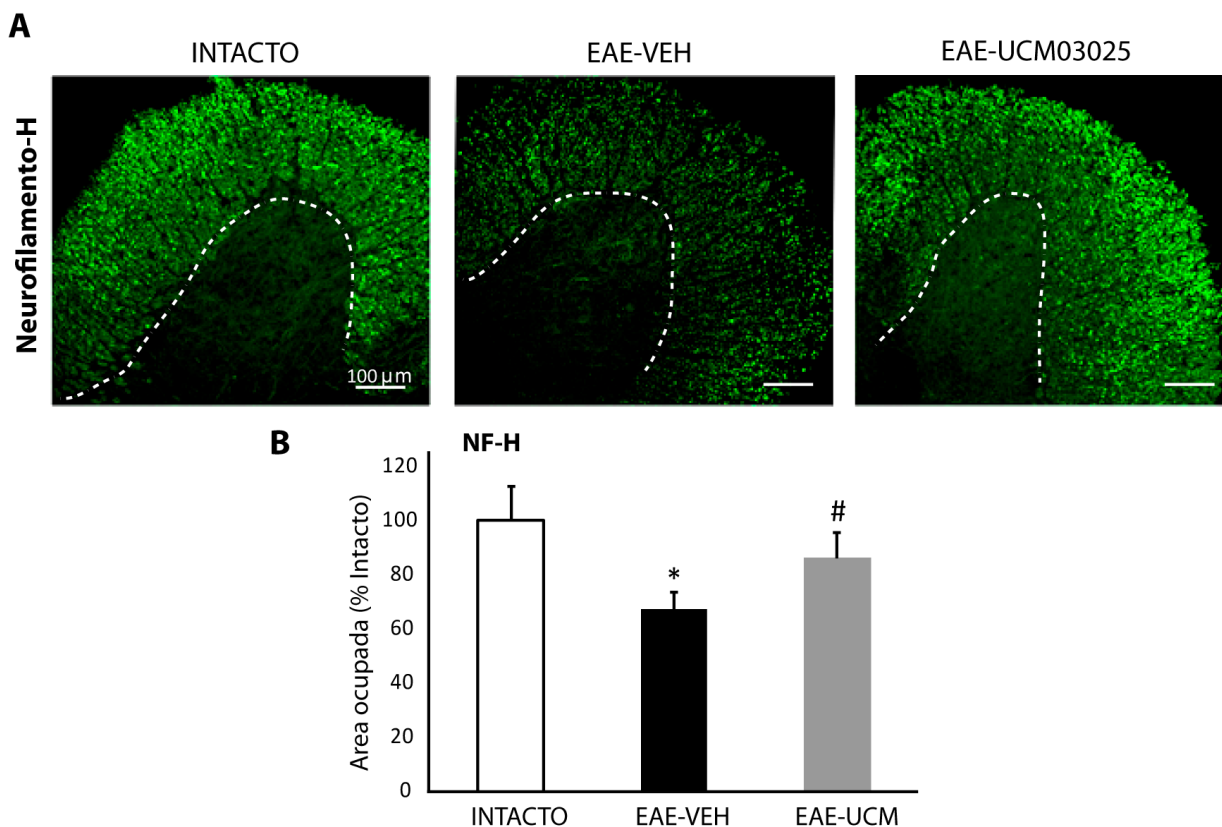


Figura 32. El compuesto UCM03025 previene la pérdida axonal en el modelo de EAE. (A) Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal cervical marcadas con el anticuerpo de Neurofilamento-H. (B) El análisis evidencia una pérdida axonal en aquellos ratones inmunizados que se revierte en aquellos que recibieron el compuesto. Los datos se representan como la media \pm SEM: * $p < 0,05$ vs CFA; # $p < 0,05$ vs EAE. Barra de calibración 100 μ m.

Con respecto a la integridad de las vainas de mielina, se realizó una inmunohistoquímica para el marcador de mielina MBP y una tinción de Luxol Fast Blue en secciones de la médula espinal (Figura 33). En dichas tinciones se pudo observar una pérdida de marcaje para MBP y de mielina en general en aquellos animales inmunizados y tratados con vehículo, siendo menos evidente en aquellos animales tratados con el inhibidor de la MAGL.

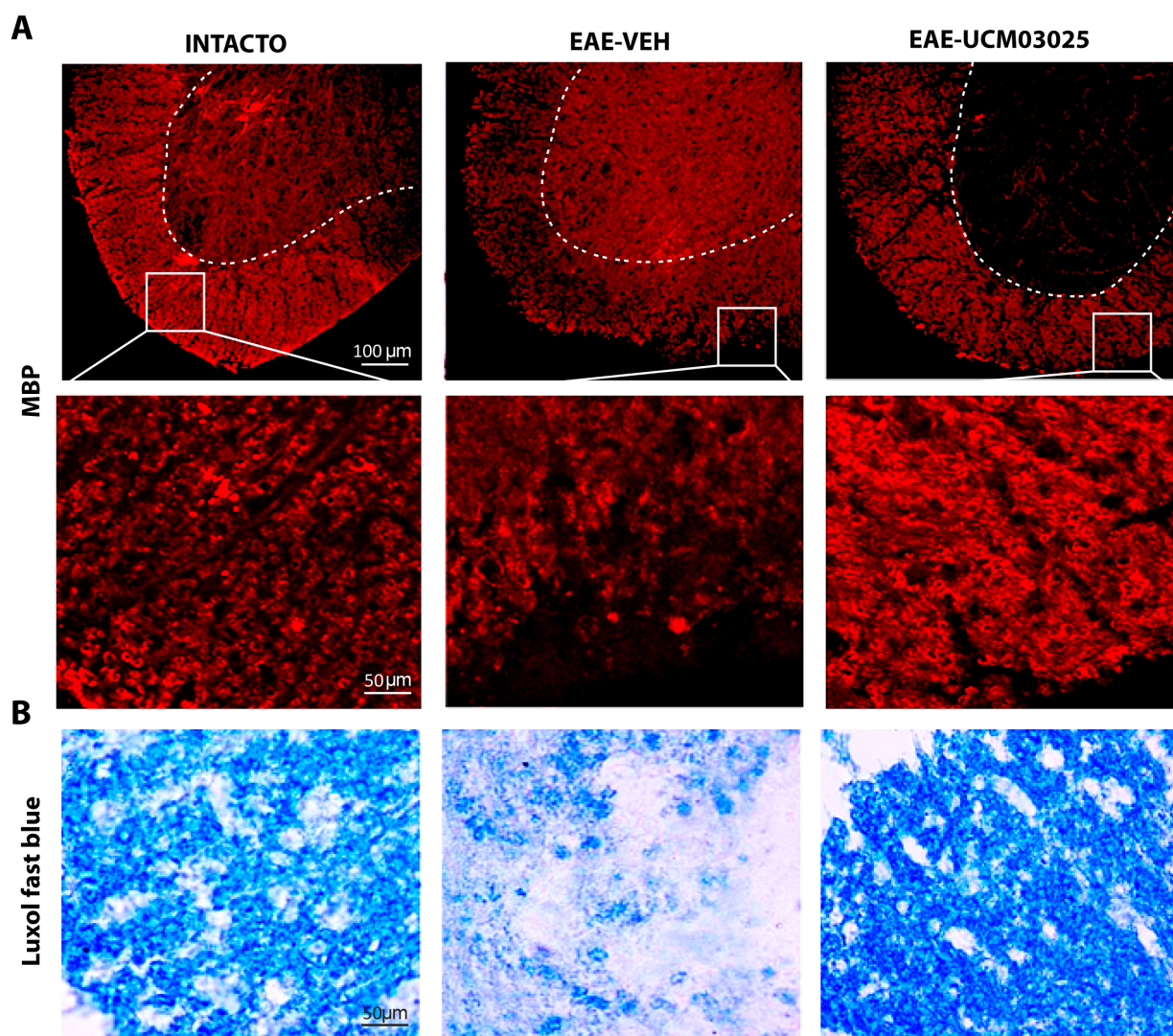


Figura 33. El inhibidor reversible de la MAGL restaura la morfología de la mielina en el modelo de EAE. Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal cervical marcadas para ver mielina con (A) el anticuerpo de MBP y (B) tinción con Luxol Fast Blue. Las imágenes muestran una importante pérdida del marcaje para mielina que se recupera en aquellos ratones que recibieron tratamiento con UCM03025. Barra de calibración 100 y 50 μ m.

Como resumen del estudio del potencial terapéutico del inhibidor reversible de la MAGL, el UCM03025, en el modelo de EAE se resalta que: tras la administración de dicho compuesto se consiguió un aumento de los niveles endógenos del endocannabinoide 2-AG en la médula espinal de los animales de estudio, indicando una inhibición efectiva de la enzima MAGL in vivo. Además, el UCM03025 redujo los déficits motores asociados al modelo de EAE, efecto que se vio acompañado por una reducción parcial, aunque no significativa de infiltrados en la médula espinal, así como de una disminución de la reactivación microglial, pérdida axonal y de los marcadores para mielina.

3.2 Potencial terapéutico del UCM03025 y del endocannabinoide 2-AG en el modelo del virus de Theiler. Efecto sobre los CSPGs.

Para evaluar el potencial terapéutico del compuesto UCM03025 en el modelo de TMEV-IDD, se procedió a determinar su capacidad para mejorar la sintomatología motora asociada al modelo, así como su potencial antiinflamatorio. Así mismo, se analizó su capacidad para regular la producción de los CSPGs, con el fin de determinar la capacidad del compuesto UCM03025 de participar en los mecanismos de reparación.

Para ello, tratamos animales infectados con el virus de Theiler con el compuesto UCM03025, a una dosis de 5 mg/kg i.p., en la fase crónica del modelo (75 dpi) durante 10 días y una vez comenzada la sintomatología clínica. Finalizado el tratamiento, se procedió a su valoración clínica mediante la caja de actividad. Tal y como muestra la Figura 34 el tratamiento con UCM03025, mejoró significativamente los déficits motores asociados al modelo de TMEV-IDD, evaluados mediante la actividad horizontal (A) como la vertical (B). Además, para determinar la posible implicación de los receptores CB1 y CB2 en el efecto del UCM03025, otro grupo de animales fueron tratados con antagonistas selectivos de los receptores cannabinoides CB1 (2 mg/kg) y/o CB2 (2 mg/kg) 30 minutos antes del tratamiento con el inhibidor de la MAGL durante 10 días. Se observó que el efecto beneficioso del UCM03025, mejorando los déficits motores en el modelo de TMEV-IDD, fue revertido al ser administrado junto con antagonistas tanto del receptor CB1 como del receptor CB2, así como cuando estos fueron administrados de manera conjunta no observándose una potenciación del grado de inhibición obtenida cuando se administraba cada antagonista independientemente.

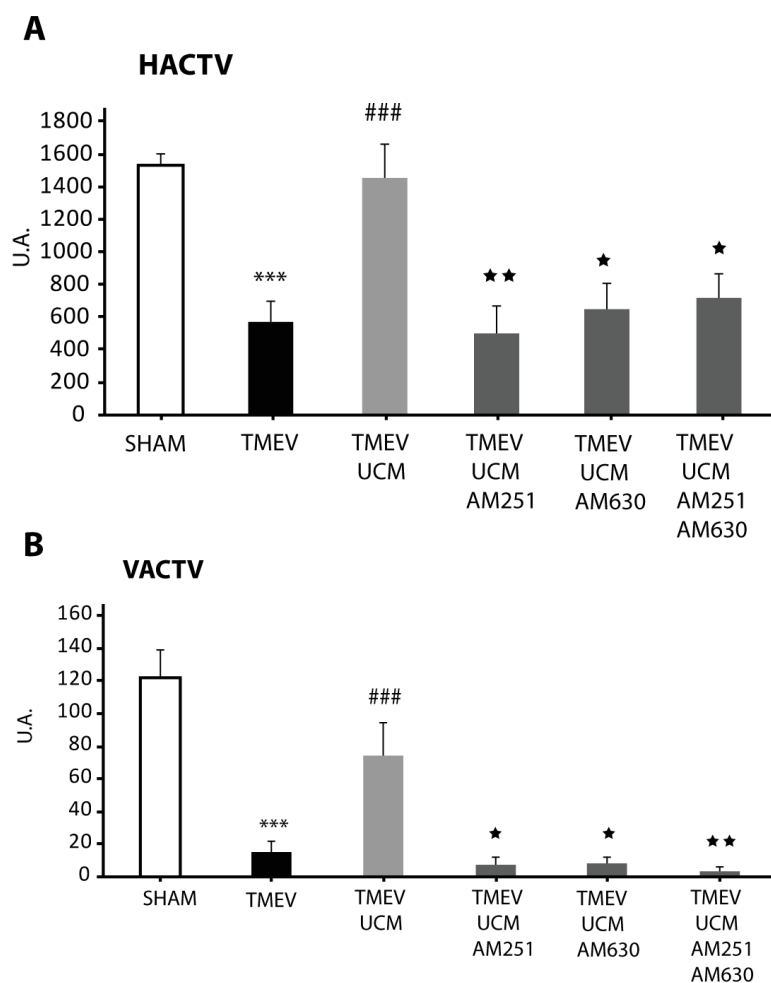


Figura 34. El tratamiento con el compuesto UCM03025 mejora los déficits motores asociados al modelo de TMEV-IDD actuando a través de los receptores CB1 y CB2. El análisis de la actividad motora evaluada mediante el test de la caja de actividad a los 85 dpi mostró que los animales infectados con el virus de Theiler presentan las alteraciones motoras características del modelo detectadas en la (A) actividad horizontal y (B) actividad vertical. Dichas alteraciones motoras se encuentran reducidas en aquellos ratones tratados con el compuesto UCM03025 durante 10 días y se revierten en coadministración con antagonistas de los receptores de CB1 (AM251) y CB2 (AM630). Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$ vs Sham; ### $p < 0,001$ vs TMEV; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs TMEV-UCM.

Dado que el responsable de los efectos terapéuticos ejercidos por el UCM03025 es el incremento del tono endógeno de 2-AG, quisimos determinar si el tratamiento directo con el propio endocannabinoide sería capaz también de revertir los déficits motores asociados al modelo de TMEV. Además, para evitar el posible efecto del 2-AG a nivel periférico, administramos el 2-AG (5mg/kg) a nivel intracerebroventricular para determinar su acción directa en el SNC. Con este fin el 2-AG fue administrado en ratones infectados con el virus de Theiler y una vez comenzada la sintomatología (75 dpi), mediante la implantación de minibombas osmóticas. Tras 10 días de tratamiento y como muestra la Figura 35, se observó que los animales que

habían recibido administración continua del endocannabinoide mostraron menor porcentaje de discapacidad motora, analizada en base a la actividad horizontal (A) y vertical (B), que la observada en los animales tratados con el vehículo.

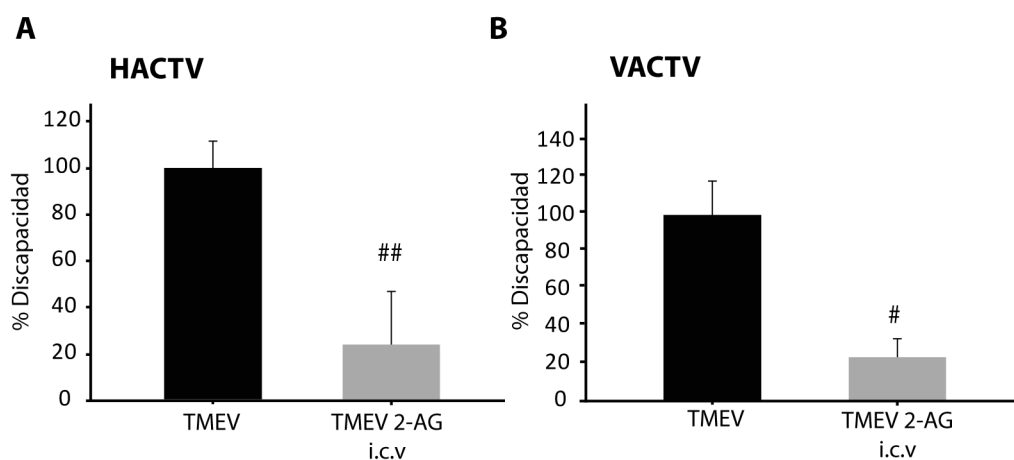


Figura 35. La administración intracerebroventricular de 2-AG mejora la sintomatología motora en los animales infectados con el virus de Theiler. La administración continua en ventrículo lateral de 2-AG mediante bombas osmóticas durante 10 días mejora los déficits motores evaluados con el test de la caja de actividad. Los datos están representados como la media \pm SEM en relación al porcentaje de déficits de los animales infectados tratados con vehículo de (A) la actividad horizontal y (B), de la actividad vertical. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ vs TMEV.

A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento con el UCM03025 sobre la respuesta inflamatoria mediante histología de la médula espinal cervical, con el fin de analizar el grado de infiltración de leucocitos al parénquima. Además, debido a que la respuesta inmune innata en el SNC es esencial para la progresión del TMEV-IDD y la microglía proporciona la primera línea de defensa contra el virus, se analizó también el efecto del UCM03025 en la respuesta microglial en la fase crónica del modelo, a la finalización del tratamiento (85dpi).

Como se observa en la Figura 36, el grado de infiltrados en médula espinal disminuyó significativamente en los animales tratados con UCM03025 en comparación con aquellos tratados con vehículo (A), además dicha disminución se vio acompañada de un descenso del área ocupada por microglía evaluada mediante el anticuerpo Iba-1 (B).

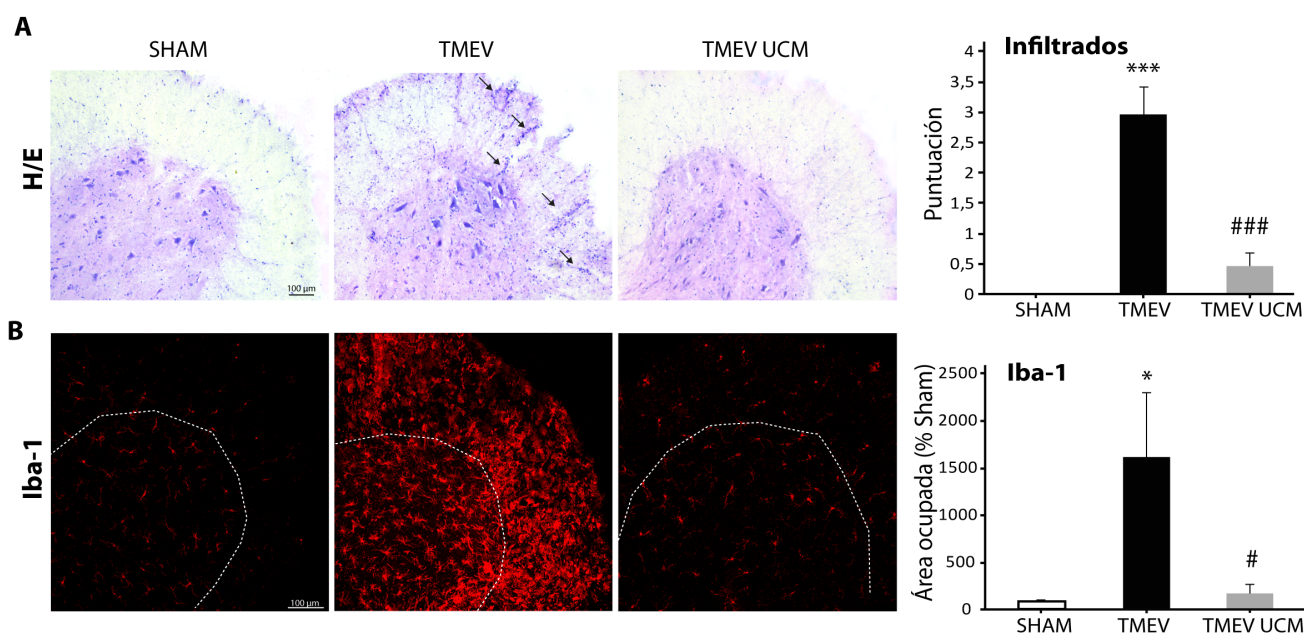


Figura 36. UCM03025 reduce la infiltración celular y la reactividad microglial en la médula espinal de los animales infectados con el virus de Theiler. Microfotografías representativas y análisis de secciones transversales de médula espinal cervical marcadas para ver infiltración leucocitaria mediante (A) tinción de Hematoxilina/Eosina y (B) mediante el anticuerpo de Iba-1 para analizar el estado de la microglía. Los datos indican que tras la administración durante 10 días con el compuesto UCM03025 se observa una disminución significativa del número de infiltrados en el parénquima, así como una reducción de la reactividad de la microglía a los 85 dpi. Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ vs TMEV. Barra de calibración 100 μ m.

Se ha descrito previamente que en el modelo de TMEV, las células gliales, así como las células inmunes producen mediadores inflamatorios y citotóxicos que son responsables de generar daño axonal y desmielinización (Pope, Karpus et al. 1996). Una vez visto el efecto beneficioso del UCM03025 a nivel motor, así como su efecto limitando la infiltración de células inmunes y disminuyendo la reactividad microglial, se procedió a determinar la expresión relativa de ARNm, a nivel de médula espinal cervical, de diferentes mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β y NOS-II mediante la técnica de RT-PCR. Como puede observarse en la Figura 37, el tratamiento con UCM03025, redujo de manera significativa la citoquina IL-1 β y a modo de tendencia TNF- α y NOS-II.

El 2-AG a través del compuesto UCM03025 podría no solo actuar disminuyendo la respuesta proinflamatoria, sino también potenciando la respuesta antiinflamatoria. Para ello analizamos la expresión relativa a nivel de ARNm de la enzima Arginasa-1 mediante la técnica de RT-PCR (Figura 37) y se observó que dicha enzima estaba aumentada de manera significativa en aquellos ratones tratados con UCM03025, respecto al grupo SHAM.

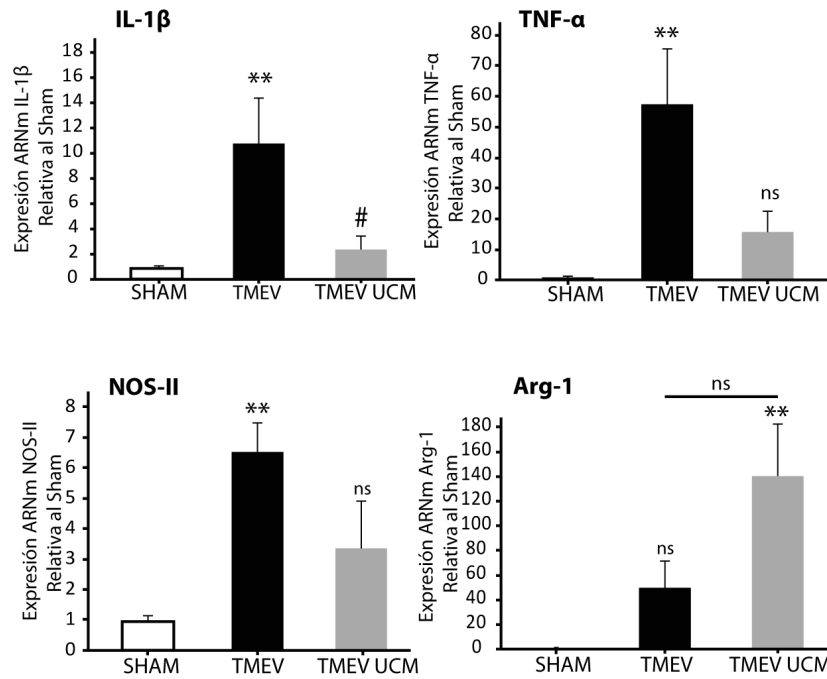


Figura 37. El inhibidor de la hidrólisis del 2-AG modula los niveles de mediadores inflamatorios en el modelo de TMEV-IDD. Análisis de la expresión de ARN mensajero mediante RT-PCR en la médula espinal cervical de (A) mediadores proinflamatorios IL-1 β , TNF- α y NOS-II y el mediador antiinflamatorio Arginasa-1. Los datos se representan como la media \pm SEM: ** $p < 0,01$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs TMEV.

En conjunto, los resultados muestran un efecto del UCM03025 disminuyendo la presencia de infiltrados en el parénquima, de citoquinas inflamatorias y de la respuesta microglial, así como como un posible aumento de la respuesta anti-inflamatoria, que apuntaría hacia un efecto inmunomodulador del UCM03025 en el modelo de TMEV-IDD.

Una vez descrito que el potencial terapéutico ejercido por el compuesto UCM03025 podría ser resultado de su capacidad para actuar como inmunomodulador, nos preguntamos si junto a esa función se podría incluir la capacidad para reducir la producción y acumulación de los CSPGs, moléculas que habíamos visto aumentadas previamente en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD.

Para ello, en primer lugar, evaluamos mediante inmunohistoquímica, la astrogliosis usando el anticuerpo para GFAP y Vimentina, así como la expresión de CSPGs mediante el anticuerpo CS-56. Según los resultados obtenidos, se observó una prominente astrogliosis (GFAP, Vimentina), así como una mayor expresión del marcador CS56, en los animales infectados y tratados con vehículo (Figura 38A), observaciones que, al hacer las cuantificaciones, muestra-

ban una reducción significativa en aquellos animales tratados con el inhibidor de la MAGL (Figura 38B).

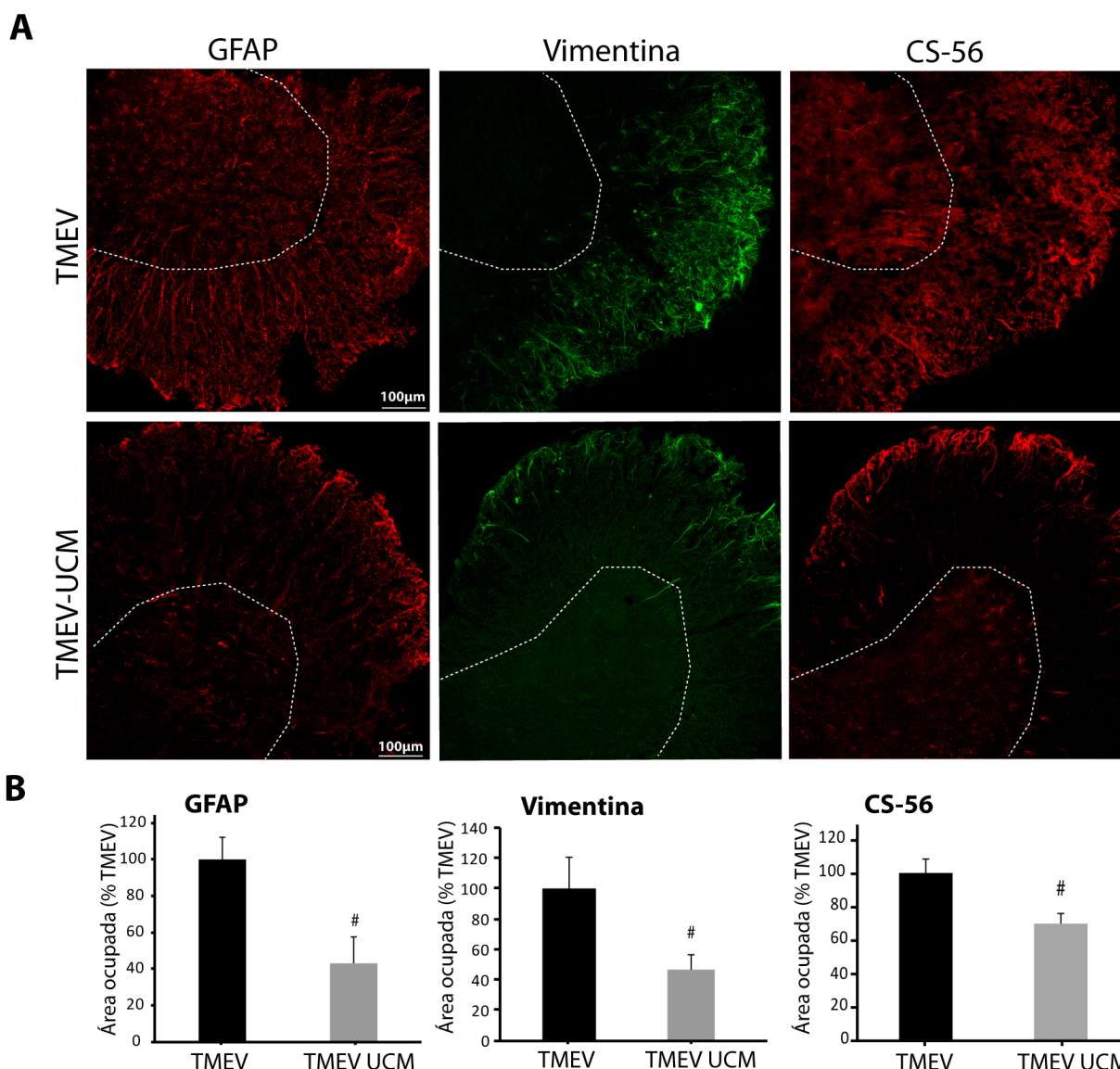


Figura 38. El tratamiento con UCM03025 reduce la astrogliosis y la expresión del total de CSPGs en el modelo de TMEV-IDD. (A) Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal donde se marcan astrocitos (GFAP, Vimentina) así como CSPGs (CS-56). (B) La cuantificación del área total marcada para GFAP, Vimentina y CS-56 revela que hay una disminución de la reactividad astrogliar, así como de la expresión de CSPGs marcados con el anticuerpo CS-56 a 85 dpi en comparación con los ratones tratados con vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM: # $p < 0,05$ vs TMEV. Barra de calibración 100 μ m.

