

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Investigación del potencial neuroprotector de los
cannabinoides en un modelo murino de ataxia
espinocerebelosa tipo 3**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Luna Piñel

Directoras

**María del Sagrario Gómez Ruiz
María Luz Hernández Gálvez**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE PSICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Investigación del potencial neuroprotector de los cannabinoides en un
modelo murino de ataxia espinocerebelosa tipo 3.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Eva Luna Piñel

DIRECTORAS

María del Sagrario Gómez Ruiz
María Luz Hernández Gálvez

*A mi madre y a mi padre,
Por el amor incondicional que siempre me habéis dado.*

“Las neuronas son las misteriosas mariposas del alma,
cuyo batir de alas quién sabe
si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental”.

Santiago Ramón y Cajal

“Y volé contra todo pronóstico
Una noche de luna llena
Me perdí para encontrarme de nuevo
Ahora sé que valió la pena
Me quedé con lo imprescindible
Quemé el resto en las hogueras
Con el tiempo y con la distancia
Se ve todo de otra manera”

Mr. Kilombo – *Contra todo pronóstico*

AGRADECIMIENTOS

Ahora que se va acercando el final de este camino, es momento de parar y mirar hacia atrás. Es el momento de hacer balance de todo lo que ha ido ocurriendo a lo largo de estos años, lo bueno y lo malo, y de todo el camino que he recorrido hasta llegar a donde estoy hoy. Y no podría haber llegado hasta aquí sola, así que quiero dedicar las siguientes páginas a devolver a todas aquellas personas que me han ayudado a llegar hasta aquí, aunque sea una pequeña parte de lo que me han dado, en forma de palabras.

En primer lugar, a mis directoras de tesis: María, Mari Luz... Gracias por todas vuestras enseñanzas y por hacerme crecer como persona incluso más allá de lo que yo misma pensaba posible. Muchísimas gracias también a Javier, por acogerme en su laboratorio y por ser todo un ejemplo a seguir, tanto en lo personal como en lo profesional.

También quiero dedicar un agradecimiento muy especial a todas aquellas personas que me han acompañado de alguna manera en la línea de ataxias. Algunos habéis estado más, otros menos tiempo... Pero a todos tengo mucho que agradecerlos. Laura, eres alegría, gracias por haberme acompañado en Psicología, en Alcorcón, y hasta en Barcelona. Espero que nos tomemos muchos más cafés juntas. Edu, aunque entraste para que te enseñase cómo trabajábamos en el laboratorio, tú me enseñaste a mí todo lo que puede llegar a aportar una persona a una investigación simplemente con curiosidad e inteligencia. Te estás convirtiendo en un gran científico, y me siento súper feliz de haber visto tus inicios. Raquel, creo que has sido la persona con la que más he trabajado mano a mano, así que mil gracias por todos los momentos que hemos compartido, ha sido un soplo de aire fresco trabajar contigo. Mucha suerte en tu nueva etapa, no tengo ninguna duda de que vas a superar todo lo que te venga con éxito. Fátima, vales un montón y tienes una energía muy especial, no dejes que nadie te haga pensar lo contrario. Aunque hemos coincidido poquito, desde el primer momento me ha encantado trabajar contigo, gracias por hacer que mis últimos días de experimento fuesen mejores. Sara, Santos, Pablo, Luis... Aunque no hayan sido circunstancias fáciles, gracias a vosotros también.

Gracias también a todas las personas que me habéis acompañado en la parte de mi tesis que ha transcurrido en Medicina. Quiero empezar por darte las gracias, Yolanda, por cuidarnos tanto, y por hacer que cada vez que entro por la puerta de los despachos me sienta un poquito más en casa. A las jefas: Conchi, por esa comprensión y esa conexión tan especial, y por esos tréboles de cuatro hojas que dan suerte a mi nueva casita; Onin, por toda esa energía que derrochas allá por donde vas, y por esos temibles interrogatorios que al final nunca han sido tan terroríficos; Eva, tocaya, por tener siempre una sonrisa y una anécdota que contar (nunca se me

olvidará que fuiste la ganadora de los primeros premios *deficiente* a los que tuve el honor de asistir). Inés, gracias por todo lo que me has ayudado en el laboratorio, y por tener siempre una frase optimista lista para cuando se necesita. Jose Antonio, gracias por ver en mí a esa espía nórdica cuando defendí el TFM, y gracias por compartir con todos la ilusión de tu nueva etapa con tus nietos.

Mery, Vale, Carmen... A vosotras, mil gracias por todas esas conversaciones que me han ayudado tanto a poner las cosas en perspectiva, y por hacer que este camino haya sido más fácil. Sois geniales, gracias por acompañarme en este camino y por dejarme aprender de vosotras. A mis compañeras de tesis: Irene, empezamos en esto juntas y nunca has perdido esa ilusión y brilli brilli que te caracterizan, gracias por darle ese toque de color a la vida; Cris, gracias por tu cercanía y por todo lo que me has apoyado en estos últimos meses, por todos tus chistes malos y por ser una persona tan especial, vales un montón y te vas a comer el mundo; Laura, gracias por todos tus ánimos y por tu alegría, eres una de esas personas que saben sacar una sonrisa incluso en los momentos más complicados; Sonia, gracias por todo lo que me has enseñado y por esas galletas que has llevado al labo que sabían a felicidad; Claudia, gracias por ser de esas