Así mismo, cuando se evaluaron los diferentes CSPGs, Brevicán, Fosfacán y Neurocán, a nivel de ARNm mediante la técnica de RT-PCR (Figura 39A), así como a nivel proteico mediante western-blot (Figura 39B), se observó que el único proteoglicano que disminuyó significativamente tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico fue el Fosfacán, no viéndose efecto alguno

a nivel de Brevicán y Neurocán. Sí que se detectó significancia estadística al analizar la expresión proteica sumatoria de los tres CSPGs.

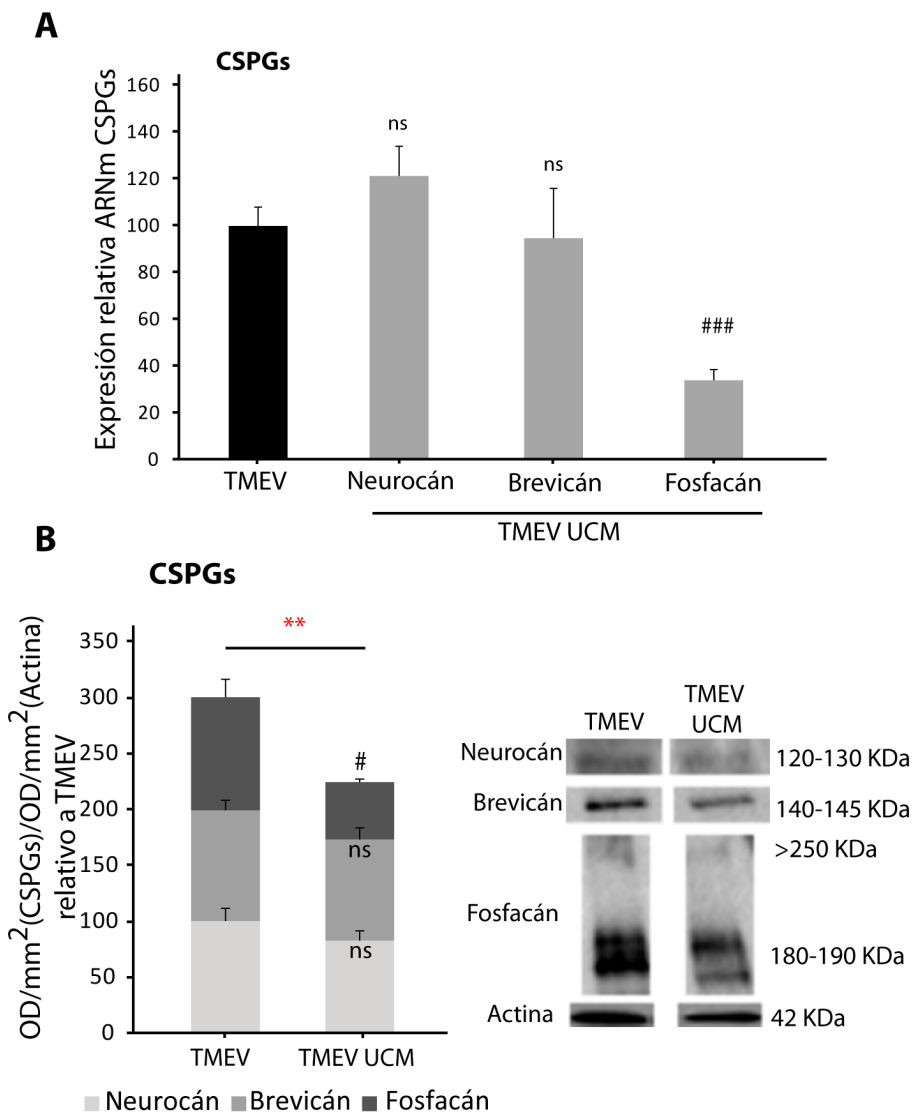


Figura 39. El inhibidor de la MAGL disminuye la expresión del proteoglicano Fosfacán tanto a nivel de mensajero como a nivel proteico. El análisis de los CSPGs Neurocán, Brevicán y Fosfacán mediante RT-PCR (A) y mediante western-blot (B) evidencia una disminución de únicamente significativa del Fosfacán tanto a nivel de mensajero como a nivel proteico a 85 dpi. Los datos se representan como la media \pm SEM: ### p<0,001 # p<0,05 vs TMEV. La significancia en color rojo indica en análisis de los CSPGs en conjunto. ns: no significativo.

Los CSPGs han sido descritos como agentes inhibidores de los mecanismos de reparación y remielinización al generar un ambiente poco permisivo para la diferenciación de los progenitores de oligodendrocitos, así como la regeneración axonal. Teniendo en cuenta la disminución observada de los CSPGs como resultado de la administración del UCM03025, quisimos evaluar a continuación en nuestro estudio si también sería capaz de inducir cambios en el número de oligodendrocitos en la zona dañada.

Para ello, se realizó un estudio a nivel histológico y de expresión de ARNm en médula espinal una vez finalizado el tratamiento con UCM03025 (85dpi) para marcadores de oligodendrocitos. Así mismo, para determinar la proliferación celular, se administró a los animales de estudio BrdU (50 mg/kg, i.p.) diariamente junto con el tratamiento con UCM03025. Se observó que tanto el número de OPCs (Olig-2⁺ CC1⁻) como aquellos oligodendrocitos proliferativos, Olig2⁺BrdU⁺, se encontraban significativamente aumentados en los animales infectados con el virus de TMEV y tratados con UCM03025 (Figura 40 A, B). Se ha involucrado a Olig-2 en la diferenciación de los progenitores neurales a linaje oligodendroglial (Ligon, Kesari et al. 2006) mientras que el Nkx2.2 regula la maduración y diferenciación de los progenitores (Qi, Cai et al. 2001). Además, tanto el Olig-2 como el Nkx2.2 se expresan en altos niveles en OPCs, mientras que los oligodendrocitos maduros presentan bajos niveles de los mismos; astrocitos y microglía no expresan estos factores de transcripción (Kitada and Rowitch 2006, Kuhlmann, Miron et al. 2008). En relación a estos marcadores, el análisis por RT-PCR de los niveles de ARNm para Olig-2 y Nkx2.2 en nuestro estudio mostraron un incremento de los mismos en aquellos animales tratados con el UCM03025 (Figura 40C).

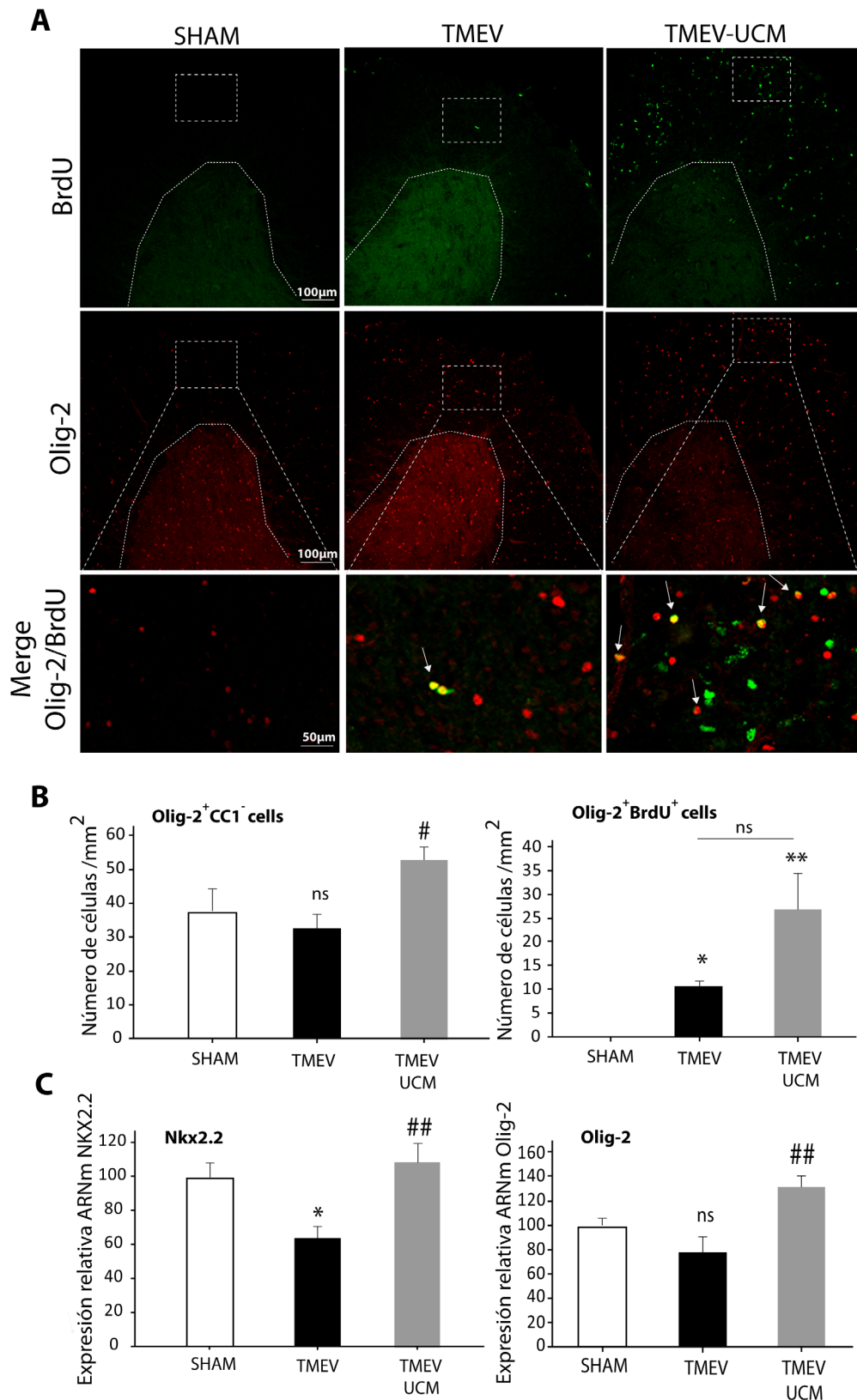


Figura 40. El tratamiento con UCM03025 en ratones infectados con el virus de Theiler aumenta la proliferación de oligodendrocitos, así como la expresión de marcadores de OPCs a 85 dpi. (A) Fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal marcadas tanto para Olig-2 como para células proliferantes (BrdU). (B) La cuantificación del número de OPCs (Olig-2⁺CC1⁻) así como de aquellos proliferantes (Olig-2⁺BrdU⁺) indica que estos se encuentran aumentados en aquellos ratones que recibieron tratamiento con el inhibidor de la hidrólisis de 2-AG. (C) El análisis de ARN mensajero de los marcadores de OPCs, Nkx2.2 y Olig-2, resalta el aumento de la expresión de los mismos en los ratones TMEV-IDD tratados con el compuesto. Los datos se representan como la media ± SEM: * p<0,05 **p<0,01 vs Sham; # p<0,05 ## p<0.01 vs TMEV. Barra de calibración 100, 50 μm.

La remielinización es un proceso por el cual se generan nuevas vainas de mielina por parte de los OPCs diferenciados a oligodendrocitos maduros que ocurre tras un daño en el SNC. Para que este proceso tenga lugar es necesaria la diferenciación de OPCs en situaciones donde el ambiente debe ser permisivo.

Dado que en nuestro estudio observamos una disminución CSPGs, así como un incremento en el número de OPCs en la médula espinal de los animales infectados y tratados con el UCM03025, quisimos determinar si este aumento se correlacionaría con una mayor presencia de oligodendrocitos maduros capaces de sintetizar nuevas vainas de mielina para dar lugar a procesos de remielinización.

Con este objetivo, se llevó a cabo un análisis del número de células CC1 positivas, mediante histología en la médula espinal de los animales de estudio. Como resultado de este análisis, se observó que el número de oligodendrocitos maduros CC1⁺ estaban aumentados en los animales infectados y tratados con el compuesto UCM03025 respecto a los tratados con vehículo (Figura 41 A, B). El aumento del número de progenitores, así como del incremento de oligodendrocitos maduros observado en los animales tratados con UCM03025, se podría traducir en nueva síntesis de proteínas de mielina. Con el fin de evaluar dicho efecto analizamos mediante western-blot la proteína de mielina MBP observándose que la disminución de su expresión en los animales TMEV tratados con vehículo se vio revertida de manera significativa en aquellos animales a los que se les administró el inhibidor de la MAGL (Figura 41C). El UCM03025 por lo tanto no solo induce un aumento de la proliferación de oligodendrocitos, así como del número de oligodendrocitos maduros, sino que también incrementa la expresión de la proteína de mielina MBP a los 85 dpi.

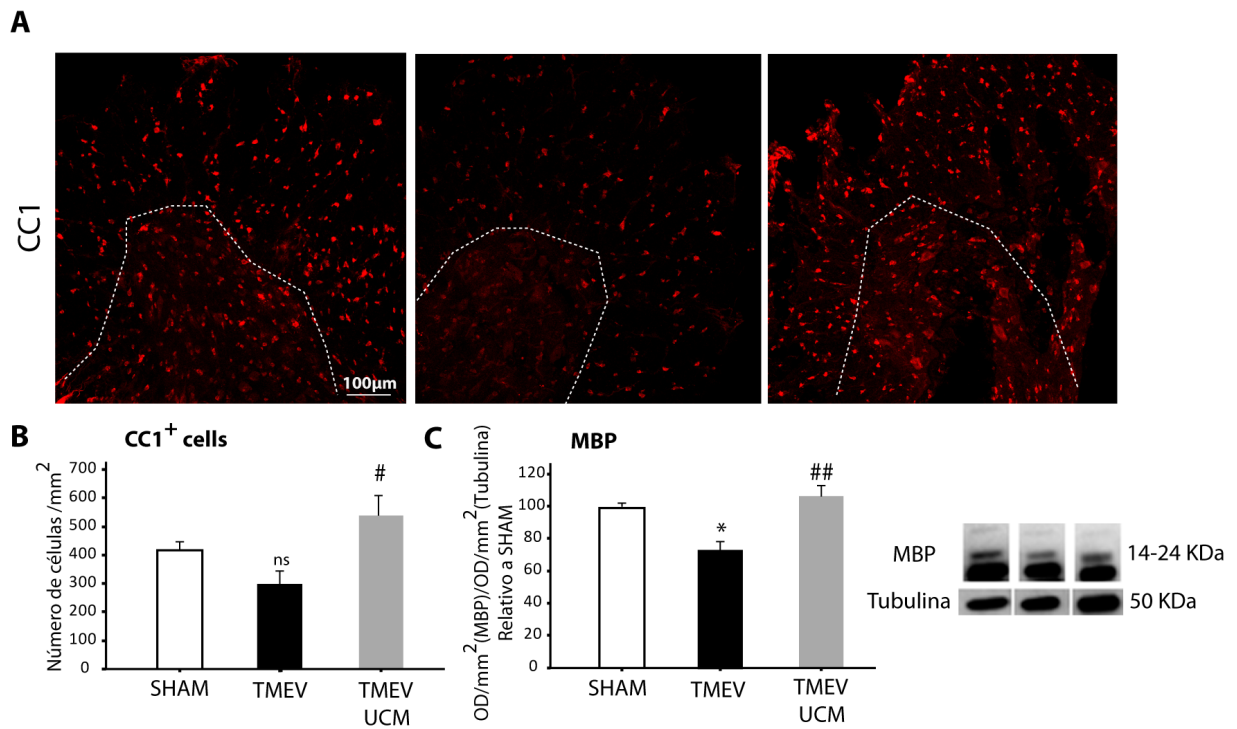


Figura 41. UCM03025 aumenta los marcadores de oligodendrocitos maduros en el modelo de TMEV-IDD. Las fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal marcadas para el marcador de oligodendrocitos maduros CC1 (A) y su cuantificación, (B) muestran un aumento de los mismos tras tratamiento con UCM03025 a 85 dpi. Se observa una disminución de los niveles de la proteína básica de mielina MBP en las secciones de los ratones infectados y tratados con vehículo, que sin embargo aumentan en aquellos que recibieron UCM03025 (C). Los datos se representan como la media \pm SEM: * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ vs TMEV. Barra de calibración 100 μ m.

Con el fin de evaluar si el efecto observado a nivel del número de oligodendrocitos se traduce en un aumento de los procesos de remielinización, se dejó otro grupo de animales TMEV tratados con UCM03025, sin tratar durante 21 días más, hasta los 105 dpi, escogiendo dicho tiempo basándonos en estudios previos (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003). Llegado ese tiempo, se procedió de nuevo a su valoración clínica mediante la caja de actividad y se realizaron análisis histológicos y de western-blot a nivel de médula espinal para determinar la expresión de CSPGs. Así mismo se procedió a analizar el grado de la preservación axonal, así como procesos de remielinización mediante microscopía electrónica TEM a 105 dpi.

Tal y como muestra la Figura 42 A y B la mejoría clínica detectada previamente mediante análisis de la actividad horizontal y vertical, en los animales tratados con el inhibidor reversible de la MAGL a 85 dpi, se mantuvo a los 105 dpi a pesar de haber cesado el tratamiento 21 días antes.

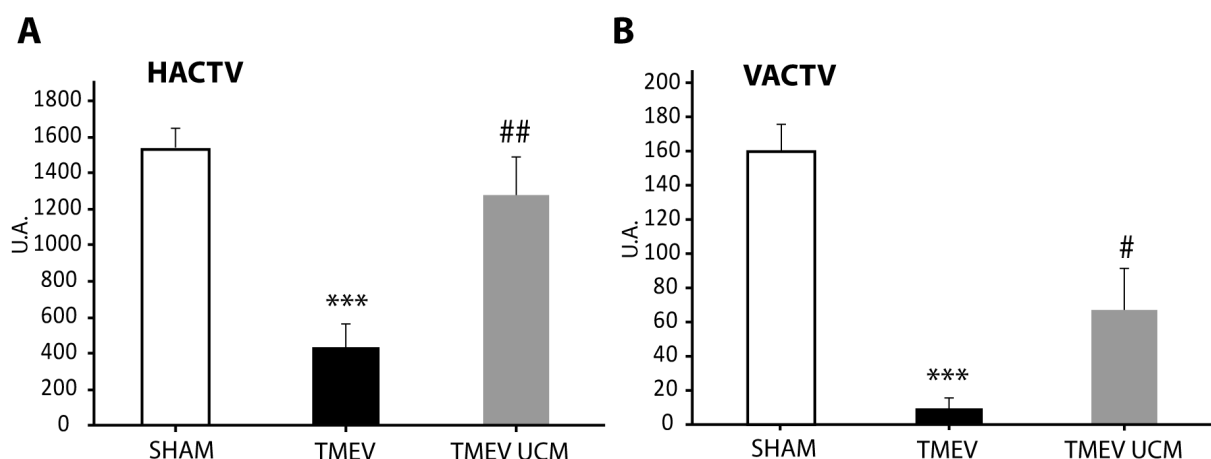


Figura 42. El UCM03025 presenta efectos a largo plazo mejorando la actividad motora de los animales infectados con el virus de Theiler. La evaluación de la actividad motora (A) actividad horizontal (B) actividad vertical, analizada mediante el test de actividad revela que los ratones tratados con el inhibidor de la hidrólisis del 2-AG durante 10 días y mantenidos sin tratamiento 21 días más hasta los 105 dpi siguen mostrando mejoría motora que aquellos tratados con vehículo. Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$ vs Sham; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs TMEV.

Al analizar la expresión de los proteoglicanos mediante inmunohistoquímica para CS-56, se observó una reducción de los mismos en la médula espinal de aquellos ratones infectados que recibieron el UCM03025 (Figura 43A). Además, a nivel de ARNm, el Fosfacán se encontraba también disminuido a los 105 dpi, viéndose en este caso además una reducción a nivel de Neurocán, sin cambios significativos en cuanto al Brevicán (Figura 43B). Al analizar los proteoglicanos a nivel proteico mediante western-blot se observó en este caso que el Fosfacán y Brevicán estaban disminuidos sin detectarse cambios significativos en cuanto al Neurocán. Se detectó así mismo, significancia estadística en cuanto al análisis proteico sumatorio de los tres proteoglicanos mediante el western-blot (Figura 43C), observándose una disminución de los mismos en los ratones tratados con UCM03025 similar a la detectada mediante el anticuerpo de CS-56.

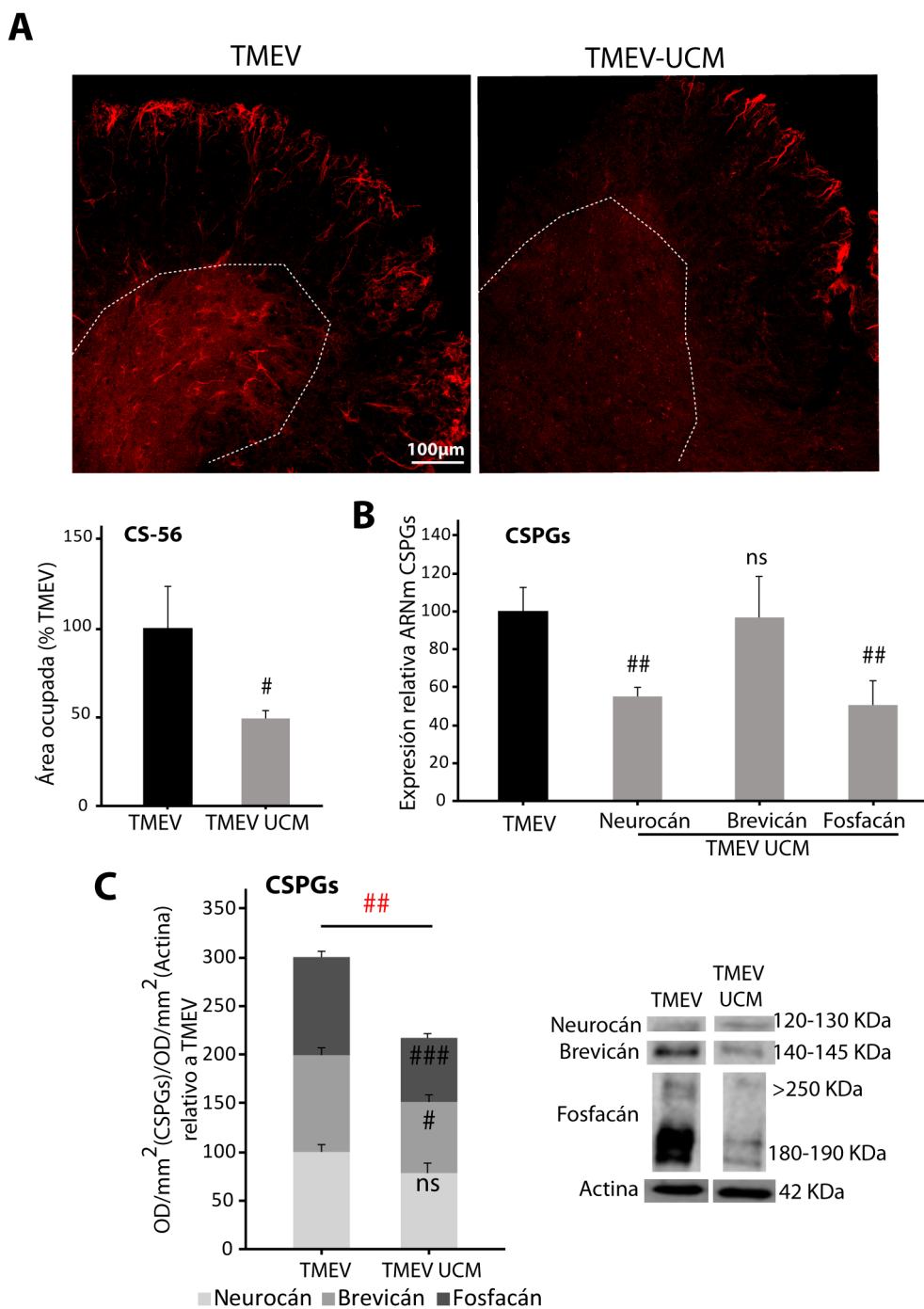


Figura 43. El inhibidor de la MAGL disminuye los niveles de CSPGs 20 días después del cese del tratamiento en el modelo de TMEV-IDD. Las fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal marcadas para el total de CSPGs (CS-56) y su cuantificación (A) indican una disminución de los mismos en aquellos ratones infectados tratados con UCM03025. Además, el análisis de los CSPGs Neurocán, Brevicán y Fosfacán mediante RT-PCR (B) y mediante western-blot (C) evidencia que los niveles de algunos CSPGs y del análisis total se mantienen disminuidos a este tiempo. Los datos se representan como la media \pm SEM: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs TMEV. La significancia en color rojo indica en análisis de los CSPGs en conjunto. ns: no significativo.

Con el objetivo de analizar la integridad axonal a los 105 dpi, se sometió a las secciones de médula espinal a una inmunohistoquímica para el anticuerpo de Neurofilamento-H (Figura 44A), así como a un análisis del tracto corticoespinal mediante el uso del trazador anterógrado BDA inyectado en corteza motora (Figura 44B). Mediante el análisis de ambas técnicas se observó que la pérdida axonal era significativamente menor en los animales tratados con el compuesto UCM03025 en comparación con aquellos tratados con vehículo.

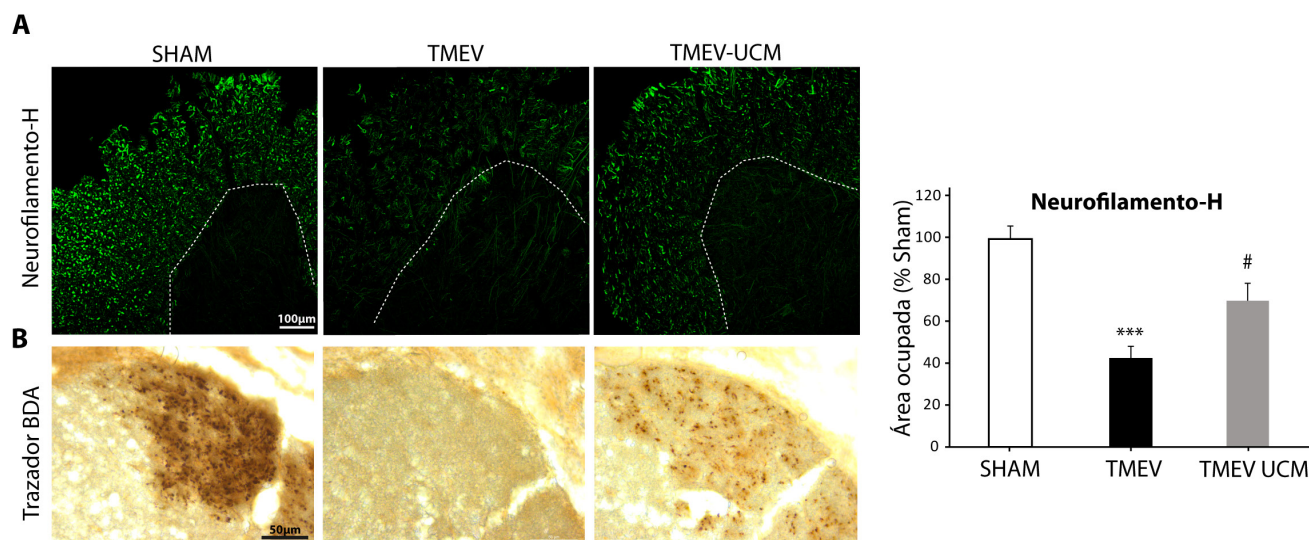


Figura 44. Los ratones infectados y tratados con el UCM03025 presentan una menor pérdida axonal a los 105 dpi. Las fotomicrografías representativas de secciones transversales de médula espinal marcadas para axones (Neurofilamento-H) y su cuantificación (A) así como el marcaje para el trazador anterógrado BDA (B), indican que en los ratones infectados y tratados con vehículo existe una mayor pérdida axonal que en aquellos tratados con UCM03025. Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs TMEV.

Finalmente, cuando las secciones de médula espinal cervical de los animales de estudio fueron analizadas mediante microscopía electrónica a los 105 dpi con el fin de detectar procesos de remielinización, se observó que esta resulta ser mucho más evidente en aquellos ratones infectados y tratados con el compuesto UCM03025, detectándose en estos ratones abundantes vainas finas de mielina de nueva formación (Figura 45A). Además, se observó un aumento significativo del número de axones mielinizados en aquellos ratones TMEV tratados con UCM03025 (899 de 1,000 axones) (Figura 45B) así como un g-ratio de axones mielinizados mayor (0.82 ± 0.0018) en comparación con el grupo SHAM (0.77 ± 0.0024) y el TMEV (0.79 ± 0.0019) (Figura 45C). Un valor de g-ratio mayor a 0.8 refleja un mayor número de axones en proceso de remielinización con vainas de mielina más finas y por lo tanto de nueva formación. Estos datos evidencian el potencial del compuesto UCM03025 y por tanto del aumento

del tono endógeno del 2-AG, para promover la remielinización y los procesos de reparación en el modelo de TMEV-IDD.

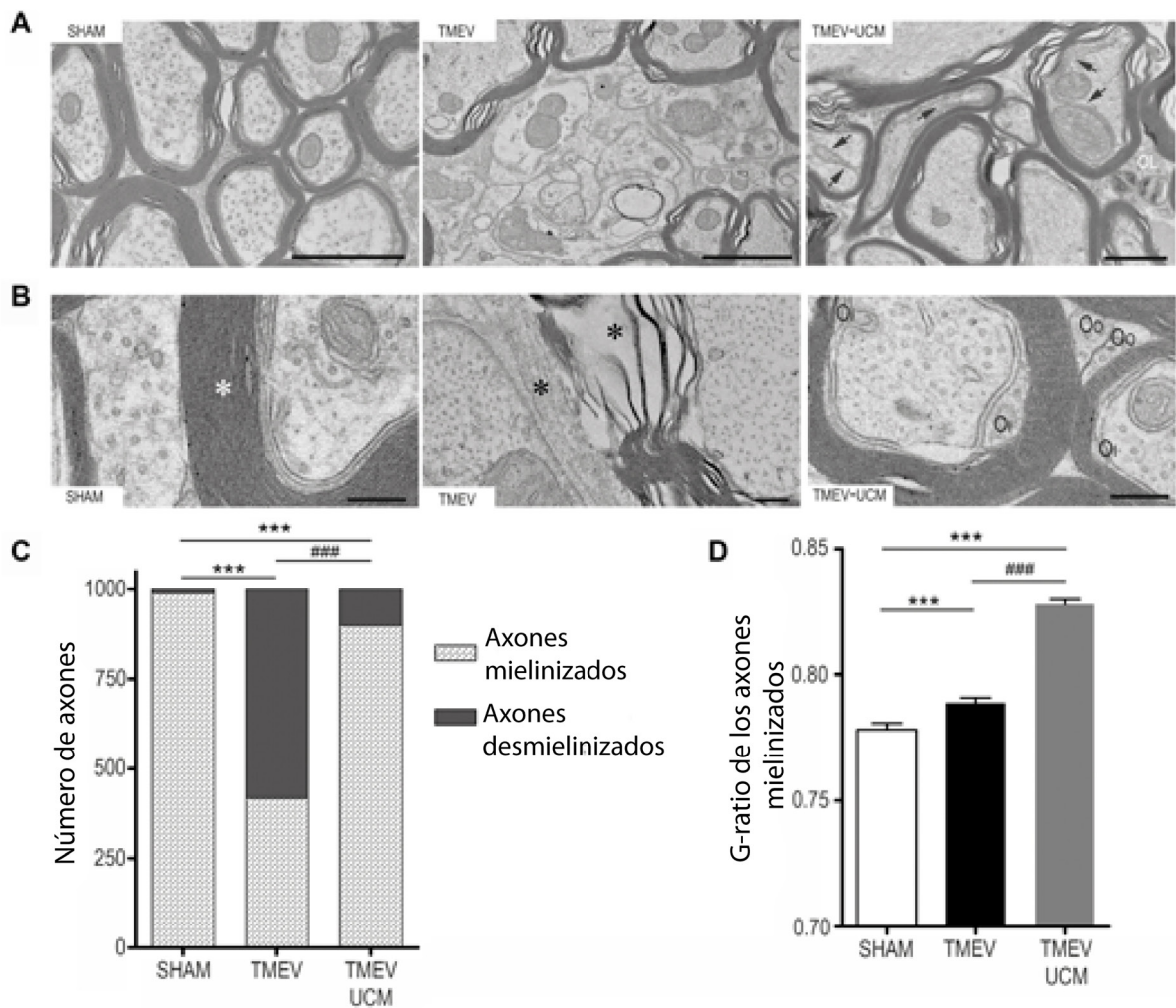


Figura 45. El tratamiento con UCM03025 incrementa los procesos de remielinización en aquellos animales infectados con el virus de Theiler a 105 dpi. El análisis ultraestructural de mielina y axones mediante microscopía electrónica a 105 dpi indica que el UCM03025 reduce el número de axones desmielinizados y promueve la remielinización (asteriscos) en la asta ventral de la médula espinal de los ratones infectados (A). El análisis del número de axones desmielinizados y mielinizados (B) así como el cálculo del g-ratio (C) muestra un aumento de los procesos de remielinización, así como del número de axones mielinizados en los ratones que recibieron tratamiento con el UCM03025. Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$ vs Sham; ### $p < 0,001$ vs TMEV.

Los resultados obtenidos en el modelo de TMEV-IDD, indican que: el tratamiento con el compuesto UCM03025 de forma terapéutica y una vez comenzada la sintomatología, mejora significativamente los déficits motores asociados al modelo. Una menor disfunción motora se observa así mismo en aquellos ratones TMEV que reciben directamente 2-AG en el ventrículo. La mejora sintomatológica producida por el UCM03025 se ve revertida en coadministración con antagonistas de los receptores CB1 y CB2. El análisis histológico en médula espinal de los

animales TMEV revela que el UCM03025 disminuye la infiltración de leucocitos en la médula espinal, así como la reactivación microglial. Además, se observa un aumento en la proliferación de los oligodendrocitos, así como un aumento del número de oligodendrocitos maduros, efecto que se ve acompañado por una disminución de la acumulación de CSPGs. Todo ello da lugar a una menor pérdida axonal, así como a un aumento del proceso de remielinización en aquellos ratones infectados y tratados con el inhibidor reversible de la MAGL.

RESUMEN PARTE 3:

Se concluye de esta tercera parte de la presente Tesis doctoral que, tras la administración de forma terapéutica del inhibidor reversible de la MAGL, el UCM03025, en dos modelos experimentales diferentes de esclerosis múltiple como son el modelo de EAE, y el modelo de TMEV, se produce una mejoría significativa de los déficits neurológicos presentes en ambos modelos. Además, el tratamiento con UCM03025 en el modelo de TMEV-IDD disminuye la expresión de CSPGs y la inflamación en la médula espinal, produciéndose un aumento del número de oligodendrocitos proliferativos, así como del número de oligodendrocitos maduros llevando todo ello a una menor pérdida axonal, así como a un aumento de los procesos de remielinización.

Los datos recopilados en ambos modelos experimentales revelan la importancia de aumentar el tono endocannabinoide del 2-AG como mecanismo para disminuir la inflamación y promover los procesos endógenos de reparación en modelos murinos de EM.

PARTE 4. MODULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE CSPGs POR 2-AG E INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE LA MAGL EN ASTROCITOS EN CULTIVO

Los astrocitos son las principales células responsables del aumento de los CSPGs en situaciones patológicas por exposición a citoquinas como TGF- β , siendo esta una de las citoquinas mayormente implicadas en la formación de la cicatriz glial (Silver and Miller 2004). Se ha descrito previamente que el TGF- β produce un aumento en la activación y proliferación de astrocitos in vitro (Dyck, Alizadeh et al. 2015, Johns, Babcock et al. 1992) así como un aumento de la expresión de CSPGs, principalmente del Neurocán y Brevicán (Asher, Morgenstern et al. 2000, Hamel, Mayer et al. 2005, Schachtrup, Ryu et al. 2010). Debido al potente papel inhibitorio de los CSPGs sobre los procesos de regeneración, supone de gran interés modular la ruta de síntesis de CSPGs liberados por los astrocitos en situaciones de daño del SNC.

En base a los resultados previamente mostrados en relación a los efectos del aumento del tono endógeno del 2-AG sobre la disminución de la expresión de CSPGs, así como de una menor reactividad astrogliar, quisimos evaluar el efecto del 2-AG, UCM03025 y otros inhibidores de la hidrólisis del 2-AG, en la síntesis de proteoglicanos por astrocitos de rata en cultivo.

4.1. Efecto del 2-AG en la expresión de CSPGs en astrocitos en cultivo. Implicación del receptor CB2.

Para investigar el efecto del 2-AG sobre astrocitos purificados in vitro y las posibles rutas de señalización implicadas, se realizaron cultivos de astrocitos primarios procedentes de cerebros de ratas postnatales y se estimularon en primer lugar con las citoquinas TGF- β 1 (20ng/ml) y bFGF (10ng/ml), citoquinas que según la literatura inducen previamente un aumento de síntesis de proteínas de matriz extracelular (Flanders, Ludecke et al. 1993, Smith and Hale 1997, Smith and Strunz 2005). En primer lugar, se analizó la expresión de ARNm del proteoglicano Brevicán a las 24h de la administración del estímulo TGF- β 1+ bFGF en presencia o ausencia de 2-AG a 100 nM, 500 nM y 1 μ M para determinar la dosis efectiva. Como muestra la Figura 46A, la dosis que redujo significativamente la expresión del Brevicán fue la de 100 nM, no viéndose efecto significativo a 500 nM ni a 1 μ M. A continuación, se evaluó la expresión de Neurocán mediante inmunocitoquímica y se observó que el marcaje era evidente en aquellos astrocitos estimulados, siendo apenas detectable en aquellos que habían sido cotratados con 2-AG a la

dosis de 100 nM (Figura 46B).

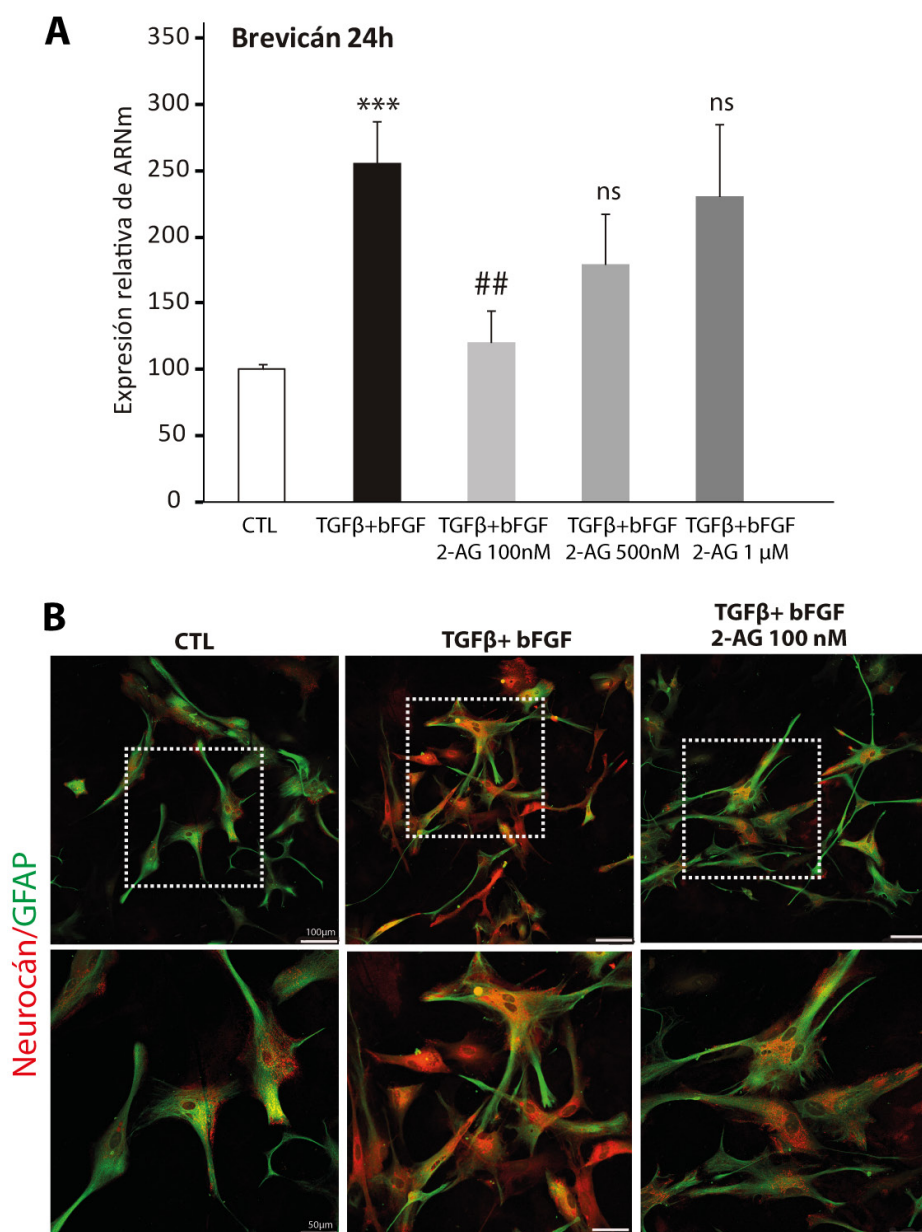


Figura 46. Las citoquinas TGF-β1+ bFGF inducen la expresión de Neurocán y Brevicán en astrocitos en cultivo. El endocannabinoide 2-AG reduce su expresión a una dosis efectiva de 100 nM (A) Inmunocitoquímica para Neurocán (rojo) y GFAP (verde) en cultivo de astrocitos de rata estimulados con TGF-β1 20 ng/ml y bFGF 10 ng/ml y tratados con 2-AG a una dosis de 100 nM durante 24 horas. (B) Análisis de la expresión del ARN mensajero de Brevicán evaluado mediante RT-PCR en astrocitos tratados con TGF-β1 20 ng/ml bFGF 10 ng/ml y 2-AG a las dosis de 100 nM, 500 nM, 1 μM durante 24 horas. Los datos se representan como la media ± SEM: *** $p < 0,001$ vs CTL; ** $p < 0,01$ vs TGF-β1 bFGF.

Ya que, en la literatura científica, la administración de la citoquina TGF- β induce una expresión de CSPGs similar a la provocada en coadministración junto con la citoquina bFGF, se decidió estimular a los astrocitos únicamente con TGF- β con el fin de identificar los receptores y las rutas implicadas en el efecto del 2-AG sobre la inducción de los proteoglicanos.

Para ello, en primer lugar, se observó que mediante estimulación con TGF- β 1, 20 ng/ml, se producía un aumento del marcaje para Neurocán similar a la observada con TGF- β +bFGF mediante inmunocitoquímica. La administración de 2-AG a una dosis de 100 nM 30 min antes o en coadministración con TGF- β 1 durante 24 horas produjo una disminución en el marcaje para el proteoglicano respecto a aquellos astrocitos únicamente estimulados con la citoquina (Figura 47).

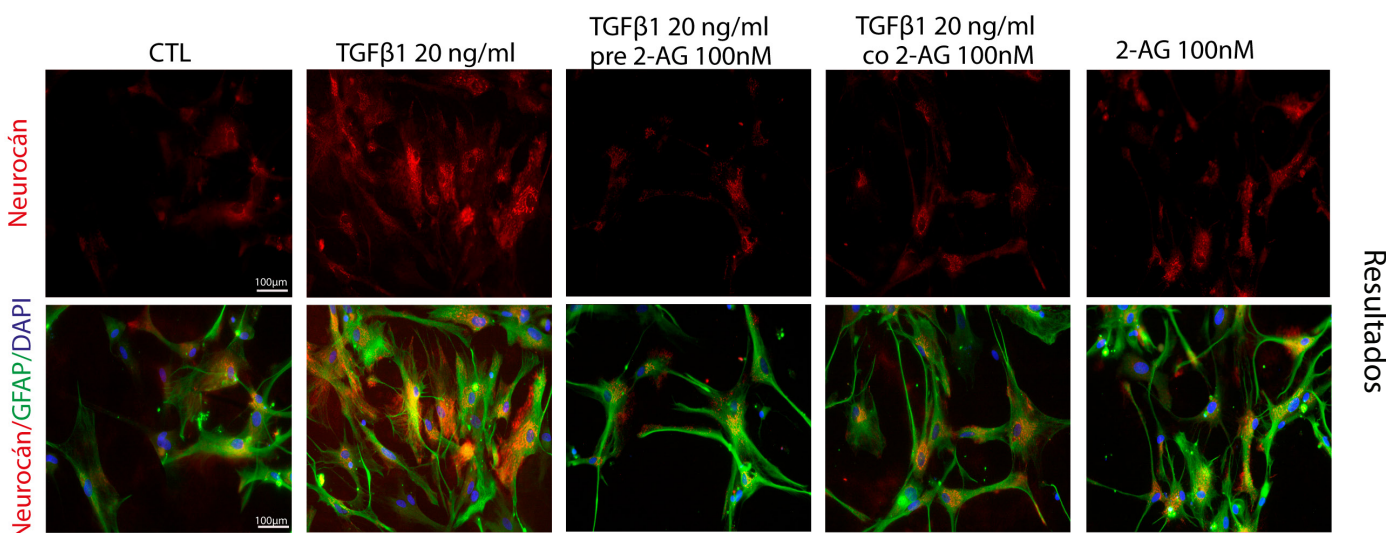


Figura 47. El tratamiento únicamente con TGF- β 1 es suficiente para aumentar la expresión de Neurocán en astrocitos en cultivo. El endocannabinoide 2-AG reduce su expresión a una dosis de 100nM en coadministración o 30 minutos antes que el estímulo (A) La inmunocitoquímica para Neurocán (rojo) y GFAP (verde) en astrocitos de rata estimulados únicamente con TGF- β 1 20 ng/ml y tratados 30 minutos antes o en coadministración con 2-AG a una dosis de 100 nM durante 24 horas muestra que la citoquina TGF- β 1, sola, es capaz de inducir la expresión de Neurocán, niveles de expresión que se encuentran reducidos en aquellos astrocitos tratados con 2-AG.

Para continuar con el estudio del efecto del 2-AG sobre la expresión de diferentes CSPGs, se llevó a cabo el análisis de tres proteoglicanos, Neurocán, Brevicán y Fosfacán en lisado de astrocitos mediante la técnica de western-blot a las 24h de tratamiento. Además, para determinar los receptores implicados en la acción del 2-AG, se trató a los astrocitos 30 minutos antes de la administración de 2-AG con antagonistas para el receptor cannabinoide CB1 (SR14176, 1 μ M) y para el receptor CB2 (AM630, 1 μ M). Como muestra la Figura 48, los niveles de los

proteoglicanos Neurocán (A), Brevicán (B) y Fosfacán (C) se encontraban aumentados en astrocitos estimulados por TGF-β1, inducción que se vio disminuida en los tres proteoglicanos tras el tratamiento con 2-AG, tanto si había sido administrado en pre-tratamiento 30 min antes como co-administrado junto al TGF-β1. La administración única del 2-AG no produjo aumento de la expresión de los proteoglicanos, incluso redujo sus niveles de manera significativa respecto al nivel control en el caso de Neurocán y Fosfacán. Al utilizar antagonistas de los receptores CB1 y CB2, se observó que el efecto del 2-AG disminuyendo los niveles de Neurocán era revertido tras la administración de un antagonista para el receptor CB2, aunque no se vio cambio significativo en caso del Brevicán. No se observaron cambios significativos en cuanto al efecto del 2-AG en coadministración con el antagonista para el receptor CB1 para ninguno de los proteoglicanos. Por último, los antagonistas administrados en solitario tampoco mostraron ningún efecto en la expresión de los diferentes proteoglicanos.

Resultados

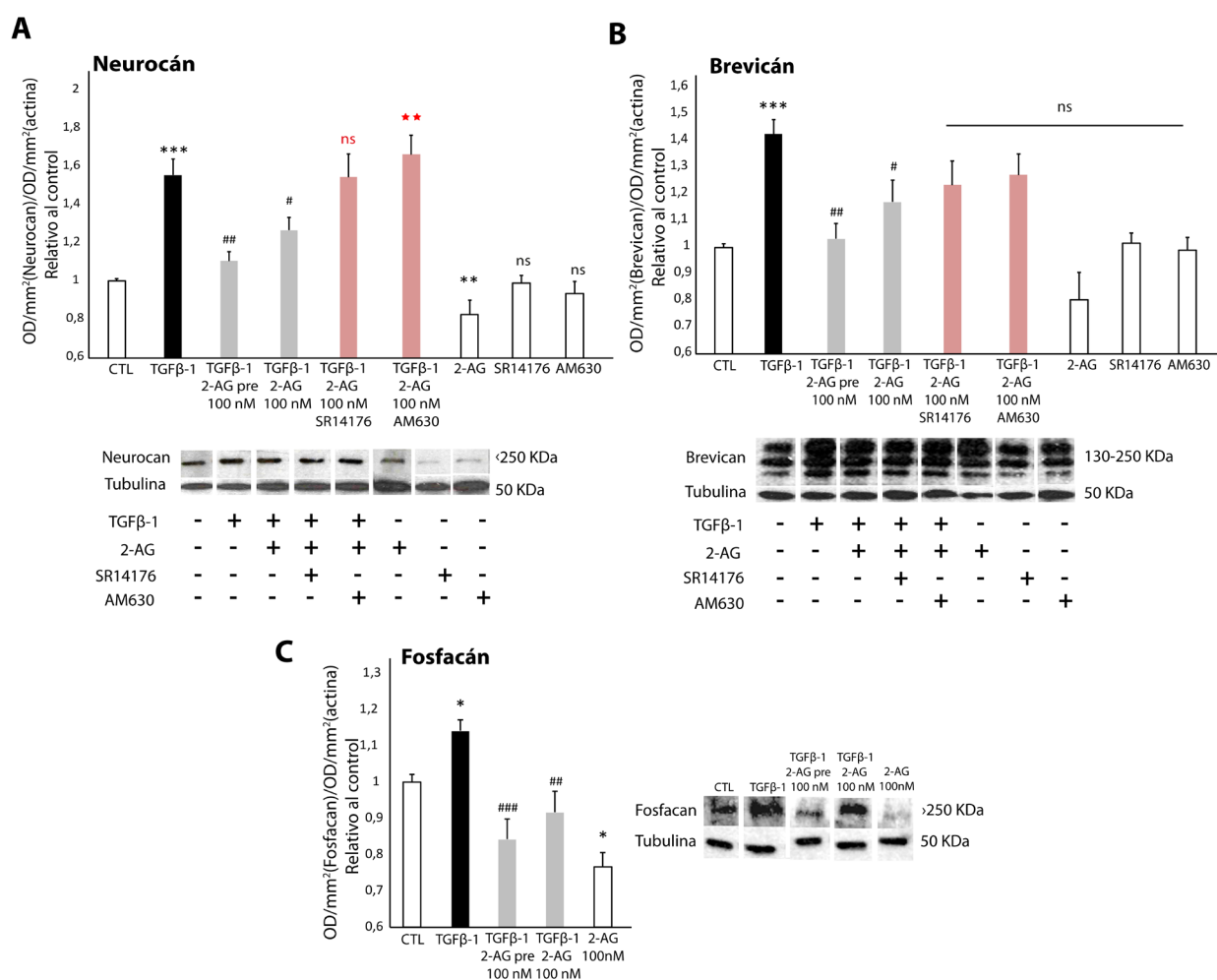


Figura 48. El 2-AG disminuye la expresión de Brevicán, Fosfacán y Neurocán en astrocitos in vitro actuando a través del receptor CB2 en el caso del Neurocán. Análisis de la expresión mediante western-blot de (A) Neurocán (B) Brevicán y (C) Fosfacán en astrocitos de rata estimulados con TGF-β1 20 ng/ml y en coadministración o 30 minutos antes con 2-AG (100 nM) durante 24 horas. Los antagonistas de los receptores CB1 (SR14176, 1 μM) y CB2 (AM630, 1 μM) fueron administrados 30 minutos antes del tratamiento con 2-AG. Los datos se representan como

la media \pm SEM: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs CTL; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs TGF- β 1. □ $p < 0,01$ vs TGF- β 1+2-AG.

4.2. Efecto de los inhibidores de la MAGL en la expresión de CSPGs en astrocitos en cultivo.

Dado el efecto de la administración directa del 2-AG sobre los astrocitos in vitro disminuyendo la expresión de los CSPGs, a continuación, se evaluó este mismo efecto, pero aumentando el tono endógeno de 2-AG mediante la administración de diferentes inhibidores de las enzimas MAGL y ABDH6, enzimas responsables del 80% y 6% de la hidrólisis del 2-AG respectivamente. Para ello se determinó la expresión de los diferentes proteoglicanos en astrocitos estimulados con TGF- β 1, en coadministración con dos inhibidores de la MAGL, uno reversible (UCM03025) y uno irreversible (JZL 184) y un inhibidor de la enzima ABDH6 (WWL70).

Para ello, los astrocitos fueron estimulados con TGF- β 1 20 ng/ml con o sin los siguientes inhibidores de las enzimas de hidrólisis del 2-AG (UCM03025 1 μ M, JZL 184 1 μ M, WWL70 10 μ M) durante 24 horas. Pasado ese tiempo se analizó la expresión de los proteoglicanos Neurocán y Brevicán en el lisado celular mediante western-blot. Como muestra la Figura 49, el incremento en los niveles de Neurocán (A) y Brevicán (B) en aquellos astrocitos estimulados con TGF- β 1 se vieron reducidos en aquellos tratados con los inhibidores de las enzimas de hidrólisis del 2-AG.

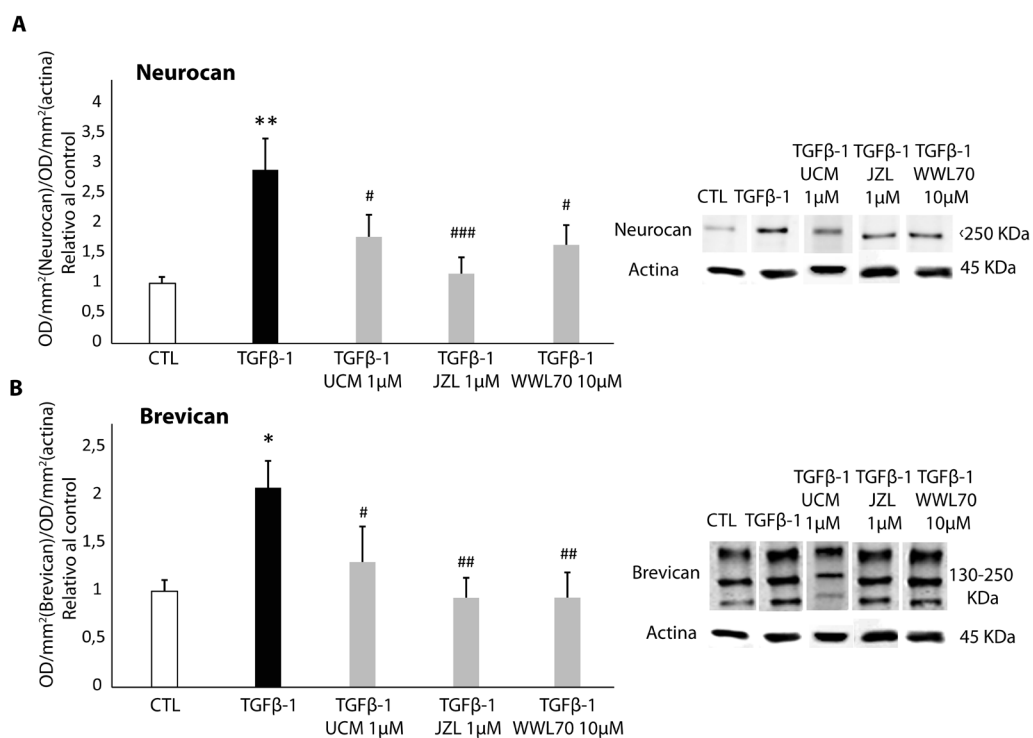


Figura 49. El tratamiento con distintos inhibidores de enzimas de hidrólisis del 2-AG disminuyen la expresión de Neurocán y Brevicán en astrocitos en cultivo. Análisis de la expresión mediante western-blot de (A) Neurocán y (B) Brevicán en astrocitos de rata estimulados con TGF- β 1 20ng/ml y tratados con dos inhibidores de la enzima MAGL (reversible, UCM03025 1 μ M; irreversible, JZL 184 1 μ M) y de la enzima ABDH6 (WWL70 10 μ M) durante 24 horas. Los datos se representan como la media \pm SEM: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs CTL; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs TGF- β 1.

4.3. Efecto del 2-AG e inhibidores de su hidrólisis en la liberación del proteoglicano Neurocán al sobrenadante en astrocitos en cultivo.

La estructura proteica de los CSPGs es sintetizada en el retículo endoplasmático, estructura a la que se le unen a posteriori cadenas de glicosaminoglicanos, así como los grupos sulfato en el Golgi, momento en el que son embebidos en vesículas y liberados al medio extracelular (Silbert and Sugumaran 2002). Ya que la mayoría de los proteoglicanos tienen que ser liberados al medio extracelular para realizar sus funciones, a excepción del proteoglicano NG2 que aparte de ser liberado al medio, también puede mantenerse anclado a la membrana celular, quisimos determinar si la reducción observada de la expresión de Neurocán en astrocitos estimulados con TGF- β 1 y tratados con 2-AG e inhibidores de su hidrólisis, también se ve reflejada en una disminución del mismo al medio extracelular, es decir, al sobrenadante celular. Para ello se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente y a las 24 horas de tratamiento se cogió el sobrenadante celular con el que se realizó un ensayo de ELISA para el proteoglicano Neurocán.

Tal y como muestra la Figura 50 se pudo detectar una mayor cantidad del proteoglicano Neurocán en el sobrenadante de los astrocitos estimulados con TGF- β 1, valores que se encontraron reducidos en aquellos astrocitos tratados con 2-AG. Se observó así mismo una disminución de los valores de Neurocán en aquellos astrocitos tratados con los dos inhibidores de la enzima MAGL, el reversible (UCM03025) y el canónico irreversible (JZL 184) no encontrándose en este caso efecto alguno a este nivel en el caso del inhibidor de la enzima de hidrólisis ABDH6 (WWL70).

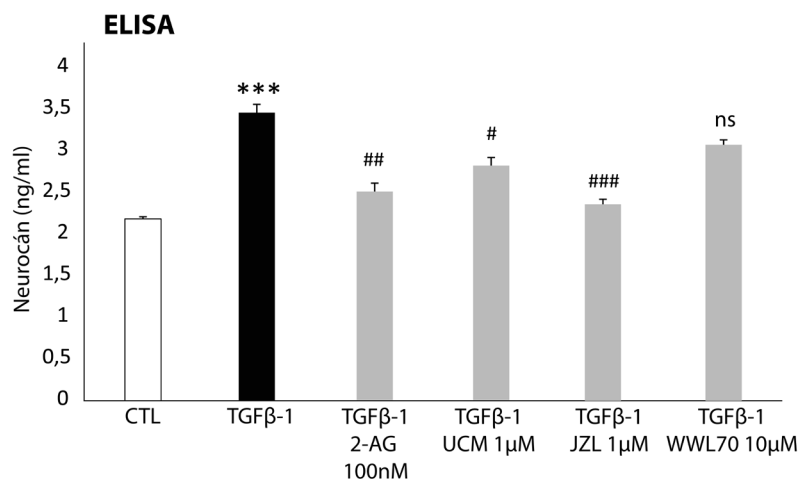


Figura 50. El tratamiento con 2-AG, así como con inhibidores de la MAGL disminuyen la liberación del proteoglicano Neurocán al medio extracelular en astrocitos en cultivo. El análisis mediante ELISA de los niveles de Neurocán en los sobrenadantes de astrocitos de rata estimulados con TGF-β1 20 ng/ml y tratados con 2-AG (100 nM), UCM03025 (1 μM), JZL184 (1 μM) y WWL70 (10 μM) durante 24 horas muestra una reducción de los niveles de Neurocán en aquellos astrocitos tratados con 2-AG y con los inhibidores de la MAGL. Los datos se representan como la media ± SEM: *** $p < 0,001$ vs CTL; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ### $p < 0,001$ vs TGF-β1.

4.4. Efecto del 2-AG sobre las vías de señalización implicadas en la síntesis de los CSPGs.

Trabajos previos muestran que una de las rutas de señalización de la síntesis de los CSPGs depende de la ruta canónica de SMAD (Schachtrup, Ryu et al. 2010, Susarla, Laing et al. 2011). Así, en esta ruta, la activación del receptor de TGF-β induce una fosforilación de las proteínas SMAD2 y SMAD3 que da lugar a la generación de un complejo de señalización SMAD formado tras la unión de la proteína SMAD4 (Massague, Seoane et al. 2005). Sin embargo, estudios publicados en el año 2015 por Jahan y Hannila (Jahan and Hannila 2015) evidenciaron que la síntesis de los CSPGs inducida por TGF-β1, no se realizaba a través de la señalización por las proteínas SMAD, sino que era mediada a través de la ruta de PI3K/Akt/mTOR.

Con el propósito de evaluar si el 2-AG es capaz de regular alguna de las dos vías descritas hasta la fecha implicadas en la síntesis de CSPGs, la ruta de SMAD y la ruta de PI3K- mTOR-Akt, se realizó un análisis de los niveles de fosforilación de las proteínas implicadas en ambas rutas, mediante western-blot, en lisado de astrocitos de rata estimulados y tratados con 2-AG (100 nM) a 1h de tratamiento. Además, con el fin de determinar los receptores implicados en la acción del 2-AG a este nivel, los astrocitos fueron tratados 30 minutos antes de la administración de 2-AG, con antagonistas para el receptor cannabinoide CB1 (SR14176, 1 μM) y para el receptor CB2 (AM630, 1 μM).

En primer lugar, en relación a la ruta canónica de síntesis de CSPGs, la ruta de SMAD, se observó como muestra la Figura 51 que la fosforilación tanto de SMAD2 como de SMAD3 se encontraron significativamente aumentadas en los astrocitos estimulados con TGF- β 1 (20 ng/ml), fosforilación que se vio reducida en el caso de la proteína SMAD2 tras la administración del 2-AG (100 nM). Además, este efecto se vio revertido en coadministración con el antagonista de CB2, indicando que el 2-AG podría estar ejerciendo este efecto a través de dicho receptor.

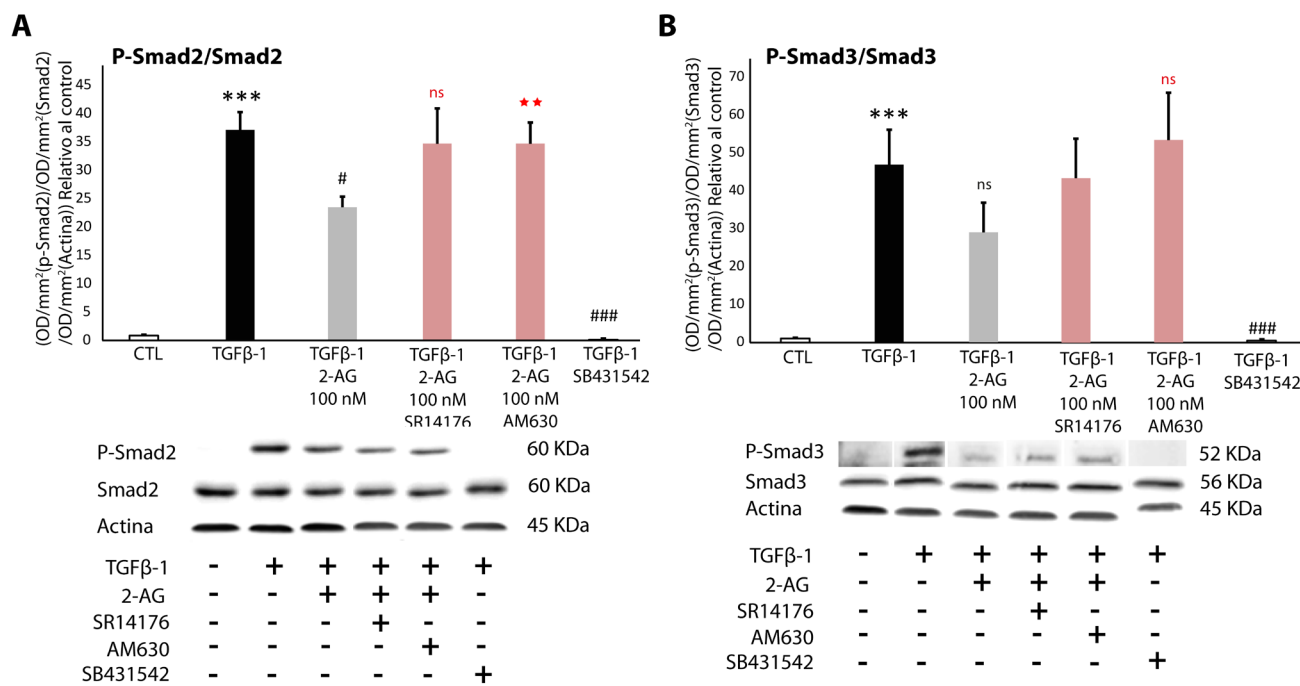


Figura 51. Los astrocitos estimulados con TGF- β 1 aumentan la señalización vía SMAD2/SMAD3 viéndose esta disminuida con el tratamiento con 2-AG. Este efecto es revertido con un antagonista del receptor CB2. Análisis de la expresión mediante western-blot de (A) fosforilación de SMAD2 y (B) fosforilación de SMAD3 en astrocitos de rata estimulados con TGF- β 1 20 ng/ml y tratados con 2-AG (100 nM) durante 24 horas. Los antagonistas de los receptores CB1 (SR14176, 1 μ M) y CB2 (AM630, 1 μ M) fueron administrados 30 minutos antes del tratamiento con 2-AG. Se utilizó un inhibidor de la ruta de señalización, el compuesto SB431542 (20 μ M). Los datos se representan como la media \pm SEM: *** $p < 0,001$ vs CTL; # $p < 0,05$ ### $p < 0,001$ vs TGF- β 1; □□ $p < 0,01$ vs TGF- β 1+2-AG.

En segundo lugar, se evaluó el efecto del 2-AG en la otra vía que se había descrito involucrada en la síntesis de CSPGs mediada por TGF- β , la ruta de PI3K- mTOR -Akt. Para ello se llevó a cabo el análisis de la fosforilación de Akt y mTOR mediante western-blot. Como puede observarse en la Figura 52, la fosforilación tanto de Akt (A) como de mTOR (B) se encontraban también disminuidas en los astrocitos tratados con 2-AG, efecto revertido en el caso de mTOR, en aquellos astrocitos a los que se les coadministró el endocannabinoide junto con el antagonista de CB2.

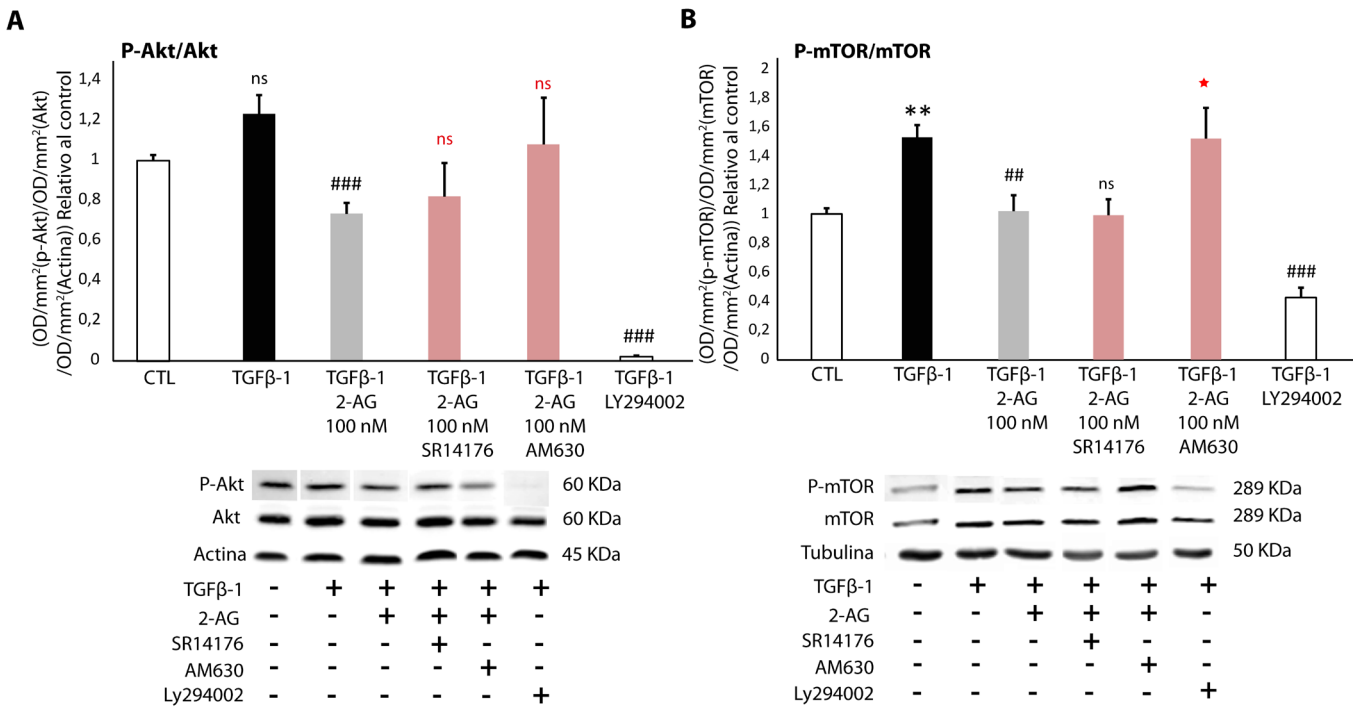


Figura 52. Los astrocitos estimulados con TGF-β1 aumentan la señalización vía Akt-mTOR viéndose esta disminuida con el tratamiento con 2-AG. Este efecto es mediado a través del receptor CB2. Análisis de la expresión mediante western-blot de (A) fosforilación de Akt y (B) fosforilación de mTOR en astrocitos de rata estimulados con TGF-β1 20 ng/ml y tratados con 2-AG (100 nM) durante 24 horas. Los antagonistas de los receptores CB1 (SR14176, 1 μM) y CB2 (AM630, 1 μM) fueron administrados 30 minutos antes del tratamiento con 2-AG. Se utilizó un inhibidor de la ruta de señalización, el compuesto LY 294002 (10 μM). Los datos se representan como la media ± SEM: ** p<0,01 vs CTL; ## p<0,01 ### p<0,001 vs TGF-β1; □ p<0,05 vs TGF-β1+2-AG.

RESUMEN 4:

Se resume de la cuarta y última parte de la presente Tesis doctoral que los astrocitos purificados *in vitro* y tratados con la citoquina TGF- β 1 durante 24 horas, aumentan la expresión de los proteoglicanos Neurocán, Brevicán y Fosfacán. Que al tratar esos astrocitos con el endocannabinoide 2-AG, así como con inhibidores de dos de sus enzimas de hidrólisis, la MAGL y la ABDH6, se produce una disminución de la expresión de dichos proteoglicanos a nivel celular, además el efecto del 2-AG regulando los niveles de Neurocán se ven revertidos al administrar un antagonista del receptor CB2. Tanto el 2-AG como los dos inhibidores de la MAGL redujeron significativamente los niveles de Neurocán liberado al medio extracelular. El endocannabinoide 2-AG podría estar disminuyendo la síntesis de proteoglicanos actuando a través de la vía de señalización canónica de síntesis de proteoglicanos TGF- β /SMAD, así como a través de la vía de PI3K-Akt-mTOR pudiendo estar implicada la activación del receptor CB2 en este mecanismo.

V. DISCUSIÓN

La EM es una enfermedad desmielinizante, neurodegenerativa, de curso crónico y componente autoinmune, que produce un déficit funcional afectando a múltiples áreas del SNC. A lo largo de su evolución clínica aparecen fases inflamatorias, predominantes en las primeras etapas de la enfermedad seguidas de un estadio más tardío donde predomina la desmielinización y el daño axonal que generan como consecuencia una discapacidad permanente.

En la actualidad, las terapias dirigidas frente al componente inflamatorio de la EM mediante el uso de inmunomoduladores o inmunosupresores, han sido de gran utilidad reduciendo la aparición de los brotes, sin bien, resultan poco eficaces conforme la enfermedad progresa. Datos clínicos y experimentales apuntan a que, durante la fase progresiva, los mecanismos endógenos de remielinización y regeneración no son lo suficientemente efectivos por lo que es importante desarrollar tratamientos dirigidos a fomentar dichos procesos reparativos, así como reducir la neurotoxicidad y promover un perfil antiinflamatorio.

Entre los responsables de interferir en dichos mecanismos endógenos de reparación se encuentran los CSPGs, macromoléculas que forman parte de la matriz extracelular y que se acumulan en la llamada cicatriz glial. La cicatriz glial se genera en respuesta a una situación de daño dentro del SNC cuya función, a corto plazo, es la de limitar la expansión del daño y la inflamación (Voskuhl, Peterson et al. 2009, Hamby and Sofroniew 2010). Sin embargo, a largo plazo supone una barrera física y química para que tengan lugar los procesos de remielinización y regeneración axonal (Cregg, DePaul et al. 2014).

1. Expresión de los CSPGs y su inhibición en el modelo de TMEV-IDD

Durante los procesos de desmielinización crónica se produce un aumento en la expresión de los niveles de CSPGs formando parte de la cicatriz astrogliol (Lau, Keough et al. 2012, Siebert and Osterhout 2011). Los CSPGs impiden la remielinización y regeneración axonal debido a su capacidad para inhibir la diferenciación de los progenitores de oligodendrocitos, así como el crecimiento axonal y la supervivencia neuronal (Dyck, Alizadeh et al. 2015, Lang, Cregg et al. 2015, Zhou, Li et al. 2014). De hecho, mediante terapias que digieren de manera enzimática las cadenas GAGs de los CSPGs (Bartus, James et al. 2014, Keough, Rogers et al. 2016, Lau, Keough et al. 2012, Pendleton, Shamlott et al. 2013, Siebert and Osterhout 2011) o que inciden en su ruta de síntesis o bloquean los receptores a través de los cuales los CSPGs ejercen sus efectos (Lang, Cregg et al. 2015), se revierten estos efectos inhibitorios in vitro e in vivo promoviendo la remielinización y la regeneración axonal.

El modelo de TMEV-IDD es un modelo viral de EM que modeliza su variante primaria progresiva. En él se dan procesos de desmielinización, así como de disfunción axonal y neurológica en los que se pueden estudiar la influencia de los CSPGs. En este contexto, se ha descrito previamente que en el modelo de TMEV-IDD se produce remielinización espontánea en las zonas de lesión (Denic, Wootla et al. 2014, Mecha, Carrillo-Salinas et al. 2013) sin embargo, se postula que esa remielinización no es efectiva en las fases más avanzadas de la patología debido, en parte, al incremento en los niveles de CSPGs que se ha observado en este modelo de EM (Feliu, Moreno-Martet et al. 2015, Haist, Ulrich et al. 2012).

El primer objetivo del presente estudio fue analizar en detalle la expresión de diferentes CSPGs en dos periodos de tiempo durante la fase crónica del modelo de TMEV-IDD. El análisis mediante el uso del anticuerpo CS-56 indicó que estas macromoléculas se encuentran altamente expresadas en la sustancia blanca de la médula espinal de los animales infectados con el virus de Theiler, aumento que ha sido previamente observado en otros modelos experimentales de EM como el modelo de EAE (Keough et al. 2016), en modelos de desmielinización por lisolecitina y por cuprizona (Hibbits, Yoshino et al. 2012, Keough, Rogers et al. 2016, Lau, Keough et al. 2012), y en modelos de lesión medular (Gris, Tighe et al. 2007). Resulta de interés que la acumulación de los CSPGs que observamos en nuestro estudio está asociada a zonas

desmielinizadas con elevada astrogliosis. Se ha descrito que los astrocitos presentes en la cicatriz glial tienen un mayor número de procesos filamentosos con aumento en la expresión de GFAP, Vimentina y Nestina (Norton, Aquino et al. 1992). Estos datos concuerdan con lo descrito en nuestro estudio donde observamos un incremento en la expresión de GFAP y Vimentina en la médula espinal de los animales TMEV. Además, aquellos astrocitos reactivos Vimentina positivos lo eran también para el marcador de CSPGs CS-56, indicando además que esta célula glial es la principal fuente de síntesis de los CSPGs de acuerdo con otros estudios (Hamby and Sofroniew 2010). En concordancia con el incremento en el marcaje por inmunohistoquímica para CS-56, los proteoglicanos Fosfacán, Brevicán y Neurocán estaban aumentados tanto a nivel de ARNm como a nivel total proteico, confirmando el incremento en la síntesis de CSPGs en la fase crónica del modelo de Theiler.

La mayoría de las terapias dirigidas a solucionar distintos tipos de daño en el SNC sugieren la eliminación de la cicatriz glial a través de la inhibición de la astrogliosis, aunque esta aproximación puede impedir también los procesos de regeneración (Anderson, Burda et al. 2016), lo que sugiere que algunos astrocitos presentan propiedades neuroprotectoras (Faulkner, Herrmann et al. 2004). Por lo tanto, más que inhibir la funcionalidad de los astrocitos por completo habría que incidir directamente en la síntesis de aquellas moléculas inhibitorias producidas por estas células gliales. Se considera así que la administración de compuestos que impidan la síntesis y acumulación de los CSPGs constituye una estrategia interesante para facilitar los procesos de remielinización y regeneración axonal en patologías desmielinizantes (Soleman, Filippov et al. 2013). De hecho, la administración de la enzima bacteriana condroitinasa ABC se ha utilizado ampliamente en modelos de lesión medular donde ha mostrado tener efectos positivos promoviendo la regeneración axonal. Sin embargo, esta enzima requiere su administración de manera focal en la zona de lesión (Bartus, James et al. 2014, Siebert, Stelzner et al. 2011, Zhao and Fawcett 2013), hecho que la descarta para su uso en modelos de EM, donde las lesiones no son tan fácilmente localizables ni accesibles. Es por ello por lo que en nuestro estudio se han utilizado dos compuestos que inciden en diferentes puntos de la ruta de síntesis y anclaje de las cadenas GAGs a la estructura proteica del proteoglicano, el xilósido y un análogo de la glucosamina, la fluorosamina, administrados por vía sistémica durante la fase crónica de TMEV-IDD. De esta manera evitan la secreción de los CSPGs al medio

extracelular.

En nuestro modelo de estudio, tanto el xilósido como la fluorosamina redujeron la expresión de los proteoglicanos recuperándose la función motora de los animales infectados con TMEV, si bien pareció ser más efectivo el tratamiento con xilósido. Estos hallazgos concuerdan con otros estudios realizados en modelos desmielinizantes como el modelo de lisolecitina y de EAE donde el tratamiento con dichos compuestos redujeron así mismo la expresión de los CSPGs y la puntuación clínica en el caso del modelo de EM (Keough, Rogers et al. 2016, Lau, Keough et al. 2012). En modelos de lesión medular la administración de inhibidores de la síntesis de CSPGs también disminuyeron la acumulación de CSPGs ejerciendo un efecto terapéutico (Rolls, Shechter et al. 2008). De especial relevancia es la reciente descripción de que la matriz generada in vitro por astrocitos tratados con fluorosamina resulta menos inhibitoria en la diferenciación de los oligodendrocitos (Keough, Rogers et al. 2016).

La mejora en la sintomatología observada tras la inhibición de la síntesis y acumulación de los CSPGs señala por tanto la importancia de las mismas en la evolución progresiva y en la fisiopatología del modelo de TMEV-IDD, subrayando el potencial terapéutico que supondría su inhibición en patologías desmielinizantes. Sin embargo, existe una limitación para el uso terapéutico del xilósido ya que no solo incide en la ruta de síntesis de CSPGs, sino que afecta también a la síntesis de otros proteoglicanos del tipo heparan sulfatos y dermatán sulfatos, pudiendo limitar la producción de proteínas necesarias también para la estabilidad de la matriz extracelular. En este aspecto, un compuesto que incida en el paso de síntesis de las cadenas GAGs o en su polimerización o sulfatación y no antes, resultaría más interesante desde el punto de vista terapéutico. La fluorosamina actuaría a este nivel impidiendo la formación de los disacáridos de las cadenas GAGs, sin embargo, podría actuar como un sustrato alternativo de la GlcNAc y no como un inhibidor competitivo como sugiere el estudio de Keough et al 2016, lo que indicaría que la inhibición de la síntesis de CSPGs no es completa. Este podría ser el motivo por el cual con la fluorosamina no llegamos a observar el mismo efecto terapéutico que alcanzamos con el xilósido.

Junto con estas limitaciones, habría que tener también en cuenta que tanto la fluorosamina como el xilósido reducen la secreción de los CSPGs, pero no la producción de otros

factores inhibitorios presentes en la zona de lesión como son Notch, Wnt, Lingo-1 o las semaforinas (Huang, Fancy et al. 2011) que podrían seguir limitando la remielinización y regeneración axonal.

2. Eficacia terapéutica del inhibidor de la enzima MAGL en dos modelos experimentales de EM

Con el fin de promover los mecanismos de regeneración sería necesaria la combinación de terapias que permitan la neutralización del ambiente inhibitorio generado en las zonas de lesión, y que promuevan la diferenciación de los oligodendrocitos permitiendo de esta manera la creación de ambientes más favorables para facilitar el proceso de remielinización y regeneración.

Con objeto de investigar si el aumento del tono endógeno de 2-AG podría ser beneficioso en modelos experimentales de EM, usamos un inhibidor selectivo y reversible de la MAGL denominado UCM03025. Tras comprobar su capacidad para aumentar los niveles de 2-AG en la médula espinal de los animales de estudio, se observó que su administración mejoraba la sintomatología asociada tanto al modelo de EAE como al de TMEV-IDD. En el caso de TMEV-IDD, dicho efecto era dependiente de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, ya que el bloqueo de ambos revertía la mejoría en la actividad motora espontánea a niveles de los ratones que habían sido tratados con vehículo. Ambos receptores se han visto implicados en las acciones beneficiosas, ejercidas por 2-AG en un modelo de lesión medular, reduciendo la expansión de la lesión, así como el daño en la sustancia blanca (Arevalo-Martin, Garcia-Ovejero et al. 2010). Además la implicación de los receptores CB1 y CB2 en la actividad del 2-AG se ha mostrado en investigaciones previas según las cuales ambos receptores son necesarios para inducir la proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos in vitro (Gomez, Arevalo-Martin et al. 2010, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2015). El efecto beneficioso del aumento del tono endógeno de 2-AG sobre los déficits motores en el modelo de TMEV, se confirmó en nuestro estudio administrando el propio 2-AG de manera directa en el ventrículo cerebral lateral mediante el uso de minibombas osmóticas.

El efecto terapéutico observado tras el tratamiento con el inhibidor de la MAGL podría deberse a acciones del 2-AG en múltiples dianas, entre ellas sobre procesos inflamatorios que tienen lugar en ambos modelos de estudio, pero también podría estar actuando a nivel de la acumulación de CSPGs no existiendo datos en la literatura científica en cuanto a este tema. En relación al proceso inflamatorio, observamos que el tratamiento con UCM0325 disminuyó la

cantidad de infiltrados en la médula espinal, así como la reactividad de la microglía en ambos modelos de EM. Además, la disminución en la expresión génica de la citoquina proinflamatoria IL-1 β junto con el aumento de los niveles de la enzima arginasa-1 sugieren que el 2-AG está ejerciendo un efecto anti-inflamatorio de acuerdo con las acciones de los cannabinoides ampliamente descritas en la literatura (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003, Croxford and Miller 2003, Klein 2005). Además de sus acciones en el modelo de lesión medular ya comentadas, el 2-AG limita el daño cerebral en un modelo de hipoxia-isquemia (Lara-Celador, Castro-Ortega et al. 2012) y en un modelo de EAE mejorando la sintomatología clínica tanto en la fase aguda como en la fase crónica (Lourbopoulos, Grigoriadis et al. 2011). Así mismo, el uso de un inhibidor irreversible de la MAGL, el JZL184, disminuyó la respuesta inflamatoria en un modelo de Alzheimer, y en cultivos de microglía y astrocitos expuestos a agentes inflamatorios (Pihlaja, Takkinen et al. 2015). De especial interés es que tanto el 2-AG como el JZL184 reducen la muerte de los oligodendrocitos en cultivo inducida por AMPA, así como la inflamación en el modelo de EAE. Además, el compuesto JZL184 es capaz de conservar la integridad de la mielina en un modelo de desmielinización por cuprizona (Bernal-Chico, Canedo et al. 2015). Son consistentes los hallazgos positivos derivados de la inhibición de la MAGL con el inhibidor JZL184, sin embargo, al ser un inhibidor que actúa de manera irreversible, puede inducir tolerancia farmacológica por desensibilización de los receptores cuando se administra de manera crónica, lo que sitúa a los inhibidores reversibles de la MAGL, como el UCM03025, como compuestos con perfiles más interesantes desde el punto de vista terapéutico.

Una vez que observamos que en el modelo de TMEV existe astrogliosis asociada a una acumulación de CSPGs en zonas desmielinizantes quisimos conocer si la atenuación de la severidad sintomatológica inducida por el inhibidor de la MAGL en la fase crónica del modelo de Theiler, podría ser también resultado de acciones del 2-AG sobre los niveles de CSPGs. En relación a este hecho, el tratamiento con UCM03025 redujo la astrogliosis y la acumulación de los CSPGs en la médula espinal de los ratones infectados con TMEV, disminuyendo específicamente los niveles de Fosfacán y de Neurocán a los 85 y 105 dpi. Conviene subrayar que este efecto se vio acompañado de un aumento en el número de oligodendrocitos proliferantes, así como de oligodendrocitos maduros y más importante, de un aumento en la expresión de marcadores para mielina del tipo MBP. Se sabe que en las patologías desmielinizantes se estimula

la oligodendrogénesis, los OPCs proliferan y migran hacia la zona desmielinizada con el objetivo de madurar y producir nuevas vainas de mielina. Las investigaciones realizadas a día de hoy apuntan a que la mayoría de los oligodendrocitos que acuden a la zona lesionada provienen del parénquima (Polito and Reynolds 2005) aunque se ha señalado también la posible contribución de los nichos neurogénicos como la zona subventricular (SVZ) a los procesos de remielinización (Mecha, Feliu et al. 2013, Menn, Garcia-Verdugo et al. 2006, Nait-Oumesmar, Decker et al. 1999, Picard-Riera, Decker et al. 2002). En esta línea, hay estudios que indican que los cannabinoides modulan la oligodendrogénesis, ya que el tratamiento con agonistas del receptor CB1 aumenta la oligodendrogénesis en la SVZ (Arevalo-Martin, Garcia-Ovejero et al. 2007, Solbrig, Fan et al. 2010, Xapelli, Agasse et al. 2014). En EM, aunque los axones desmielinizados remielinizan espontáneamente en las fases de remisión, es el fallo en el proceso de remielinización que tiene lugar en las fases progresivas de la enfermedad el que desemboca en una neurodegeneración progresiva dando lugar a disfunción y discapacidad irreversible (Franklin 2002). En general, este fallo se ha atribuido no a una falta de OPCs en la zona lesionada, sino a una escasa diferenciación, como se ha observado tanto en la EM (Chang, Tourtellotte et al. 2002) como en el modelo de TMEV-IDD (Ulrich, Seeliger et al. 2008). Es importante resaltar que en nuestro estudio, la capacidad de los oligodendrocitos de proliferar y madurar tras el aumento del tono endógeno de 2-AG, estaría de acuerdo con las acciones de diferentes tipos de cannabinoides actuando en los oligodendrocitos, bien protegiéndoles de estímulos tóxicos (Mecha, Torrao et al. 2012, Ribeiro, Yu et al. 2013) o promoviendo su proliferación y diferenciación (Arevalo-Martin, Garcia-Ovejero et al. 2007, Gomez, Arevalo-Martin et al. 2010, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2011, Gomez, Sanchez-Rodriguez et al. 2015, Molina-Holgado, Vela et al. 2002).

Finalmente, quisimos analizar si los cambios observados en la población oligodendroglial se traducían en remielinización y los análisis realizados en nuestro estudio a los 105 días, 20 días después de haber cesado el tratamiento con UCM03025, en un tiempo considerado óptimo para evaluar si se ha producido remielinización (Warrington, Asakura et al. 2000) así lo indican. El tratamiento con UCM03025 tuvo efectos a largo plazo tanto a nivel de mejoría de la función motora, como de una disminución en los niveles de CSPGs. Además, ambos efectos se correlacionaron con un mayor número de axones remielinizados que muestran vainas de

mielina más finas reflejado en el incremento del valor del g-ratio en los axones de las médulas espinales de los ratones tratados con UCM03025. Investigaciones anteriores de nuestro grupo ya habían detectado que la activación de los receptores CB1 y CB2 promueven remielinización coincidente con una mejoría en la sintomatología en el modelo de TMEV-IDD mediante el tratamiento con cannabinoides sintéticos como WIN55,212-2, ACEA y JWH-015 (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003). En la presente Tesis comprobamos además que existe una disminución del daño axonal observado mediante tinción con Neurofilamento-H, así como con una mejoría del transporte axonal en el tracto cortico-espinal detectada mediante el trazador BDA. En la misma línea el tratamiento con UCM03025 resultó efectivo manteniendo la integridad de la mielina y disminuyendo el daño axonal en el modelo de EAE. Es importante destacar el potencial terapéutico del inhibidor de la MAGL disminuyendo la pérdida axonal en dos modelos de EM, ya que esta es la principal causa de deterioro progresivo en los pacientes con EM donde las terapias actuales no resultan del todo efectivas.

Teniendo en cuenta lo descrito previamente en la literatura científica sobre el efecto deletéreo de la acumulación de los CSPGs y el fallo en los procesos de remielinización que ocurre en la EM (Siebert and Osterhout 2011, Lau, Keough et al. 2012), resulta de gran interés identificar una terapia capaz no solo de promover la proliferación y maduración de los oligodendrocitos sino que sea también capaz de reducir la expresión de CSPGs en la zona lesionada, lo que ayudaría a generar ambientes más favorables para que tengan éxito los mecanismos endógenos de reparación no solo en modelos de EM, sino también en lesión medular. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el aumento de los niveles de 2-AG generado por inhibición de la MAGL mejora la sintomatología en dos modelos de EM, actuando a través de los receptores cannabinoides CB1 y CB2. En el caso del modelo de TMEV-IDD, este efecto podría deberse a una disminución en la producción de CSPGs por parte de los astrocitos, neutralizando el ambiente inhibitorio predominante en las zonas desmielinizadas. Esta observación va acompañada por una mayor diferenciación de OPCs que podría estar contribuyendo al proceso de remielinización y a la protección axonal. No se puede descartar, sin embargo, que el efecto positivo ejercido por el inhibidor de la MAGL, sea también debido a sus propiedades inmunomoduladoras, tanto en el modelo de TMEV-IDD como en el modelo de EAE. De manera alternativa o más bien complementaria el UCM03025 podría actuar como agente antiexcitotóxico

y neuroprotector mediante la activación de receptores CB1 y CB2 en neuronas, células gliales y células inmunes. Esta hipótesis estaría apoyada por estudios que han descrito que el 2-AG reduce los efectos excitotóxicos inducidos por AMPA en neuronas en cultivo (Loria, Petrosino et al. 2010), además otros cannabinoides del tipo WIN55-212-2, THC o el uso de inhibidores de la recaptación de los endocannabinoides han mostrado ejercer esas acciones antiexcitotóxicas y neuroprotectoras en los modelos de EAE y TMEV (Arevalo-Martin, Vela et al. 2003, Croxford and Miller 2003, Fernandez-Ruiz, Garcia et al. 2010, Loria, Petrosino et al. 2010, Pryce, Ahmed et al. 2003).

Es necesario mencionar que quedan aún algunas cuestiones por resolver, por ejemplo, cual es la influencia de los CSPGs sobre las células oligodendrogiales o si el 2-AG podría mitigar el efecto inhibitorio de los CSPGs sobre los oligodendrocitos in vitro. Además, también hay que tener en cuenta que en el fallo en una remielinización efectiva contribuyen, además de los CSPGs, otros factores inhibitorios, presentes en la zona de lesión como son Notch, Wnt, Lingo-1 o las semaforinas (Huang, Fancy et al. 2011). Así mismo, es importante resaltar que los astrocitos no solo tienen la capacidad de incrementar las respuestas inflamatorias o inhibir la remielinización y regeneración mediante la liberación de factores inhibitorios (Lidde-low, Guttenplan et al. 2017), sino que también pueden ser protectores y limitar la inflamación ayudando a la regeneración axonal (Farina, Aloisi et al. 2007, Liddelow and Barres 2017). De hecho, hay astrogliosis asociada a procesos de regeneración en los que los astrocitos producen factores de crecimiento del tipo FGF-2, que favorecen la diferenciación de los oligodendrocitos u otros como el NGF, BDNF o IGF-1 que ayudarían a los procesos de regeneración y remielinización (Moore, Abdullah et al. 2011). En este sentido, hay estudios que apoyan esta hipótesis sugiriendo que la inhibición de la astrogliosis en situaciones de daño al SNC no parece una aproximación terapéutica abordable ya que su inhibición in vivo podría ser perjudicial ya que se impide la reparación de la BHE, aumenta la respuesta inflamatoria y se bloquean los procesos de regeneración axonal en modelos de lesión medular (Faulkner, Herrmann et al. 2004) y empeora la sintomatología en el modelo de EAE (Toft-Hansen, Fuchtbauer et al. 2011, Voskuhl, Peterson et al. 2009). Por todo ello, desde el punto de vista terapéutico resultaría más factible identificar compuestos con múltiples dianas capaces de modular el fenotipo de los astrocitos hacia aquellos en los que no solo se disminuya la secreción de factores inhibitorios como los

CSPGs, sino que se favorezca la secreción de aquellos factores pro-regenerativos.

En relación a lo mencionado, habría que tener en cuenta también el patrón de sulfatación de las cadenas GAGs de los CSPGs, ya que se ha demostrado que este puede determinar su carácter inhibitorio o permisivo. De hecho, ante una situación de daño en el SNC la sulfatación general de los proteoglicanos aumenta siendo los sulfatados en posición 4 más inhibitorios para el crecimiento neuronal y los sulfatados en posición 6 más permisivos (Wang, Katagiri et al. 2008). Los animales que carecen de la enzima que sulfata en posición 6 tienen menor plasticidad y capacidad regenerativa en un modelo de lesión cortical y del tracto nigroestriatal (Lin, Rosahl et al. 2011) y desarrollan una EAE más severa (Miyamoto, Tanaka et al. 2014) por lo que parece que la cicatriz glial resulta ser permisiva o inhibitoria dependiendo de las características de sus componentes. Cambiar por tanto selectivamente el ratio de sulfatación de posición 4 a 6 de las cadenas GAGs de los CSPGs supone una estrategia a tener en cuenta (Foscarin, Raha-Chowdhury et al. 2017) y sería de gran interés estudiar si el patrón de sulfatación de los CSPGs cambia al inhibir la hidrólisis del 2-AG en los ratones TMEV.

Los resultados descritos en esta Tesis, resaltan tal y como muestra la Figura 53, el efecto protector del UCM03025 frente a la desmielinización crónica y su capacidad para promover la remielinización en dos modelos de EM y abre nuevas posibilidades terapéuticas con inhibidores de la MAGL para el tratamiento de las fases crónicas de la EM y patologías desmielinizantes.

Discusión

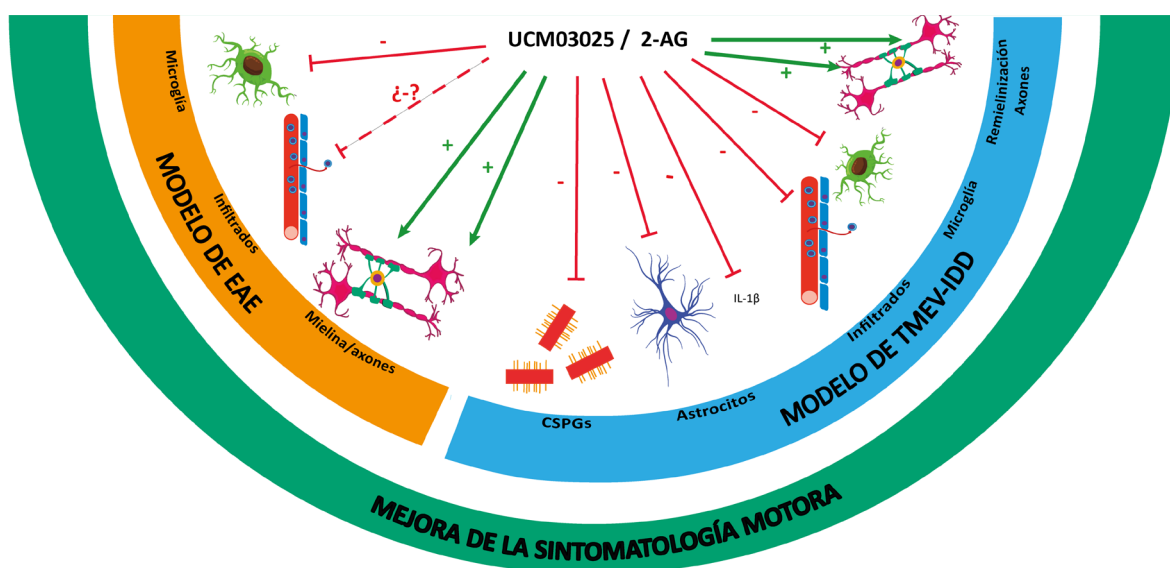


Figura 53. Resumen efecto terapéutico del UCM03025 en el modelo de EAE y en el modelo de TMEV-IDD.

3. Efecto del 2-AG en la síntesis de CSPGs por astrocitos en cultivo

Los astrocitos pueden potenciar las respuestas inflamatorias en situaciones de infección, trauma, isquemia o patologías neurodegenerativas, secretando citoquinas y quimioquinas que promuevan los procesos inflamatorios, formando parte de esta manera en las respuestas inmunes innatas, pero también son los principales mediadores de la gliosis reactiva, siendo la cicatriz glial formada por los astrocitos hipertróficos y reactivos, una característica patológica de la EM y que tiene una función importante en la progresión de la enfermedad (Sofroniew and Vinters 2010, Wu and Raine 1992).

Debido a que los astrocitos son la principal fuente de CSPGs que contribuye a la formación de la cicatriz glial (Alonso and Privat 1993, Fawcett and Asher 1999, Reier and Houle 1988, Silver and Miller 2004), en el presente estudio se procedió a su cultivo y estimulación con TGF- β 1, citoquina que aumenta considerablemente en situaciones de daño en el SNC y una de las responsables de aumentar la expresión de CSPGs in vivo e in vitro (Hamel, Mayer et al. 2005, Silver and Miller 2004, Susarla, Laing et al. 2011). De hecho, se ha mostrado que tratamientos que impiden la señalización mediada por TGF- β , por administración de decorina (Davies, Tang et al. 2004, Logan, Baird et al. 1999, Minor, Tang et al. 2008) o mediante anticuerpos anti-TGF- β reducen el depósito de laminina, fibronectina y CSPGs así como la formación de la cicatriz glial promoviendo la regeneración axonal en modelos de lesión cerebral in vivo y promueven el crecimiento neuronal in vitro (Logan, Berry et al. 1994, Logan, Green et al. 1999, Moon and Fawcett 2001).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio en cuanto al aumento en la expresión de Neurocán, Fosfacán y Brevicán en astrocitos estimulados con TGF- β 1 concuerdan con lo publicado en la literatura donde se indica que, tras el tratamiento con dicha citoquina, se produce un aumento en la síntesis de los proteoglicanos señalados anteriormente (Asher, Morgenstern et al. 2000, Gris, Tighe et al. 2007, Hamel, Mayer et al. 2005, Jones, Margolis et al. 2003, McKeon, Juryneć et al. 1999, Ryu et al. 2010, Sobel 2001, Schachtrup, Tang, Davies et al. 2003, Wang, Katagiri et al. 2008). Así mismo, la estimulación con TGF- β 1 aumenta la expresión de toda la batería de enzimas necesarias para la síntesis de CSPGs en astrocitos (Asher, Morgenstern et al. 2000, Gris, Tighe et al. 2007, Hamel, Mayer et al. 2005, Smith and Strunz 2005, Wang, Katagiri

et al. 2008). Además, el aumento de expresión de Neurocán observado en nuestro estudio mediante inmunocitoquímica, así como mediante ELISA también fue detectado por Asher en el año 2000 y por Smith en el año 2005 de manera que nuestros resultados coinciden con los estudios publicados previamente y nos permiten utilizar cultivos de astrocitos para investigar el efecto del 2-AG sobre las vías de señalización activadas por TGF- β 1 y su impacto en la producción de los CSPGs.

En la vía de señalización activada por TGF- β que conduce a la síntesis de CSPGs están involucradas las proteínas SMAD2/3, las cuales se fosforilan cuando TGF- β se une a su receptor, y forman el complejo SMAD con la unión de la proteína SMAD4 (Massague, Seoane et al. 2005). Además, existen evidencias que indican que la inducción de la síntesis de CSPGs, también puede realizarse a través de vías intracelulares independientes a la vía SMAD2/3 habiéndose sugerido la implicación de la vía de PI3K-Akt-mTOR (Jahan and Hannila 2015, Susarla, Laing et al. 2011, Zhang 2017) o de la vía de las MAPK (Moustakas and Heldin 2005). La síntesis de CSPGs por estimulación con TGF- β e implicación de las vías de SMAD y PI3K, se ve reflejada en nuestro estudio ya que tras la estimulación con TGF- β se aumenta la fosforilación de SMAD2,3 así como de mTOR que junto con la inducción de Fosfacán, Neurocán y Brevicán sugiere la implicación de estas vías, en la síntesis de dichos proteoglicanos.

El cuanto al efecto del 2-AG en los cultivos de astrocitos ya sea por exposición directa o mediante el tratamiento con inhibidores de las enzimas que lo catabolizan, la MAGL o la ABDH6, observamos una disminución en la fosforilación de la proteína SMAD2, así como de Akt y mTOR en astrocitos estimulados con TGF- β 1 y tratados con 2-AG. Así mismo el 2-AG es capaz de disminuir los niveles de Brevicán, Fosfacán y Neurocán a nivel intracelular a la dosis de 100nM disminuyendo el Neurocán también a nivel extracelular. Esta dosis utilizada, fue seleccionada en base al estudio dosis-respuesta para la expresión de ARNm de Brevicán en astrocitos estimulados con TGF- β 1 y bFGF. Por otro lado, los inhibidores de las enzimas de hidrólisis del 2-AG disminuyeron la expresión de Brevicán y Neurocán a nivel intracelular, así como el Neurocán liberado al medio, con excepción en este caso del inhibidor de la enzima ABDH6. El hecho de que con el inhibidor de la enzima ABDH6, la cual hidroliza únicamente el 6% del 2-AG, se consiga la misma disminución de los niveles intracelulares de Neurocán y Brevicán que con los inhibidores de la MAGL, nos hace pensar que un aumento mínimo de los niveles de 2-AG

serían suficientes para reducir los niveles de esos proteoglicanos. De hecho, hay estudios in vivo que muestran que la inhibición de la ABDH6 es suficiente para conseguir efectos terapéuticos atenuando la neurodegeneración y mejorando la sintomatología en un modelo de lesión cerebral (Tchantchou and Zhang 2013) y aliviando los déficits motores asociados al modelo de EAE (Wen, Ribeiro et al. 2015).

En cuanto a los receptores cannabinoides sobre los que el 2-AG podría estar ejerciendo sus efectos, observamos que al administrar antagonistas de los receptores CB1 y CB2, tanto la disminución de la fosforilación de SMAD2 y mTOR, ejercida por el 2-AG, como la expresión de Neurocán, dependen del receptor CB2. A pesar de que la expresión del receptor CB2 en astrocitos ha sido objeto de debate durante años, se sabe que es un receptor “inducible” que aumenta en condiciones inflamatorias en este tipo celular. Se ha observado la expresión de este receptor en astrocitos localizados en lesiones de la sustancia blanca en EM (Benito, Romero et al. 2007) y puede modular la producción de diferentes mediadores inmunes en cultivos de astrocitos in vitro sometidos a inflamación tras la exposición con el compuesto UCM707 y HU210 (Ortega-Gutierrez, Molina-Holgado et al. 2005) así como en astrocitos humanos con el compuesto WIN55,212-2 (Sheng, Hu et al. 2005). Además, se ha observado su expresión en astrocitos en modelos in vivo, en un modelo de Huntington (Sagredo, Gonzalez et al. 2009) y en un modelo de lesión medular (Garcia-Ovejero, Arevalo-Martin et al. 2009). Así mismo, mediante la activación del receptor CB2 en astrocitos junto con la activación del receptor CB1 en neuronas con el compuesto HU210, se han descrito efectos neuroprotectores, en el modelo de TMEV (Docagne, Muneton et al. 2007). En cuanto a la cuestión de si los astrocitos pueden responder a los inhibidores de las enzimas de hidrólisis del 2-AG, estudios previos han evidenciado que los astrocitos contienen tanto la enzima MAGL como la enzima ABHD6. En un estudio in vivo donde se inhibió de manera condicional la MAGL específicamente en microglía, astrocitos y neuronas, se mostró que el contenido de 2-AG a nivel cerebral estaba regulado fundamentalmente por la MAGL de origen neuronal y de astrocitos (Viader, Blankman et al. 2015). Otro estudio más reciente indicó que la MAGL de los astrocitos controla la señalización del 2-AG en el cerebelo (Chen, Liu et al. 2016). Además, en un modelo organotípico de lesión neuronal, la neuroprotección inducida por el 2-AG estaba mediada por la inhibición de la MAGL en astrocitos observándose que la expresión de la MAGL aumentaba en astrocitos estimulados con LPS

(Kallendrusch, Hobusch et al. 2012). Por otro lado, en cuanto a la enzima ABHD6, esta se expresa en neuronas glutamatérgicas, así como en astrocitos, pero no en microglía a excepción de la línea BV2 (Marrs, Blankman et al. 2010). Los estudios descritos apoyarían por tanto el hecho de que los astrocitos son capaces de responder al tratamiento con los diferentes inhibidores de las enzimas de hidrólisis del 2-AG.

En relación a los resultados obtenidos en cuanto a la modulación de la expresión de CSPGs por el 2-AG, hay estudios previos que indican que la modulación del sistema endocannabinoide puede regular la respuesta fibrótica en modelos experimentales de fibrosis, modelos donde se produce una activación de fibroblastos con excesivo depósito de colágeno y proteínas de la matriz extracelular. Se ha descrito un papel del receptor CB1 como receptor profibrótico (Marquart, Zerr et al. 2010, Yoshinaga, Uwabe et al. 2016), efecto corroborado por experimentación realizada con ratones deficientes para FAAH en los que se induce fibrosis dependiente de CB1 (Palumbo-Zerr, Horn et al. 2012). En contraposición a estos resultados, en nuestro estudio no observamos sin embargo ninguna disminución significativa en la expresión de proteoglicanos al tratar a los astrocitos con el antagonista del receptor CB1, SR14176 en situación basal. Sin embargo, observamos que el efecto del 2-AG reduciendo los niveles de Neurocán en astrocitos estimulados, es revertido al ser administrado junto con el antagonista de CB2. La reducción de los procesos fibróticos mediante activación del receptor CB2 se ha descrito en la literatura científica en el marco de la fibrosis cutánea y del daño tisular (Akhmetshina, Dees et al. 2009). Así, se ha demostrado que mediante la activación del receptor CB2 se disminuyen los niveles de colágeno, de TGF- β y la fosforilación de sus proteínas de señalización sugiriendo que la señalización a través de TGF- β podría ser la vía mediante la cual el receptor CB2 estaría modulando los procesos fibróticos (Balistreri, Garcia-Gonzalez et al. 2011). En apoyo de las anteriores observaciones, la administración de antagonistas del receptor CB2 como el AM630 aumenta la síntesis de colágeno y la señalización de TGF- β a través de la fosforilación de proteínas SMAD (Li, Wang et al. 2016). Toda esta evidencia previa, apoya los resultados obtenidos en relación al efecto del 2-AG sobre la fosforilación de las proteínas SMAD en astrocitos in vitro, así como sobre la expresión de los proteoglicanos, efectos posiblemente mediados a través del receptor CB2.

Hay además resultados en la literatura que sugieren un posible mecanismo mediante el

cual los cannabinoides podrían estar regulando la señalización mediada por TGF- β , este sería a través de la activación de los receptores PPAR γ . Así, se ha observado que la activación de la vía PPAR γ disminuye las respuestas fibróticas por inhibición de la señalización mediada por TGF- β (Dantas, Pereira et al. 2015). En este contexto se ha demostrado que mediante la administración de agonistas de PPAR γ y de CB2 como el ácido julémico o el VCE-004.8 (derivado quinona de CBD) se obtienen respuestas antifibróticas en modelos experimentales de esclerosis sistémica (Del Rio, Navarrete et al. 2016, Gonzalez, Selvi et al. 2012). Se ha observado así mismo que mediante la activación del receptor CB2 se consiguen respuestas antifibróticas inhibiendo la vía de TGF- β /SMAD de manera dependiente de Nrf2 (Li, Han et al. 2016).

En relación a la disminución de la fosforilación de Akt y mTOR observada tras el tratamiento con 2-AG en los astrocitos estimulados, este efecto resulta llamativo ya que esta es una vía de señalización que se activa generalmente tras la activación de receptores cannabinoides, aunque nuestros datos indican una disminución de la señalización mediada a través de esta vía. Cabe destacar que en estudios realizados con células tumorales, la activación de los receptores CB1 y CB2 conlleva a la activación de una compleja ruta de señalización que converge en la inhibición de la proteína Akt y conduce a procesos de autofagia (Carracedo, Lorente et al. 2006, Salazar, Carracedo et al. 2009, Velasco, Hernandez-Tiedra et al. 2016), lo que indicaría que la modulación de la cascada de señalización de PI3K por medio de la Gi/o es de naturaleza positiva o negativa dependiendo del tipo celular.

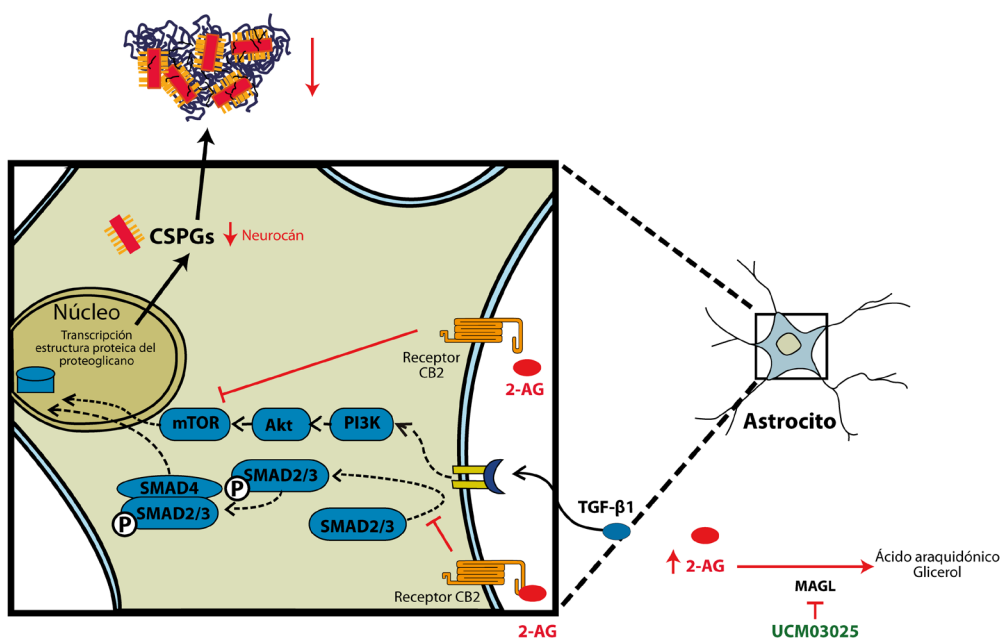


Figura 54. Esquema del efecto del 2-AG sobre la producción de CSPGs en astrocitos en cultivo

Todo lo discutido en este apartado de la Tesis Doctoral sugiere que para el tratamiento de enfermedades como la EM son necesarias terapias que no solo sean capaces de modular la respuesta inmunológica, sino que además se combinen con otras que reduzcan la excitotoxicidad y promuevan los mecanismos endógenos de reparación y remielinización para poder así superar la fase progresiva de la enfermedad de la que hoy en día no existe una terapia efectiva. En relación con los mecanismos endógenos de reparación es de gran importancia identificar compuestos que favorezcan la diferenciación de los oligodendrocitos, que sean capaces de modular los factores inhibitorios presentes en las lesiones desmielinizadas, creando ambientes más permisivos para que tenga éxito la remielinización. A este respecto, se perfilan los astrocitos como una diana celular a tener en cuenta con el fin de modificar su activación hacia un perfil en el que no solo se reduzcan la síntesis y depósito de CSPGs, sino que se incremente la liberación de señales pro-regenerativas, lo que resultaría una estrategia de gran valor como terapia en situaciones de daño dentro del SNC. Finalmente, los cannabinoides podrían actuar en algunos de los fenómenos señalados anteriormente ya que actuarían de manera multi-diana disminuyendo la acumulación de CSPGs en la zona de lesión, modulando la respuesta inflamatoria hacia una respuesta más reparadora y promoviendo la diferenciación de los oligodendrocitos. Además, habría que añadir la capacidad de los cannabinoides para actuar como antioxidantes, antiexcitotóxicos y neuroprotectores, resultando ser compuestos con un gran potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas y en patologías desmielinizantes.

VI. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. Los animales infectados con el virus de Theiler desarrollan alteraciones motoras en la fase crónica del modelo de TMEV-IDD y presentan infiltrados inflamatorios, así como reactivación microglial y astrogial a nivel de médula espinal. Esta respuesta inflamatoria está asociada a un aumento en la expresión de CSPGs en zonas desmielinizadas siendo los astrocitos las células que sintetizan los CSPGs. El tratamiento con dos inhibidores de la síntesis de los CSPGs, el xilósido y la fluorosamina, disminuyen los niveles de CSPGs en la fase crónica del modelo y mejoran los déficits motores asociados. Todo ello evidencia la relevancia de esas moléculas inhibitorias en el desarrollo de la patología.

2. La inhibición de la MAGL, aumenta los niveles de 2-AG *in vivo*, mejorando la sintomatología asociada al modelo de EAE y al modelo de TMEV. Los efectos terapéuticos ejercidos por el UCM03025 en el modelo de TMEV son dependientes de los receptores CB1 y CB2. El 2-AG podría estar actuando como agente antiinflamatorio y promoviendo los procesos endógenos de regeneración ya que reduce la astrogliosis y los niveles de CSPGs en la médula espinal de los ratones TMEV. Además, induce un aumento del número de OPCs, de oligodendrocitos proliferativos y maduros, frenando la pérdida axonal y potenciando la remielinización.

3. El mecanismo mediante el cual el 2-AG podría estar mediando sus efectos beneficiosos *in vivo* incluiría su acción sobre la producción de los CSPGs por parte de los astrocitos ya que, como observamos *in vitro*, el tratamiento con 2-AG en astrocitos estimulados con TGF- β 1 reduce la síntesis de los proteoglicanos Brevicán, Fosfacán y Neurocán. Concretamente, el efecto del 2-AG en la disminución de la síntesis de Neurocán es dependiente del receptor CB2. El uso de inhibidores selectivos de las enzimas MAGL y ABHD6 redujeron la expresión de Brevicán y Neurocán a nivel intracelular, disminuyendo también los niveles de Neurocán secretado al medio extracelular a excepción, en este caso, del inhibidor de la ABHD6. El 2-AG podría estar ejerciendo sus efectos disminuyendo la señalización de dos de las vías directamente implicadas en la síntesis de CSPGs como son la vía de TGF- β 1/SMAD y Akt/mTOR. El receptor CB2 podría estar implicado en estos efectos.

En conjunto, estos resultados destacan la importancia de incrementar el tono endógeno de 2-AG con el fin de modular las respuestas inflamatorias y promover los mecanismos endógenos de reparación a través de la reducción de la acumulación de los CSPGs, en las zonas des-

mielinizadas, permitiendo a su vez una mayor diferenciación oligodendroglial promoviendo así la remielinización.

1. Animals infected with Theiler's virus develop motor symptoms, present infiltrates as well as microglial and astroglial reactivity in the spinal cord at the chronic phase of TMEV-IDD model. This inflammatory response is associated with an increment in CSPGs expression within demyelinated lesions being the astrocytes the main cell responsible for CSPGs synthesis. The treatment with two different CSPGs synthesis inhibitors, xyloside and fluorosamine, decreased CSPGs levels and ameliorated motor deficits at the chronic phase of TMEV-IDD. All these data demonstrate the relevance of these inhibitory molecules in the progression of the pathology.

2. UCM03025 treatment increased 2-AG levels in vivo and ameliorated symptomatology in EAE and TMEV-IDD model. The therapeutic effects exerted by UCM03025 in TMEV model are dependent on CB1 and CB2 cannabinoid receptors. 2-AG could be acting as an anti-inflammatory agent promoting endogenous mechanisms since it reduced astrogliosis and CSPGs levels in the spinal cord of TMEV infected mice. In addition, UCM03025 increased the number of OPCs and proliferating oligodendrocytes leading to a diminution in axonal damage enhancing remyelination.

3. The mechanism by which 2-AG could mediate its beneficial effects in vivo may include its ability to modulate CSPGs production in astrocytes since we observed in vitro that 2-AG diminished brevican, neurocan and phosphacan synthesis in TGF- β 1 stimulated astrocytes. The effect of 2-AG decreasing neurocan is dependent on CB2 cannabinoid receptor. The treatment with MAGL and ABHD6 inhibitors also reduced brevican and neurocan intracellular expression diminishing extracellular neurocan levels with the exception, in this case, of ABDH6 inhibitor. 2-AG could mediate its effects by acting over two signalling pathways involved in CSPGs upregulation, TGF- β 1/SMAD and Akt/mTOR pathways. CB2 receptor may be implicated in these effects.

Collectively, these findings highlight the importance to increase endocannabinoid tone of 2-AG in order to modulate the inflammatory response and to promote the endogenous repair mechanisms, processes that are impeded and altered in demyelinating pathologies. 2-AG could be involved in this aspect by reducing CSPGs accumulation in demyelinating areas allowing oligodendrocytes to differentiate leading to greater remyelination and axonal regene-

ration.

VII. REFERENCIAS

Akhmetshina, A., C. Dees, N. Busch, J. Beer, K. Sarter, J. Zwerina, A. Zimmer, O. Distler, G. Schett and J. H. Distler (2009). "The cannabinoid receptor CB2 exerts antifibrotic effects in experimental dermal fibrosis." *Arthritis Rheum* 60(4): 1129-1136.

Akita, K., A. von Holst, Y. Furukawa, T. Mikami, K. Sugahara and A. Faissner (2008). "Expression of multiple chondroitin/dermatan sulfotransferases in the neurogenic regions of the embryonic and adult central nervous system implies that complex chondroitin sulfates have a role in neural stem cell maintenance." *Stem Cells* 26(3): 798-809.

Alonso, G. and A. Privat (1993). "Reactive astrocytes involved in the formation of lesional scars differ in the mediobasal hypothalamus and in other forebrain regions." *J Neurosci Res* 34(5): 523-538.

Anderson, M. A., J. E. Burda, Y. Ren, Y. Ao, T. M. O'Shea, R. Kawaguchi, G. Coppola, B. S. Khakh, T. J. Deming and M. V. Sofroniew (2016). "Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration." *Nature* 532(7598): 195-200.

Arévalo-Martín, A., D. García-Ovejero and E. Molina-Holgado (2010). "The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol reduces lesion expansion and white matter damage after spinal cord injury." *Neurobiol Dis* 38(2): 304-312.

Arévalo-Martín, A., D. García-Ovejero, A. Rubio-Araiz, O. Gomez, F. Molina-Holgado and E. Molina-Holgado (2007). "Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2." *Eur J Neurosci* 26(6): 1548-1559.

Arévalo-Martín, A., J. M. Vela, E. Molina-Holgado, J. Borrell and C. Guaza (2003). "Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis." *J Neurosci* 23(7): 2511-2516.

Arnon, R. and M. Sela (2003). "Immunomodulation by the copolymer glatiramer acetate." *J Mol Recognit* 16(6): 412-421.

Asher, R. A., D. A. Morgenstern, P. S. Fidler, K. H. Adcock, A. Oohira, J. E. Braisted, J. M. Levine, R. U. Margolis, J. H. Rogers and J. W. Fawcett (2000). "Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes." *J Neurosci* 20(7): 2427-2438.

Back, S. A., T. M. Tuohy, H. Chen, N. Wallingford, A. Craig, J. Struve, N. L. Luo, F. Banine, Y. Liu, A. Chang, B. D. Trapp, B. F. Bebo, Jr., M. S. Rao and L. S. Sherman (2005). "Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation." *Nat Med* 11(9): 966-972.

Baker, D., G. Pryce, S. J. Jackson, C. Bolton and G. Giovannoni (2012). "The biology that underpins the therapeutic potential of cannabis-based medicines for the control of spasticity in multiple sclerosis." *Mult Scler Relat Disord* 1(2): 64-75.

Balistreri, E., E. Garcia-Gonzalez, E. Selvi, A. Akhmetshina, K. Palumbo, S. Lorenzini, R. Maggio, M. Lucattelli, M. Galeazzi and J. W. Distler (2011). "The cannabinoid WIN55, 212-2 abrogates dermal fibrosis in scleroderma bleomycin model." *Ann Rheum Dis* 70(4): 695-699.

Banati, M., P. Csecsei, E. Koszegi, H. H. Nielsen, G. Suto, L. Bors, A. Trauninger, T. Csepany, C. Rozsa, G. Jakab, T. Molnar, A. Berthele, S. R. Kalluri, T. Berki and Z. Illes (2013). "Antibody response against gastrointestinal antigens in demyelinating diseases of the central nervous system." *Eur J Neurol* 20(11): 1492-1495.

Bandtlow, C. E. and D. R. Zimmermann (2000). "Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins." *Physiol Rev* 80(4): 1267-1290.

Barkhof, F., W. Bruck, C. J. De Groot, E. Bergers, S. Hulshof, J. Geurts, C. H. Polman and P. van der Valk (2003). "Remyelinated lesions in multiple sclerosis: magnetic resonance image appearance." *Arch Neurol* 60(8): 1073-1081.

Barritt, A. W., M. Davies, F. Marchand, R. Hartley, J. Grist, P. Yip, S. B. McMahon and E. J. Bradbury (2006). "Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury." *J Neurosci* 26(42): 10856-10867.

Barthel, S. R., A. Antonopoulos, F. Cedeno-Laurent, L. Schaffer, G. Hernandez, S. A. Patil, S. J. North, A. Dell, K. L. Matta, S. Neelamegham, S. M. Haslam and C. J. Dimitroff (2011). "Peracetylated 4-fluoro-glucosamine reduces the content and repertoire of N- and O-glycans without direct incorporation." *J Biol Chem* 286(24): 21717-21731.

Bartus, K., N. D. James, A. Didangelos, K. D. Bosch, J. Verhaagen, R. J. Yanez-Munoz, J. H. Rogers, B. L. Schneider, E. M. Muir and E. J. Bradbury (2014). "Large-scale chondroitin sulfate proteoglycan digestion with chondroitinase gene therapy leads to reduced pathology and modulates macrophage phenotype following spinal cord contusion injury." *J Neurosci* 34(14): 4822-4836.

Basavarajappa, B. S. (2007). "Neuropharmacology of the endocannabinoid signaling system-molecular mechanisms, biological actions and synaptic plasticity." *Curr Neuropharmacol* 5(2): 81-97.

Belbasis, L., V. Bellou, E. Evangelou, J. P. Ioannidis and I. Tzoulaki (2015). "Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses." *Lancet Neurol* 14(3): 263-273.

Benito, C., J. P. Romero, R. M. Tolón, D. Clemente, F. Docagne, C. J. Hillard, C. Guaza and J. Romero (2007). "Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis." *J Neurosci* 27(9): 2396-2402.

Benito, C., R. M. Tolón, M. R. Pazos, E. Nuñez, A. I. Castillo and J. Romero (2008). "Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation." *Br J Pharmacol* 153(2): 277-285.

Bernal-Chico, A., M. Canedo, A. Manterola, M. Victoria Sánchez-Gómez, A. Perez-Samartin, R. Rodríguez-Puertas, C. Matute and S. Mato (2015). "Blockade of monoacylglycerol lipase inhibits oligodendrocyte excitotoxicity and prevents demyelination in vivo." *Glia* 63(1): 163-176.

Bieber, A. J., D. R. Ure and M. Rodríguez (2005). "Genetically dominant spinal cord repair in a murine model of chronic progressive multiple sclerosis." *J Neuropathol Exp Neurol* 64(1): 46-57.

Billiau, A. and P. Matthys (2001). "Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases." *J Leukoc Biol* 70(6): 849-860.

Blankman, J. L., G. M. Simon and B. F. Cravatt (2007). "A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." *Chem Biol* 14(12): 1347-1356.

Bo, L., C. A. Vedeler, H. I. Nyland, B. D. Trapp and S. J. Mork (2003). "Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients." *J Neuropathol Exp Neurol* 62(7): 723-732.

Bradbury, E. J., L. D. Moon, R. J. Popat, V. R. King, G. S. Bennett, P. N. Patel, J. W. Fawcett and S. B. McMahon (2002). "Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury." *Nature* 416(6881): 636-640.

Cafferty, W. B., E. J. Bradbury, M. Lidieth, M. Jones, P. J. Duffy, S. Pezet and S. B. McMahon (2008). "Chondroitinase ABC-mediated plasticity of spinal sensory function." *J Neurosci* 28(46): 11998-12009.

Calvo-Barreiro, L., H. Eixarch, X. Montalban and C. Espejo (2017). "Combined therapies to treat complex diseases: The role of the gut microbiota in multiple sclerosis." *Autoimmun Rev*.

Carswell R. *Pathological Anatomy; Illustrations of the Elementary Forms of Disease*. London: Longman, Orme, Brown, Green and Longman. 1838

Carracedo, A., M. Lorente, A. Egía, C. Blazquez, S. García, V. Giroux, C. Malicet, R. Villuendas, M. Gironella, L. Gonzalez-Feria, M. A. Piris, J. L. Iovanna, M. Guzman and G. Velasco (2006). "The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells." *Cancer*

Cell 9(4): 301-312.

Carrier, E. J., C. S. Kearn, A. J. Barkmeier, N. M. Breese, W. Yang, K. Nithipatikom, S. L. Pfister, W. B. Campbell and C. J. Hillard (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." *Mol Pharmacol* 65(4): 999-1007.

Carulli, D., K. E. Rhodes, D. J. Brown, T. P. Bonnert, S. J. Pollack, K. Oliver, P. Strata and J. W. Fawcett (2006). "Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components." *J Comp Neurol* 494(4): 559-577.

Centonze, D., M. Bari, S. Rossi, C. Prosperetti, R. Furlan, F. Fezza, V. De Chiara, L. Battistini, G. Bernardi, S. Bernardini, G. Martino and M. Maccarrone (2007). "The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Brain* 130(Pt 10): 2543-2553.

Chang, A., S. M. Staugaitis, R. Dutta, C. E. Batt, K. E. Easley, A. M. Chomyk, V. W. Yong, R. J. Fox, G. J. Kidd and B. D. Trapp (2012). "Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis." *Ann Neurol* 72(6): 918-926.

Chang, A., W. W. Tourtellotte, R. Rudick and B. D. Trapp (2002). "Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis." *N Engl J Med* 346(3): 165-173.

Charcot JM. Histologie de la sclerose en plaques. *Gaz Hop (Paris)* 1868; 41:554-5, 557-8, 566

Charil, A., T. A. Yousry, M. Rovaris, F. Barkhof, N. De Stefano, F. Fazekas, D. H. Miller, X. Montalban, J. H. Simon, C. Polman and M. Filippi (2006). "MRI and the diagnosis of multiple sclerosis: expanding the concept of "no better explanation"." *Lancet Neurol* 5(10): 841-852.

Chastain, E. M. and S. D. Miller (2012). "Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease." *Immunol Rev* 245(1): 227-238.

Chen, X., R. T. Winkler-Pickett, N. H. Carbonetti, J. R. Ortaldo, J. J. Oppenheim and O. M. Howard (2006). "Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells." *Eur J Immunol* 36(3): 671-680.

Chen, Y., X. Liu, C. R. Vickstrom, M. J. Liu, L. Zhao, A. Viader, B. F. Cravatt and Q. S. Liu (2016). "Neuronal and Astrocytic Monoacylglycerol Lipase Limit the Spread of Endocannabinoid Signaling in the Cerebellum." *eNeuro* 3(3).

Chicca, A., C. Arena and C. Manera (2016). "Beyond the Direct Activation of Cannabinoid Re-

ceptors: New Strategies to Modulate the Endocannabinoid System in CNS-Related Diseases." *Recent Pat CNS Drug Discov* 10(2): 122-141.

Clatch, R. J., S. D. Miller, R. Metzner, M. C. Dal Canto and H. L. Lipton (1990). "Monocytes/macrophages isolated from the mouse central nervous system contain infectious Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)." *Virology* 176(1): 244-254.

Collin, C., E. Ehler, G. Waberzinek, Z. Alsindi, P. Davies, K. Powell, W. Notcutt, C. O'Leary, S. Ratcliffe, I. Novakova, O. Zapletalova, J. Pikova and Z. Ambler (2010). "A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis." *Neurol Res* 32(5): 451-459.

Compston, A. and A. Coles (2008). "Multiple sclerosis." *Lancet* 372(9648): 1502-1517.

Cregg, J. M., M. A. DePaul, A. R. Filous, B. T. Lang, A. Tran and J. Silver (2014). "Functional regeneration beyond the glial scar." *Exp Neurol* 253: 197-207.

Croxford, J. L. and S. D. Miller (2003). "Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212." *J Clin Invest* 111(8): 1231-1240.

Cruveilhier J. Anatomie pathologique du corps humain; descriptions avec figures lithographie'es et coloriees; des diverses alterations morbides dont le corps humain est susceptible. Paris: JB Bailliere. 1835-42.

Cua, R. C., L. W. Lau, M. B. Keough, R. Midha, S. S. Apte and V. W. Yong (2013). "Overcoming neurite-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans in the astrocyte matrix." *Glia* 61(6): 972-984.

Dal Canto, M. C., B. S. Kim, S. D. Miller and R. W. Melvold (1996). "Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis." *Methods* 10(3): 453-461.

Dal Canto, M. C. and H. L. Lipton (1975). "Primary demyelination in Theiler's virus infection. An ultrastructural study." *Lab Invest* 33(6): 626-637.

Dantas, A. T., M. C. Pereira, M. J. de Melo Rego, L. F. da Rocha, Jr., R. Pitta Ida, C. D. Marques, A. L. Duarte and M. G. Pitta (2015). "The Role of PPAR Gamma in Systemic Sclerosis." *PPAR Res* 2015: 124624.

Davies, J. E., X. Tang, J. W. Denning, S. J. Archibald and S. J. Davies (2004). "Decorin suppresses neurocan, brevican, phosphacan and NG2 expression and promotes axon growth across adult rat spinal cord injuries." *Eur J Neurosci* 19(5): 1226-1242.

Deepa, S. S., D. Carulli, C. Galtrey, K. Rhodes, J. Fukuda, T. Mikami, K. Sugahara and J. W. Fawcett (2006). "Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans." *J Biol Chem* 281(26): 17789-17800.

Del Río, C., C. Navarrete, J. A. Collado, M. L. Bellido, M. Gómez-Canas, M. R. Pazos, J. Fernandez-Ruiz, F. Pollastro, G. Appendino, M. A. Calzado, I. Cantarero and E. Muñoz (2016). "The cannabinoid quinol VCE-004.8 alleviates bleomycin-induced scleroderma and exerts potent antifibrotic effects through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and CB2 pathways." *Sci Rep* 6: 21703.

Dendrou, C. A., V. Plagnol, E. Fung, J. H. Yang, K. Downes, J. D. Cooper, S. Nutland, G. Coleman, M. Himsworth, M. Hardy, O. Burren, B. Healy, N. M. Walker, K. Koch, W. H. Ouwehand, J. R. Bradley, N. J. Wareham, J. A. Todd and L. S. Wicker (2009). "Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource." *Nat Genet* 41(9): 1011-1015.

Denic, A., B. Wootla, L. Zoecklein and M. Rodriguez (2014). "Deletion of Virus-specific T-cells Enhances Remyelination in a Model of Multiple Sclerosis." *J Neurol Transl Neurosci* 2(1).

Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger and R. Mechoulam (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* 258(5090): 1946-1949.

Di Marzo, V. and F. Piscitelli (2015). "The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids." *Neurotherapeutics* 12(4): 692-698.

Di Marzo, V., N. Stella and A. Zimmer (2015). "Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain." *Nat Rev Neurosci* 16(1): 30-42.

Dinh, T. P., D. Carpenter, F. M. Leslie, T. F. Freund, I. Katona, S. L. Sensi, S. Kathuria and D. Piomelli (2002). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16): 10819-10824.

Docagne, F., V. Muneton, D. Clemente, C. Ali, F. Loria, F. Correa, M. Hernáñez, L. Mestre, D. Vivien and C. Guaza (2007). "Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation." *Mol Cell Neurosci* 34(4): 551-561.

Dyck, S. M., A. Alizadeh, K. T. Santhosh, E. H. Proulx, C. L. Wu and S. Karimi-Abdolrezaee (2015). "Chondroitin Sulfate Proteoglycans Negatively Modulate Spinal Cord Neural Precursor Cells by Signaling Through LAR and RPTPsigma and Modulation of the Rho/ROCK Pathway." *Stem Cells*

33(8): 2550-2563.

Dyment, D. A., G. C. Ebers and A. D. Sadovnick (2004). "Genetics of multiple sclerosis." *Lancet Neurol* 3(2): 104-110.

ElSohly M, Waseem G. Constituents of Cannabis Sativa. In: Pertwee RG, editor. *Handbook of Cannabis*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2014.p.3-22

Farina, C., F. Aloisi and E. Meinl (2007). "Astrocytes are active players in cerebral innate immunity." *Trends Immunol* 28(3): 138-145.

Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, M. J. Woo, K. E. Tansey, N. B. Doan and M. V. Sofroniew (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." *J Neurosci* 24(9): 2143-2155.

Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." *Brain Res Bull* 49(6): 377-391.

Feliú, A., M. Moreno-Martet, M. Mecha, F. J. Carrillo-Salinas, E. de Lago, J. Fernández-Ruiz and C. Guaza (2015). "A Sativex((R)) -like combination of phytocannabinoids as a disease-modifying therapy in a viral model of multiple sclerosis." *Br J Pharmacol* 172(14): 3579-3595.

Ferguson, B., M. K. Matyszak, M. M. Esiri and V. H. Perry (1997). "Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions." *Brain* 120 (Pt 3): 393-399.

Fernández O, Rodríguez-Antigüedad A (2010). *Epidemiología de la esclerosis múltiple*. En: *Esclerosis Múltiple*. Villoslada P (Ed). Marge Books.

Fernández-Ruiz, J., C. García, O. Sagredo, M. Gómez-Ruiz and E. de Lago (2010). "The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage." *Expert Opin Ther Targets* 14(4): 387-404.

Fernández-Ruiz, J., J. Romero and J. A. Ramos (2015). "Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others." *Handb Exp Pharmacol* 231: 233-259.

Fernández-Ruiz, J., J. Romero, G. Velasco, R. M. Tolon, J. A. Ramos and M. Guzman (2007). "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" *Trends Pharmacol Sci* 28(1): 39-45.

Fernández-Suarez, D., M. Celorrio, J. I. Riezu-Boj, A. Ugarte, R. Pacheco, H. Gonzalez, J. Oyar-

zabal, C. J. Hillard, R. Franco and M. S. Aymerich (2014). "Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 is neuroprotective and alters glial cell phenotype in the chronic MPTP mouse model." *Neurobiol Aging* 35(11): 2603-2616.

Ferre, S., C. Lluís, Z. Justinova, C. Quiroz, M. Orru, G. Navarro, E. I. Canela, R. Franco and S. R. Goldberg (2010). "Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function." *Br J Pharmacol* 160(3): 443-453.

Fezza, F., M. Bari, R. Florio, E. Talamonti, M. Feole and M. Maccarrone (2014). "Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes." *Molecules* 19(11): 17078-17106.

Fisher, D., B. Xing, J. Dill, H. Li, H. H. Hoang, Z. Zhao, X. L. Yang, R. Bachoo, S. Cannon, F. M. Longo, M. Sheng, J. Silver and S. Li (2011). "Leukocyte common antigen-related phosphatase is a functional receptor for chondroitin sulfate proteoglycan axon growth inhibitors." *J Neurosci* 31(40): 14051-14066.

Flanders, K. C., G. Ludecke, J. Renzing, C. Hamm, D. S. Cissel and K. Unsicker (1993). "Effects of TGF-betas and bFGF on Astroglial Cell Growth and Gene Expression in Vitro." *Mol Cell Neurosci* 4(5): 406-417.

Foscarin, S., R. Raha-Chowdhury, J. W. Fawcett and J. C. F. Kwok (2017). "Brain ageing changes proteoglycan sulfation, rendering perineuronal nets more inhibitory." *Aging (Albany NY)* 9(6): 1607-1622.

Franklin, R. J. (2002). "Why does remyelination fail in multiple sclerosis?" *Nat Rev Neurosci* 3(9): 705-714.

Freedman, M. S., E. J. Thompson, F. Deisenhammer, G. Giovannoni, G. Grimsley, G. Keir, S. Ohman, M. K. Racke, M. Sharief, C. J. Sindic, F. Sellebjerg and W. W. Tourtellotte (2005). "Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement." *Arch Neurol* 62(6): 865-870.

Frischer, J. M., S. D. Weigand, Y. Guo, N. Kale, J. E. Parisi, I. Pirko, J. Mandrekar, S. Bramow, I. Metz, W. Bruck, H. Lassmann and C. F. Lucchinetti (2015). "Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque." *Ann Neurol* 78(5): 710-721.

Frohman, E. M., M. K. Racke and C. S. Raine (2006). "Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis." *N Engl J Med* 354(9): 942-955.

Fry, E. J., M. J. Chagnon, R. Lopez-Vales, M. L. Tremblay and S. David (2010). "Corticospinal tract

regeneration after spinal cord injury in receptor protein tyrosine phosphatase sigma deficient mice." *Glia* 58(4): 423-433.

Gaetani, S., V. Cuomo and D. Piomelli (2003). "Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs?" *Trends Mol Med* 9(11): 474-478.

Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur and P. Casellas (1995). "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." *Eur J Biochem* 232(1): 54-61.

Gallily, R., A. Breuer and R. Mechoulam (2000). "2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice." *Eur J Pharmacol* 406(1): R5-7.

Galtrey, C. M. and J. W. Fawcett (2007). "The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system." *Brain Res Rev* 54(1): 1-18.

Gama, C. I., S. E. Tully, N. Sotogaku, P. M. Clark, M. Rawat, N. Vaidehi, W. A. Goddard, 3rd, A. Nishi and L. C. Hsieh-Wilson (2006). "Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity." *Nat Chem Biol* 2(9): 467-473.

Gao, Y., D. V. Vasilyev, M. B. Goncalves, F. V. Howell, C. Hobbs, M. Reisenberg, R. Shen, M. Y. Zhang, B. W. Strassle, P. Lu, L. Mark, M. J. Piesla, K. Deng, E. V. Kouranova, R. H. Ring, G. T. Whiteside, B. Bates, F. S. Walsh, G. Williams, M. N. Pangalos, T. A. Samad and P. Doherty (2010). "Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice." *J Neurosci* 30(6): 2017-2024.

Gaoni, Y. and R. Mechoulam (1964). "Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish." *Journal of the American Chemical Society* 86(8): 1646-1647.

García-Ovejero, D., A. Arévalo-Martín, S. Petrosino, F. Docagne, C. Hagen, T. Bisogno, M. Watanabe, C. Guaza, V. Di Marzo and E. Molina-Holgado (2009). "The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats." *Neurobiol Dis* 33(1): 57-71.

García, M. C., V. Cinquina, C. Palomo-Garo, A. Rabano and J. Fernández-Ruiz (2015). "Identification of CB(2) receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease." *Neurosci Lett* 587: 1-4.

Garg, N. and T. W. Smith (2015). "An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis." *Brain Behav* 5(9): e00362.

Goldschmidt, T., J. Antel, F. B. König, W. Brück and T. Kuhlmann (2009). "Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity." *Neurology* 72(22): 1914-1921.

Gómez, O., A. Arévalo-Martín, D. García-Ovejero, S. Ortega-Gutiérrez, J. A. Cisneros, G. Almazán, M. A. Sánchez-Rodríguez, F. Molina-Holgado and E. Molina-Holgado (2010). "The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation." *Glia* 58(16): 1913-1927.

Gómez, O., A. Sánchez-Rodríguez, M. Le, C. Sánchez-Caro, F. Molina-Holgado and E. Molina-Holgado (2011). "Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways." *Br J Pharmacol* 163(7): 1520-1532.

Gómez, O., M. A. Sánchez-Rodríguez, S. Ortega-Gutiérrez, H. Vázquez-Villa, C. Guaza, F. Molina-Holgado and E. Molina-Holgado (2015). "A Basal Tone of 2-Arachidonoylglycerol Contributes to Early Oligodendrocyte Progenitor Proliferation by Activating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT and the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathways." *J Neuroimmune Pharmacol* 10(2): 309-317.

Gonzalez, E. G., E. Selvi, E. Balistreri, A. Akhmetshina, K. Palumbo, S. Lorenzini, P. E. Lazzerini, C. Montilli, P. L. Capecchi, M. Lucattelli, C. Baldi, E. Giancetti, M. Galeazzi, F. L. Pasini and J. H. Distler (2012). "Synthetic cannabinoid ajulemic acid exerts potent antifibrotic effects in experimental models of systemic sclerosis." *Ann Rheum Dis* 71(9): 1545-1551.

Gregory, A. P., C. A. Dendrou, K. E. Attfield, A. Haghikia, D. K. Xifara, F. Butter, G. Poschmann, G. Kaur, L. Lambert, O. A. Leach, S. Promel, D. Punwani, J. H. Felce, S. J. Davis, R. Gold, F. C. Nielsen, R. M. Siegel, M. Mann, J. I. Bell, G. McVean and L. Fugger (2012). "TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis." *Nature* 488(7412): 508-511.

Gris, P., A. Tighe, D. Levin, R. Sharma and A. Brown (2007). "Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes." *Glia* 55(11): 1145-1155.

Guo, J. and S. R. Ikeda (2004). "Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons." *Mol Pharmacol* 65(3): 665-674.

Hafner, D. A., A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Iverson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg and S. L. Hauser (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." *N Engl J Med* 357(9): 851-862.

Haist, V., R. Ulrich, A. Kalkuhl, U. Deschl and W. Baumgartner (2012). "Distinct spatio-temporal extracellular matrix accumulation within demyelinated spinal cord lesions in Theiler's murine encephalomyelitis." *Brain Pathol* 22(2): 188-204.

Hamby, M. E. and M. V. Sofroniew (2010). "Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders." *Neurotherapeutics* 7(4): 494-506.

Hamel, M. G., J. Mayer and P. E. Gottschall (2005). "Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes." *J Neurochem* 93(6): 1533-1541.

Hanafy, K. A. and J. A. Sloane (2011). "Regulation of remyelination in multiple sclerosis." *FEBS Lett* 585(23): 3821-3828.

Hartmann, F. J., M. Khademi, J. Aram, S. Ammann, I. Kockum, C. Constantinescu, B. Gran, F. Piehl, T. Olsson, L. Codarri and B. Becher (2014). "Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells." *Nat Commun* 5: 5056.

Haylock-Jacobs, S., M. B. Keough, L. Lau and V. W. Yong (2011). "Chondroitin sulphate proteoglycans: extracellular matrix proteins that regulate immunity of the central nervous system." *Autoimmun Rev* 10(12): 766-772.

Hebert-Chatelain, E., T. Desprez, R. Serrat, L. Bellocchio, E. Soria-Gomez, A. Busquets-Garcia, A. C. Pagano Zottola, A. Delamarre, A. Cannich, P. Vincent, M. Varilh, L. M. Robin, G. Terral, M. D. Garcia-Fernandez, M. Colavita, W. Mazier, F. Drago, N. Puente, L. Reguero, I. Elezgarai, J. W. Dupuy, D. Cota, M. L. Lopez-Rodriguez, G. Barreda-Gomez, F. Massa, P. Grandes, G. Benard and G. Marsicano (2016). "A cannabinoid link between mitochondria and memory." *Nature* 539(7630): 555-559.

Herkenham, M., A. B. Lynn, M. D. Little, M. R. Johnson, L. S. Melvin, B. R. de Costa and K. C. Rice (1990). "Cannabinoid receptor localization in brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5): 1932-1936.

Hernan, M. A., S. S. Jick, G. Logroscino, M. J. Olek, A. Ascherio and H. Jick (2005). "Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis." *Brain* 128(Pt 6): 1461-1465.

Hernández-Torres, G., M. Cipriano, E. Heden, E. Bjorklund, A. Canales, D. Zian, A. Feliú, M. Mecha, C. Guaza, C. J. Fowler, S. Ortega-Gutierrez and M. L. Lopez-Rodríguez (2014). "A reversible and selective inhibitor of monoacylglycerol lipase ameliorates multiple sclerosis." *Angew Chem Int Ed Engl* 53(50): 13765-13770.

Herrmann, J. E., T. Imura, B. Song, J. Qi, Y. Ao, T. K. Nguyen, R. A. Korsak, K. Takeda, S. Akira and M. V. Sofroniew (2008). "STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after

spinal cord injury." *J Neurosci* 28(28): 7231-7243.

Hibbits, N., J. Yoshino, T. Q. Le and R. C. Armstrong (2012). "Astrogliosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination." *ASN Neuro* 4(6): 393-408.

Hollenbach, J. A. and J. R. Oksenberg (2015). "The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review." *J Autoimmun* 64: 13-25.

Houle, J. D., V. J. Tom, D. Mayes, G. Wagoner, N. Phillips and J. Silver (2006). "Combining an autologous peripheral nervous system "bridge" and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord." *J Neurosci* 26(28): 7405-7415.

Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam and R. G. Pertwee (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." *Pharmacol Rev* 54(2): 161-202.

Huang, J. K., S. P. Fancy, C. Zhao, D. H. Rowitch, C. Ffrench-Constant and R. J. Franklin (2011). "Myelin regeneration in multiple sclerosis: targeting endogenous stem cells." *Neurotherapeutics* 8(4): 650-658.

Iannotti, F. A., V. Di Marzo and S. Petrosino (2016). "Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders." *Prog Lipid Res* 62: 107-128.

Jahan, N. and S. S. Hannila (2015). "Transforming growth factor beta-induced expression of chondroitin sulfate proteoglycans is mediated through non-Smad signaling pathways." *Exp Neurol* 263: 372-384.

Jean-Gilles, L., S. Feng, C. R. Tench, V. Chapman, D. A. Kendall, D. A. Barrett and C. S. Constantinescu (2009). "Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis." *J Neurol Sci* 287(1-2): 212-215.

Jelachich, M. L., P. Bandyopadhyay, K. Blum and H. L. Lipton (1995). "Theiler's virus growth in murine macrophage cell lines depends on the state of differentiation." *Virology* 209(2): 437-444.

Johns, L. D., G. Babcock, D. Green, M. Freedman, S. Sriram and R. M. Ransohoff (1992). "Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brainstem astrocyte primary cultures." *Brain Res* 585(1-2): 229-236.

Jones, L. L., R. U. Margolis and M. H. Tuszynski (2003). "The chondroitin sulfate proteoglycans

neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury." *Exp Neurol* 182(2): 399-411.

Kabat, E. A., A. Wolf, A. E. Bezer and J. P. Murray (1951). "Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys." *J Exp Med* 93(6): 615-633.

Kallendrusch, S., C. Hobusch, A. Ehrlich, M. Nowicki, S. Ziebell, I. Bechmann, G. Geisslinger, M. Koch and F. Dehghani (2012). "Intrinsic up-regulation of 2-AG favors an area specific neuronal survival in different in vitro models of neuronal damage." *PLoS One* 7(12): e51208.

Kaplan, B. L., Y. Ouyang, C. E. Rockwell, G. K. Rao and N. E. Kaminski (2005). "2-Arachidonoyl-glycerol suppresses interferon-gamma production in phorbol ester/ionomycin-activated mouse splenocytes independent of CB1 or CB2." *J Leukoc Biol* 77(6): 966-974.

Karimi-Abdolrezaee, S. and R. Billakanti (2012). "Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects." *Mol Neurobiol* 46(2): 251-264.

Karimi-Abdolrezaee, S., D. Schut, J. Wang and M. G. Fehlings (2012). "Chondroitinase and growth factors enhance activation and oligodendrocyte differentiation of endogenous neural precursor cells after spinal cord injury." *PLoS One* 7(5): e37589.

Karus, M., A. Ulc, M. Ehrlich, T. Czopka, E. Hennen, J. Fischer, M. Mizhorova, N. Qamar, O. Brustle and A. Faissner (2016). "Regulation of oligodendrocyte precursor maintenance by chondroitin sulphate glycosaminoglycans." *Glia* 64(2): 270-286.

Karussis, D., S. Grigoriadis, E. Polyzoidou, N. Grigoriadis, S. Slavin and O. Abramsky (2006). "Neuroprotection in multiple sclerosis." *Clin Neurol Neurosurg* 108(3): 250-254.

Katona, I. and T. F. Freund (2012). "Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain." *Annu Rev Neurosci* 35: 529-558.

Keough, M. B., J. A. Rogers, P. Zhang, S. K. Jensen, E. L. Stephenson, T. Chen, M. G. Hurlbert, L. W. Lau, K. S. Rawji, J. R. Plemel, M. Koch, C. C. Ling and V. W. Yong (2016). "An inhibitor of chondroitin sulfate proteoglycan synthesis promotes central nervous system remyelination." *Nat Commun* 7: 11312.

Kingwell, E., J. J. Marriott, N. Jette, T. Pringsheim, N. Makhani, S. A. Morrow, J. D. Fisk, C. Evans, S. G. Beland, S. Kulaga, J. Dykeman, C. Wolfson, M. W. Koch and R. A. Marrie (2013). "Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review." *BMC Neurol* 13: 128.

Kitada, M. and D. H. Rowitch (2006). "Transcription factor co-expression patterns indicate he-

terogeneity of oligodendroglial subpopulations in adult spinal cord." *Glia* 54(1): 35-46.

Klein, T. W. (2005). "Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics." *Nature Reviews Immunology* 5: 400.

Kotter, M. R., C. Stadelmann and H. P. Hartung (2011). "Enhancing remyelination in disease—can we wrap it up?" *Brain* 134(Pt 7): 1882-1900.

Kuhlmann, T., V. Miron, Q. Cui, C. Wegner, J. Antel and W. Bruck (2008). "Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis." *Brain* 131(Pt 7): 1749-1758.

Kurtzke, J. F. (1980). "Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region." *Acta Neurol Scand* 62(2): 65-80.

Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi and H. Lassmann (2005). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." *Brain* 128(Pt 11): 2705-2712.

Lanciego, J. L., P. Barroso-Chinea, A. J. Rico, L. Conte-Perales, L. Callen, E. Roda, V. Gomez-Bautista, I. P. Lopez, C. Lluís, J. L. Labandeira-Garcia and R. Franco (2011). "Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*." *J Psychopharmacol* 25(1): 97-104.

Lang, B. T., J. M. Cregg, M. A. DePaul, A. P. Tran, K. Xu, S. M. Dyck, K. M. Madalena, B. P. Brown, Y. L. Weng, S. Li, S. Karimi-Abdolrezaee, S. A. Busch, Y. Shen and J. Silver (2015). "Modulation of the proteoglycan receptor PTPsigma promotes recovery after spinal cord injury." *Nature* 518(7539): 404-408.

Langford, R. M., J. Mares, A. Novotna, M. Vachova, I. Novakova, W. Notcutt and S. Ratcliffe (2013). "A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of THC/CBD oromucosal spray in combination with the existing treatment regimen, in the relief of central neuropathic pain in patients with multiple sclerosis." *J Neurol* 260(4): 984-997.

Lara-Celador, I., L. Castro-Ortega, A. Alvarez, F. Goni-de-Cerio, J. Lacalle and E. Hilario (2012). "Endocannabinoids reduce cerebral damage after hypoxic-ischemic injury in perinatal rats." *Brain Res* 1474: 91-99.

Larsen, P. H., J. E. Wells, W. B. Stallcup, G. Opdenakker and V. W. Yong (2003). "Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan." *J Neurosci* 23(35): 11127-11135.

Lassmann, H. (2010). "What drives disease in multiple sclerosis: Inflammation or neurodegeneration?" *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 1(1): 2-11.

Lassmann, H. (2014). "Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis." *Glia* 62(11): 1816-1830.

Lassmann, H. and M. Bradl (2017). "Multiple sclerosis: experimental models and reality." *Acta Neuropathol* 133(2): 223-244.

Lau, L. W., M. B. Keough, S. Haylock-Jacobs, R. Cua, A. Doring, S. Sloka, D. P. Stirling, S. Rivest and V. W. Yong (2012). "Chondroitin sulfate proteoglycans in demyelinated lesions impair remyelination." *Ann Neurol* 72(3): 419-432.

Lemarchant, S., M. Pruvost, M. Hebert, M. Gauberti, Y. Hommet, A. Briens, E. Maubert, Y. Gueye, F. Feron, D. Petite, M. Mersel, J. C. do Rego, H. Vaudry, J. Koistinaho, C. Ali, V. Agin, E. Emery and D. Vivien (2014). "tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury." *Neurobiol Dis* 66: 28-42.

Li, S. S., L. L. Wang, M. Liu, S. K. Jiang, M. Zhang, Z. L. Tian, M. Wang, J. Y. Li, R. Zhao and D. W. Guan (2016). "Cannabinoid CB(2) receptors are involved in the regulation of fibrogenesis during skin wound repair in mice." *Mol Med Rep* 13(4): 3441-3450.

Li, X., D. Han, Z. Tian, B. Gao, M. Fan, C. Li, X. Li, Y. Wang, S. Ma and F. Cao (2016). "Activation of Cannabinoid Receptor Type II by AM1241 Ameliorates Myocardial Fibrosis via Nrf2-Mediated Inhibition of TGF-beta1/Smad3 Pathway in Myocardial Infarction Mice." *Cell Physiol Biochem* 39(4): 1521-1536.

Li, Z. W., R. H. Tang, J. P. Zhang, Z. P. Tang, W. S. Qu, W. H. Zhu, J. J. Li, M. J. Xie, D. S. Tian and W. Wang (2011). "Inhibiting epidermal growth factor receptor attenuates reactive astrogliosis and improves functional outcome after spinal cord injury in rats." *Neurochem Int* 58(7): 812-819.

Libbey, J. E. and R. S. Fujinami (2010). "Potential triggers of MS." *Results Probl Cell Differ* 51: 21-42.

Liddelw, S. A. and B. A. Barres (2017). "Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential." *Immunity* 46(6): 957-967.

Liddelw, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Munch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens and B.

A. Barres (2017). "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia." *Nature* 541(7638): 481-487.

Ligon, K. L., S. Kesari, M. Kitada, T. Sun, H. A. Arnett, J. A. Alberta, D. J. Anderson, C. D. Stiles and D. H. Rowitch (2006). "Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(20): 7853-7858.

Ligresti, A., L. De Petrocellis and V. Di Marzo (2016). "From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology." *Physiol Rev* 96(4): 1593-1659.

Lin, R., T. W. Rosahl, P. J. Whiting, J. W. Fawcett and J. C. Kwok (2011). "6-Sulphated chondroitins have a positive influence on axonal regeneration." *PLoS One* 6(7): e21499.

Lipton, H. L. (1975). "Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination." *Infect Immun* 11(5): 1147-1155.

Lipton, H. L. and M. C. Dal Canto (1976). "Chronic neurologic disease in Theiler's virus infection of SJL/J mice." *J Neurol Sci* 30(1): 201-207.

Lipton, H. L. and M. L. Jelachich (1997). "Molecular pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease in mice." *Intervirology* 40(2-3): 143-152.

Lipton, H. L., J. Kratochvil, P. Sethi and M. C. Dal Canto (1984). "Theiler's virus antigen detected in mouse spinal cord 2 1/2 years after infection." *Neurology* 34(8): 1117-1119.

Liu, C., J. Collins and E. Sharp (1967). "The pathogenesis of Theiler's GD VII encephalomyelitis virus infection in mice as studied by immunofluorescent technique and infectivity titrations." *J Immunol* 98(1): 46-55.

Lledo, A., J. Borrell and C. Guaza (1999). "Dexamethasone regulation of interleukin-1-receptors in the hippocampus of Theiler's virus-infected mice: effects on virus-mediated demyelination." *Eur J Pharmacol* 372(1): 75-83.

Logan, A., A. Baird and M. Berry (1999). "Decorin attenuates gliotic scar formation in the rat cerebral hemisphere." *Exp Neurol* 159(2): 504-510.

Logan, A., M. Berry, A. M. Gonzalez, S. A. Frautschy, M. B. Sporn and A. Baird (1994). "Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat." *Eur J Neurosci* 6(3): 355-363.

Logan, A., J. Green, A. Hunter, R. Jackson and M. Berry (1999). "Inhibition of glial scarring in the injured rat brain by a recombinant human monoclonal antibody to transforming growth factor-beta2." *Eur J Neurosci* 11(7): 2367-2374.

Loría, F., S. Petrosino, M. Hernangomez, L. Mestre, A. Spagnolo, F. Correa, V. Di Marzo, F. Docagne and C. Guaza (2010). "An endocannabinoid tone limits excitotoxicity in vitro and in a model of multiple sclerosis." *Neurobiol Dis* 37(1): 166-176.

Lourbopoulos, A., N. Grigoriadis, R. Lagoudaki, O. Touloumi, E. Polyzoidou, I. Mavromatis, N. Tascos, A. Breuer, H. Ovadia, D. Karussis, E. Shohami, R. Mechoulam and C. Simeonidou (2011). "Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis." *Brain Res* 1390: 126-141.

Louveau, A., I. Smirnov, T. J. Keyes, J. D. Eccles, S. J. Rouhani, J. D. Peske, N. C. Derecki, D. Castle, J. W. Mandell, K. S. Lee, T. H. Harris and J. Kipnis (2015). "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels." *Nature* 523(7560): 337-341.

Lu, C., S. Pelech, H. Zhang, J. Bond, K. Spach, R. Noubade, E. P. Blankenhorn and C. Teuscher (2008). "Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells." *J Neurosci Res* 86(12): 2624-2640.

Lu, H. C. and K. Mackie (2016). "An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System." *Biol Psychiatry* 79(7): 516-525.

Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sorensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, Jr., P. A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R. J. Fox, M. S. Freedman, A. D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B. C. Kieseier, J. A. Lincoln, C. Lubetzki, A. E. Miller, X. Montalban, P. W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R. A. Rudick, M. P. Sormani, O. Stuve, E. Waubant and C. H. Polman (2014). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions." *Neurology* 83(3): 278-286.

Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." *Ann Neurol* 47(6): 707-717.

Lundstrom, W., S. Highfill, S. T. Walsh, S. Beq, E. Morse, I. Kockum, L. Alfredsson, T. Olsson, J. Hillert and C. L. Mackall (2013). "Soluble IL7Ralpha potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(19): E1761-1770.

Maccarrone, M., I. Bab, T. Biro, G. A. Cabral, S. K. Dey, V. Di Marzo, J. C. Konje, G. Kunos, R. Mechoulam, P. Pacher, K. A. Sharkey and A. Zimmer (2015). "Endocannabinoid signaling at the

periphery: 50 years after THC." *Trends Pharmacol Sci* 36(5): 277-296.

Marquart, S., P. Zerr, A. Akhmetshina, K. Palumbo, N. Reich, M. Tomcik, A. Horn, C. Dees, M. Engel, J. Zwerina, O. Distler, G. Schett and J. H. Distler (2010). "Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis." *Arthritis Rheum* 62(11): 3467-3476.

Marrs, W. R., J. L. Blankman, E. A. Horne, A. Thomazeau, Y. H. Lin, J. Coy, A. L. Bodor, G. G. Muccioli, S. S. Hu, G. Woodruff, S. Fung, M. Lafourcade, J. P. Alexander, J. Z. Long, W. Li, C. Xu, T. Moller, K. Mackie, O. J. Manzoni, B. F. Cravatt and N. Stella (2010). "The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors." *Nat Neurosci* 13(8): 951-957.

Massague, J., J. Seoane and D. Wotton (2005). "Smad transcription factors." *Genes Dev* 19(23): 2783-2810.

Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young and T. I. Bonner (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* 346(6284): 561-564.

Matthews, P. M., N. De Stefano, S. Narayanan, G. S. Francis, J. S. Wolinsky, J. P. Antel and D. L. Arnold (1998). "Putting magnetic resonance spectroscopy studies in context: axonal damage and disability in multiple sclerosis." *Semin Neurol* 18(3): 327-336.

Matthews, R. T., G. M. Kelly, C. A. Zerillo, G. Gray, M. Tiemeyer and S. Hockfield (2002). "Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets." *J Neurosci* 22(17): 7536-7547.

Maurel, P., U. Rauch, M. Flad, R. K. Margolis and R. U. Margolis (1994). "Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(7): 2512-2516.

McCarthy, K. D. and J. de Vellis (1980). "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue." *J Cell Biol* 85(3): 890-902.

McGavern, D. B., L. Zoecklein, K. M. Drescher and M. Rodriguez (1999). "Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination." *Exp Neurol* 158(1): 171-181.

McKeon, R. J., M. J. Jurynek and C. R. Buck (1999). "The chondroitin sulfate proteoglycans

neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar." *J Neurosci* 19(24): 10778-10788.

McKeon, R. J., R. C. Schreiber, J. S. Rudge and J. Silver (1991). "Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes." *J Neurosci* 11(11): 3398-3411.

Mecha, M., F. J. Carrillo-Salinas, L. Mestre, A. Feliú and C. Guaza (2013). "Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus." *Prog Neurobiol* 101-102: 46-64.

Mecha, M., A. Feliú, F. J. Carrillo-Salinas, L. Mestre and C. Guaza (2013). "Mobilization of progenitors in the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in the Theiler's virus model of multiple sclerosis: implications for remyelination at lesions sites." *Exp Neurol* 250: 348-352.

Mecha, M., A. Feliú, F. J. Carrillo-Salinas, A. Rueda-Zubiaurre, S. Ortega-Gutierrez, R. G. de Sola and C. Guaza (2015). "Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia." *Brain Behav Immun* 49: 233-245.

Mecha, M., P. M. Iñigo, L. Mestre, M. Hernangómez, J. Borrell and C. Guaza (2011). "An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: A beginners approach."

Mecha, M., A. S. Torrao, L. Mestre, F. J. Carrillo-Salinas, R. Mechoulam and C. Guaza (2012). "Cannabidiol protects oligodendrocyte progenitor cells from inflammation-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress." *Cell Death Dis* 3: e331.

Mechoulam, R. (2016). "Cannabis - the Israeli perspective." *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 27(3): 181-187.

Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, A. R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B. R. Martin, D. R. Compton and et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." *Biochem Pharmacol* 50(1): 83-90.

Mendes, F. A., G. R. Onofre, L. C. Silva, L. A. Cavalcante and J. García-Abreu (2003). "Concentration-dependent actions of glial chondroitin sulfate on the neuritic growth of midbrain neurons." *Brain Res Dev Brain Res* 142(2): 111-119.

Mendizabal-Zubiaga, J., S. Melser, G. Benard, A. Ramos, L. Reguero, S. Arrabal, I. Elezgarai, I. Gerrikagoitia, J. Suarez, F. Rodríguez De Fonseca, N. Puente, G. Marsicano and P. Grandes (2016). "Cannabinoid CB1 Receptors Are Localized in Striated Muscle Mitochondria and Regu-

late Mitochondrial Respiration." *Front Physiol* 7: 476.

Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch and A. Alvarez-Buylla (2006). "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." *J Neurosci* 26(30): 7907-7918.

Mestre, L., P. M. Inigo, M. Mecha, F. G. Correa, M. Hernáñez-Herrero, F. Loria, F. Docagne, J. Borrell and C. Guaza (2011). "Anandamide inhibits Theiler's virus induced VCAM-1 in brain endothelial cells and reduces leukocyte transmigration in a model of blood brain barrier by activation of CB(1) receptors." *J Neuroinflammation* 8: 102.

Mews, I., M. Bergmann, S. Bunkowski, F. Gullotta and W. Bruck (1998). "Oligodendrocyte and axon pathology in clinically silent multiple sclerosis lesions." *Mult Scler* 4(2): 55-62.

Miller, S. D., Y. Katz-Levy, K. L. Neville and C. L. Vanderlugt (2001). "Virus-induced autoimmunity: epitope spreading to myelin autoepitopes in Theiler's virus infection of the central nervous system." *Adv Virus Res* 56: 199-217.

Minor, K., X. Tang, G. Kahrilas, S. J. Archibald, J. E. Davies and S. J. Davies (2008). "Decorin promotes robust axon growth on inhibitory CSPGs and myelin via a direct effect on neurons." *Neurobiol Dis* 32(1): 88-95.

Miyamoto, K., N. Tanaka, K. Moriguchi, R. Ueno, K. Kadomatsu, H. Kitagawa and S. Kusunoki (2014). "Chondroitin 6-O-sulfate ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." *Glycobiology* 24(5): 469-475.

Miyata, S., Y. Komatsu, Y. Yoshimura, C. Taya and H. Kitagawa (2012). "Persistent cortical plasticity by upregulation of chondroitin 6-sulfation." *Nat Neurosci* 15(3): 414-422, s411-412.

Molina-Holgado, E., J. M. Vela, A. Arévalo-Martín, G. Almazan, F. Molina-Holgado, J. Borrell and C. Guaza (2002). "Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling." *J Neurosci* 22(22): 9742-9753.

Moon, L. D., R. A. Asher, K. E. Rhodes and J. W. Fawcett (2001). "Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC." *Nat Neurosci* 4(5): 465-466.

Moon, L. D. and J. W. Fawcett (2001). "Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2." *Eur J Neurosci* 14(10): 1667-1677.

Moore, C. S., S. L. Abdullah, A. Brown, A. Arulpragasam and S. J. Crocker (2011). "How factors secreted from astrocytes impact myelin repair." *J Neurosci Res* 89(1): 13-21.

Morales, P. and P. H. Reggio (2017). "An Update on Non-CB1, Non-CB2 Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors." *Cannabis Cannabinoid Res* 2(1): 265-273.

Moustakas, A. and C. H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." *J Cell Sci* 118(Pt 16): 3573-3584.

Munro, S., K. L. Thomas and M. Abu-Shaar (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* 365(6441): 61-65.

Muñoz, E., F. Pollastro, O. Tagliatela-Scafati and G. Appendino (2017). Chapter 69 - Peroxisome Proliferator Activated Receptors and Cannabinoids A2 - Preedy, V.R. *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*. San Diego, Academic Press: 671-679.

Nait-Oumesmar, B., L. Decker, F. Lachapelle, V. Avellana-Adalid, C. Bachelin and A. Baron-Van Evercooren (1999). "Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination." *Eur J Neurosci* 11(12): 4357-4366.

Nigro, J., A. Wang, D. Mukhopadhyay, M. Lauer, R. J. Midura, R. Sackstein and V. C. Hascall (2009). "Regulation of heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycan biosynthesis by 4-fluoro-glucosamine in murine airway smooth muscle cells." *J Biol Chem* 284(25): 16832-16839.

Norton, W. T., D. A. Aquino, I. Hozumi, F. C. Chiu and C. F. Brosnan (1992). "Quantitative aspects of reactive gliosis: a review." *Neurochem Res* 17(9): 877-885.

Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2000). "Multiple sclerosis." *N Engl J Med* 343(13): 938-952.

Novotna, A., J. Mares, S. Ratcliffe, I. Novakova, M. Vachova, O. Zapletalova, C. Gasperini, C. Pozzilli, L. Cefaro, G. Comi, P. Rossi, Z. Ambler, Z. Stelmasiak, A. Erdmann, X. Montalban, A. Klimek and P. Davies (2011). "A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex((R))), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis." *Eur J Neurol* 18(9): 1122-1131.

O'Sullivan, S. E. (2007). "Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors." *Br J Pharmacol* 152(5): 576-582.

Ochoa-Reparaz, J., D. W. Mielcarz, S. Begum-Haque and L. H. Kasper (2011). "Gut, bugs, and brain: role of commensal bacteria in the control of central nervous system disease." *Ann Neurol* 69(2): 240-247.

Oleszak, E. L., J. R. Chang, H. Friedman, C. D. Katsetos and C. D. Platsoucas (2004). "Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis." *Clin Microbiol Rev* 17(1): 174-207.

Olson, J. K., T. N. Eagar and S. D. Miller (2002). "Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry." *J Immunol* 169(5): 2719-2726.

Ortega-Gutierrez, S., E. Molina-Holgado and C. Guaza (2005). "Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures." *Glia* 52(2): 163-168.

Otero-Romero, S., L. Ramio-Torrenta, I. Pericot, O. Carmona, H. Perkal, A. Saiz, E. Bufill, R. Robles, E. Simon, S. Llufríu, J. Vaque-Rafart, J. Sastre-Garriga and X. Montalban (2015). "Onset-adjusted incidence of multiple sclerosis in the Girona province (Spain): Evidence of increasing risk in the south of Europe." *J Neurol Sci* 359(1-2): 146-150.

Owens, T. (2003). "The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage." *Curr Opin Neurol* 16(3): 259-265.

Palazuelos, J., T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzman and I. Galve-Roperh (2006). "Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation." *Faseb j* 20(13): 2405-2407.

Palumbo-Zerr, K., A. Horn, A. Distler, P. Zerr, C. Dees, C. Beyer, E. Selvi, B. F. Cravatt, O. Distler, G. Schett and J. H. Distler (2012). "Inactivation of fatty acid amide hydrolase exacerbates experimental fibrosis by enhanced endocannabinoid-mediated activation of CB1." *Ann Rheum Dis* 71(12): 2051-2054.

Panikashvili, D., N. A. Shein, R. Mechoulam, V. Trembovler, R. Kohen, A. Alexandrovich and E. Shohami (2006). "The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines." *Neurobiol Dis* 22(2): 257-264.

Pendleton, J. C., M. J. Shablott, D. S. Gary, V. Belegu, A. Hurtado, M. L. Malone and J. W. McDonald (2013). "Chondroitin sulfate proteoglycans inhibit oligodendrocyte myelination through PTPsigma." *Exp Neurol* 247: 113-121.

Pertwee, R. G. (1999). "Pharmacology of cannabinoid receptor ligands." *Curr Med Chem* 6(8):

635-664.

Pertwee, R. G. (2008). "Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond." *Addict Biol* 13(2): 147-159.

Pertwee, R. G. (2010). "Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists." *Curr Med Chem* 17(14): 1360-1381.

Peterson, J. W., L. Bo, S. Mork, A. Chang and B. D. Trapp (2001). "Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions." *Ann Neurol* 50(3): 389-400.

Picard-Riera, N., L. Decker, C. Delarasse, K. Goude, B. Nait-Oumesmar, R. Liblau, D. Pham-Dinh and A. Baron-Van Evercooren (2002). "Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20): 13211-13216.

Pihlaja, R., J. Takkinen, O. Eskola, J. Vasara, F. R. Lopez-Picon, M. Haaparanta-Solin and J. O. Rinne (2015). "Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 reduces neuroinflammatory response in APdE9 mice and in adult mouse glial cells." *J Neuroinflammation* 12: 81.

Polito, A. and R. Reynolds (2005). "NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system." *J Anat* 207(6): 707-716.

Poorolajal, J., M. Bahrami, M. Karami and E. Hooshmand (2017). "Effect of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis." *J Public Health (Oxf)* 39(2): 312-320.

Pope, J. G., W. J. Karpus, C. VanderLugt and S. D. Miller (1996). "Flow cytometric and functional analyses of central nervous system-infiltrating cells in SJL/J mice with Theiler's virus-induced demyelinating disease. Evidence for a CD4+ T cell-mediated pathology." *J Immunol* 156(10): 4050-4058.

Procaccini, C., V. De Rosa, V. Pucino, L. Formisano and G. Matarese (2015). "Animal models of Multiple Sclerosis." *Eur J Pharmacol* 759: 182-191.

Pryce, G., Z. Ahmed, D. J. Hankey, S. J. Jackson, J. L. Croxford, J. M. Pocock, C. Ledent, A. Petzold, A. J. Thompson, G. Giovannoni, M. L. Cuzner and D. Baker (2003). "Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis." *Brain* 126(Pt 10): 2191-2202.

Pryce, G., D. R. Riddall, D. L. Selwood, G. Giovannoni and D. Baker (2015). "Neuroprotection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Progressive Multiple Sclerosis by Cannabis-Based Cannabinoids." *J Neuroimmune Pharmacol* 10(2): 281-292.

Qi, Y., J. Cai, Y. Wu, R. Wu, J. Lee, H. Fu, M. Rao, L. Sussel, J. Rubenstein and M. Qiu (2001). "Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor." *Development* 128(14): 2723-2733.

Reddy, H., S. Narayanan, R. Arnoutelis, M. Jenkinson, J. Antel, P. M. Matthews and D. L. Arnold (2000). "Evidence for adaptive functional changes in the cerebral cortex with axonal injury from multiple sclerosis." *Brain* 123 (Pt 11): 2314-2320.

Reier, P. J. and J. D. Houle (1988). "The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair." *Adv Neurol* 47: 87-138.

Rhodes, K. E. and J. W. Fawcett (2004). "Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS?" *J Anat* 204(1): 33-48.

Ribeiro, R., F. Yu, J. Wen, A. Vana and Y. Zhang (2013). "Therapeutic potential of a novel cannabinoid agent CB52 in the mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neuroscience* 254: 427-442.

Rockwell, C. E., N. T. Snider, J. T. Thompson, J. P. Vanden Heuvel and N. E. Kaminski (2006). "Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2." *Mol Pharmacol* 70(1): 101-111.

Rodríguez, M., J. L. Leibowitz and P. W. Lampert (1983). "Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus-induced encephalomyelitis." *Ann Neurol* 13(4): 426-433.

Rolls, A., R. Shechter, A. London, Y. Segev, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, G. Rechavi and M. Schwartz (2008). "Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation." *PLoS Med* 5(8): e171.

Sadovnick, A. D., H. Armstrong, G. P. Rice, D. Bulman, L. Hashimoto, D. W. Paty, S. A. Hashimoto, S. Warren, W. Hader, T. J. Murray and et al. (1993). "A population-based study of multiple sclerosis in twins: update." *Ann Neurol* 33(3): 281-285.

Sagredo, O., S. Gonzalez, I. Aroyo, M. R. Pazos, C. Benito, I. Lastres-Becker, J. P. Romero, R. M. Tolon, R. Mechoulam, E. Brouillet, J. Romero and J. Fernández-Ruiz (2009). "Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease." *Glia* 57(11): 1154-1167.

Salazar, M., A. Carracedo, I. J. Salanueva, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorente, A. Egia, P. Vazquez, C. Blazquez, S. Torres, S. Garcia, J. Nowak, G. M. Fimia, M. Piacentini, F. Cecconi, P. P. Pandolfi,

L. Gonzalez-Feria, J. L. Iovanna, M. Guzman, P. Boya and G. Velasco (2009). "Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells." *J Clin Invest* 119(5): 1359-1372.

Sapieha, P. S., L. Duplan, N. Uetani, S. Joly, M. L. Tremblay, T. E. Kennedy and A. Di Polo (2005). "Receptor protein tyrosine phosphatase sigma inhibits axon regrowth in the adult injured CNS." *Mol Cell Neurosci* 28(4): 625-635.

Savinainen, J. R., S. M. Saario and J. T. Laitinen (2012). "The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors." *Acta Physiol (Oxf)* 204(2): 267-276.

Sawcer, S., R. J. Franklin and M. Ban (2014). "Multiple sclerosis genetics." *Lancet Neurol* 13(7): 700-709.

Sawcer, S., G. Hellenthal, M. Pirinen and C. C. Spencer (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* 476(7359): 214-219.

Schachtrup, C., J. K. Ryu, M. J. Helmrick, E. Vagena, D. K. Galanakis, J. L. Degen, R. U. Margolis and K. Akassoglou (2010). "Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage." *J Neurosci* 30(17): 5843-5854.

Schlitt, B. P., M. Felrice, M. L. Jelachich and H. L. Lipton (2003). "Apoptotic cells, including macrophages, are prominent in Theiler's virus-induced inflammatory, demyelinating lesions." *J Virol* 77(7): 4383-4388.

Schlosburg, J. E., J. L. Blankman, J. Z. Long, D. K. Nomura, B. Pan, S. G. Kinsey, P. T. Nguyen, D. Ramesh, L. Booker, J. J. Burston, E. A. Thomas, D. E. Selley, L. J. Sim-Selley, Q. S. Liu, A. H. Lichtman and B. F. Cravatt (2010). "Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system." *Nat Neurosci* 13(9): 1113-1119.

Sergott, R. C., E. Frohman, R. Glanzman and A. Al-Sabbagh (2007). "The role of optical coherence tomography in multiple sclerosis: expert panel consensus." *J Neurol Sci* 263(1-2): 3-14.

Sharir, H. and M. E. Abood (2010). "Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor." *Pharmacol Ther* 126(3): 301-313.

Shen, Y., A. P. Tenney, S. A. Busch, K. P. Horn, F. X. Cuascut, K. Liu, Z. He, J. Silver and J. G. Flanagan (2009). "PTPsigma is a receptor for chondroitin sulfate proteoglycan, an inhibitor of neural regeneration." *Science* 326(5952): 592-596.

Sheng, W. S., S. Hu, X. Min, G. A. Cabral, J. R. Lokensgard and P. K. Peterson (2005). "Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes." *Glia* 49(2): 211-219.

Sherman, L. S. and S. A. Back (2008). "A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS." *Trends Neurosci* 31(1): 44-52.

Shohami, E. and R. Mechoulam (2006). "Multiple sclerosis may disrupt endocannabinoid brain protection mechanism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16): 6087-6088.

Siebert, J. R. and D. J. Osterhout (2011). "The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes." *J Neurochem* 119(1): 176-188.

Siebert, J. R., D. J. Stelzner and D. J. Osterhout (2011). "Chondroitinase treatment following spinal contusion injury increases migration of oligodendrocyte progenitor cells." *Exp Neurol* 231(1): 19-29.

Silbert, J. E. and G. Sugumaran (2002). "Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate." *IUBMB Life* 54(4): 177-186.

Silver, J. and J. H. Miller (2004). "Regeneration beyond the glial scar." *Nat Rev Neurosci* 5(2): 146-156.

Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2006). "Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway." *J Biol Chem* 281(36): 26465-26472.

Simon, G. M. and B. F. Cravatt (2008). "Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain." *J Biol Chem* 283(14): 9341-9349.

Sirko, S., A. von Holst, A. Wizenmann, M. Gotz and A. Faissner (2007). "Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells." *Development* 134(15): 2727-2738.

Smith, G. M. and J. H. Hale (1997). "Macrophage/Microglia regulation of astrocytic tenascin: synergistic action of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor." *J Neurosci* 17(24): 9624-9633.

Smith, G. M. and C. Strunz (2005). "Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate proteoglycans by astrocytes." *Glia* 52(3): 209-218.

Sobel, R. A. (2001). "The extracellular matrix in multiple sclerosis: an update." *Braz J Med Biol Res* 34(5): 603-609.

Sobel, R. A. and A. S. Ahmed (2001). "White matter extracellular matrix chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycans in multiple sclerosis." *J Neuropathol Exp Neurol* 60(12): 1198-1207.

Soderpalm, A. H., A. Schuster and H. de Wit (2001). "Antiemetic efficacy of smoked marijuana: subjective and behavioral effects on nausea induced by syrup of ipecac." *Pharmacol Biochem Behav* 69(3-4): 343-350.

Sofroniew, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." *Trends Neurosci* 32(12): 638-647.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* 119(1): 7-35.

Solbrig, M. V., Y. Fan, N. Hermanowicz, M. G. Morgese and A. Giuffrida (2010). "A synthetic cannabinoid agonist promotes oligodendroglialogenesis during viral encephalitis in rats." *Exp Neurol* 226(1): 231-241.

Soleman, S., M. A. Filippov, A. Dityatev and J. W. Fawcett (2013). "Targeting the neural extracellular matrix in neurological disorders." *Neuroscience* 253: 194-213.

Steinman, L. and S. S. Zamvil (2006). "How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis." *Ann Neurol* 60(1): 12-21.

Stella, N., P. Schweitzer and D. Piomelli (1997). "A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation." *Nature* 388(6644): 773-778.

Sugiura, T., S. Kishimoto, S. Oka and M. Gokoh (2006). "Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand." *Prog Lipid Res* 45(5): 405-446.

Sugiura, T., S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita and K. Waku (1995). "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain." *Biochem Biophys Res Commun* 215(1): 89-97.

Sun, Y. and A. Bennett (2007). "Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs." *PPAR Res* 2007: 23513.

Susarla, B. T., E. D. Laing, P. Yu, Y. Katagiri, H. M. Geller and A. J. Symes (2011). "Smad proteins differentially regulate transforming growth factor-beta-mediated induction of chondroitin sulfate proteoglycans." *J Neurochem* 119(4): 868-878.

Tang, X., J. E. Davies and S. J. Davies (2003). "Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue." *J Neurosci Res* 71(3): 427-444.

Tanimura, A., M. Yamazaki, Y. Hashimoto, M. Uchigashima, S. Kawata, M. Abe, Y. Kita, K. Hashimoto, T. Shimizu, M. Watanabe, K. Sakimura and M. Kano (2010). "The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission." *Neuron* 65(3): 320-327.

Tauchi, R., S. Imagama, T. Natori, T. Ohgomori, A. Muramoto, R. Shinjo, Y. Matsuyama, N. Ishiguro and K. Kadomatsu (2012). "The endogenous proteoglycan-degrading enzyme ADAMTS-4 promotes functional recovery after spinal cord injury." *J Neuroinflammation* 9: 53.

Tchantchou, F. and Y. Zhang (2013). "Selective inhibition of alpha/beta-hydrolase domain 6 attenuates neurodegeneration, alleviates blood brain barrier breakdown, and improves functional recovery in a mouse model of traumatic brain injury." *J Neurotrauma* 30(7): 565-579.

Theiler, M. (1937). "SPONTANEOUS ENCEPHALOMYELITIS OF MICE, A NEW VIRUS DISEASE." *J Exp Med* 65(5): 705-719.

Thouvenot, E., M. Orsini, J. P. Daures and W. Camu (2015). "Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing-remitting multiple sclerosis." *Eur J Neurol* 22(3): 564-569.

Toft-Hansen, H., L. Fuchtbauer and T. Owens (2011). "Inhibition of reactive astrogliosis in established experimental autoimmune encephalomyelitis favors infiltration by myeloid cells over T cells and enhances severity of disease." *Glia* 59(1): 166-176.

Trapp, B. D. and K. A. Nave (2008). "Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?" *Annu Rev Neurosci* 31: 247-269.

Trapp, B. D., J. Peterson, R. M. Ransohoff, R. Rudick, S. Mork and L. Bo (1998). "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." *N Engl J Med* 338(5): 278-285.

Trapp, B. D., R. Ransohoff and R. Rudick (1999). "Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability." *Curr Opin Neurol* 12(3): 295-302.

Tsunoda, I. and R. S. Fujinami (1996). "Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus." *J Neuropathol Exp Neurol* 55(6): 673-686.

Tsunoda, I. and R. S. Fujinami (2002). "Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination." *Springer Semin Immunopathol* 24(2): 105-125.

Tsunoda, I. and R. S. Fujinami (2010). "Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis." *J Neuroimmune Pharmacol* 5(3): 355-369.

Tuo, W., N. Leleu-Chavain, J. Spencer, S. Sansook, R. Millet and P. Chavatte (2017). "Therapeutic Potential of Fatty Acid Amide Hydrolase, Monoacylglycerol Lipase, and N-Acylethanolamine Acid Amidase Inhibitors." *J Med Chem* 60(1): 4-46.

Uccelli, A., A. Laroni and M. S. Freedman (2011). "Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases." *Lancet Neurol* 10(7): 649-656.

Ulrich, R., F. Seeliger, M. Kreutzer, P. G. Germann and W. Baumgartner (2008). "Limited remyelination in Theiler's murine encephalomyelitis due to insufficient oligodendroglial differentiation of nerve/glial antigen 2 (NG2)-positive putative oligodendroglial progenitor cells." *Neuropathol Appl Neurobiol* 34(6): 603-620.

Vanderlugt, C. L. and S. D. Miller (2002). "Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy." *Nat Rev Immunol* 2(2): 85-95.

Velasco, G., S. Hernandez-Tiedra, D. Davila and M. Lorente (2016). "The use of cannabinoids as anticancer agents." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64: 259-266.

Viader, A., J. L. Blankman, P. Zhong, X. Liu, J. E. Schlosburg, C. M. Joslyn, Q. S. Liu, A. J. Tomarcho, A. H. Lichtman, D. E. Selley, L. J. Sim-Selley and B. F. Cravatt (2015). "Metabolic Interplay between Astrocytes and Neurons Regulates Endocannabinoid Action." *Cell Rep* 12(5): 798-808.

Villar, L. M., M. C. Sadaba, E. Roldan, J. Masjuan, P. Gonzalez-Parque, N. Villarrubia, M. Espino, J. A. Garcia-Trujillo, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeno (2005). "Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS." *J Clin Invest* 115(1): 187-194.

Vinals, X., E. Moreno, L. Lanfumey, A. Cordomi, A. Pastor, R. de La Torre, P. Gasperini, G. Na-

varro, L. A. Howell, L. Pardo, C. Lluís, E. I. Canela, P. J. McCormick, R. Maldonado and P. Robledo (2015). "Cognitive Impairment Induced by Delta9-tetrahydrocannabinol Occurs through Heteromers between Cannabinoid CB1 and Serotonin 5-HT2A Receptors." *PLoS Biol* 13(7): e1002194.

von Herrath, M. G. and L. C. Harrison (2003). "Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* 3(3): 223-232.

Voskuhl, R. R., R. S. Peterson, B. Song, Y. Ao, L. B. Morales, S. Tiwari-Woodruff and M. V. Sofroniew (2009). "Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS." *J Neurosci* 29(37): 11511-11522.

Wade, D. T., P. Makela, P. Robson, H. House and C. Bateman (2004). "Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients." *Mult Scler* 10(4): 434-441.

Wang, H., Y. Katagiri, T. E. McCann, E. Unsworth, P. Goldsmith, Z. X. Yu, F. Tan, L. Santiago, E. M. Mills, Y. Wang, A. J. Symes and H. M. Geller (2008). "Chondroitin-4-sulfation negatively regulates axonal guidance and growth." *J Cell Sci* 121(Pt 18): 3083-3091.

Warrington, A. E., K. Asakura, A. J. Bieber, B. Ciric, V. Van Keulen, S. V. Kaveri, R. A. Kyle, L. R. Pease and M. Rodriguez (2000). "Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12): 6820-6825.

Waxman, S. G. (1998). "Demyelinating diseases--new pathological insights, new therapeutic targets." *N Engl J Med* 338(5): 323-325.

Wen, J., R. Ribeiro, M. Tanaka and Y. Zhang (2015). "Activation of CB2 receptor is required for the therapeutic effect of ABHD6 inhibition in experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neuropharmacology* 99: 196-209.

Wight, T. N., I. Kang and M. J. Merrilees (2014). "Versican and the control of inflammation." *Matrix Biol* 35: 152-161.

Wingerchuk, D. M. (2012). "Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression." *Ther Adv Neurol Disord* 5(1): 13-22.

Wolswijk, G. (1998). "Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells." *J Neurosci* 18(2): 601-609.

Wu, E. and C. S. Raine (1992). "Multiple sclerosis. Interactions between oligodendrocytes and

hypertrophic astrocytes and their occurrence in other, nondemyelinating conditions." *Lab Invest* 67(1): 88-99.

Xapelli, S., F. Agasse, S. Grade, L. Bernardino, F. F. Ribeiro, C. S. Schitine, A. S. Heimann, E. S. Ferrero, A. M. Sebastiao, R. A. De Melo Reis and J. O. Malva (2014). "Modulation of subventricular zone oligodendrogenesis: a role for hemopressin?" *Front Cell Neurosci* 8: 59.

Xu, B., D. Park, Y. Ohtake, H. Li, U. Hayat, J. Liu, M. E. Selzer, F. M. Longo and S. Li (2015). "Role of CSPG receptor LAR phosphatase in restricting axon regeneration after CNS injury." *Neurobiol Dis* 73: 36-48.

Yamada, H., K. Watanabe, M. Shimonaka and Y. Yamaguchi (1994). "Molecular cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family." *J Biol Chem* 269(13): 10119-10126.

Yamaguchi, Y. (2000). "Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix." *Cell Mol Life Sci* 57(2): 276-289.

Yang, T., W. Yin, V. D. Derevyanny, L. A. Moore and F. M. Longo (2005). "Identification of an ectodomain within the LAR protein tyrosine phosphatase receptor that binds homophilically and activates signalling pathways promoting neurite outgrowth." *Eur J Neurosci* 22(9): 2159-2170.

Yoshinaga, T., K. Uwabe, S. Naito, K. Higashino, T. Nakano, Y. Numata and A. Kihara (2016). "AM251 Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition of Renal Tubular Epithelial Cells." *PLoS One* 11(12): e0167848.

Zamvil, S. S. and L. Steinman (2003). "Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis." *Neuron* 38(5): 685-688.

Zeis, T., U. Graumann, R. Reynolds and N. Schaeren-Wiemers (2008). "Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection." *Brain* 131(Pt 1): 288-303.

Zhang, H. Y., M. Gao, H. Shen, G. H. Bi, H. J. Yang, Q. R. Liu, J. Wu, E. L. Gardner, A. Bonci and Z. X. Xi (2017). "Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats." *Addict Biol* 22(3): 752-765.

Zhang, Y. E. (2017). "Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9(2).

Zhao, R. R. and J. W. Fawcett (2013). "Combination treatment with chondroitinase ABC in spi-

nal cord injury--breaking the barrier." *Neurosci Bull* 29(4): 477-483.

Zhou, H. X., X. Y. Li, F. Y. Li, C. Liu, Z. P. Liang, S. Liu, B. Zhang, T. Y. Wang, T. C. Chu, L. Lu, G. Z. Ning, X. H. Kong and S. Q. Feng (2014). "Targeting RPTPsigma with lentiviral shRNA promotes neurites outgrowth of cortical neurons and improves functional recovery in a rat spinal cord contusion model." *Brain Res* 1586: 46-63.

Ziemssen, T. (2005). "Modulating processes within the central nervous system is central to therapeutic control of multiple sclerosis." *J Neurol* 252 Suppl 5: v38-45.

Zuo, J., Y. J. Hernandez and D. Muir (1998). "Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury." *J Neurobiol* 34(1): 41-54.

Zurawski, J., H. Lassmann and R. Bakshi (2017). "Use of Magnetic Resonance Imaging to Visualize Leptomeningeal Inflammation in Patients With Multiple Sclerosis: A Review." *JAMA Neurol* 74(1): 100-109.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius and E. D. Hogestatt (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* 400(6743): 452-457.

VII. ANEXOS

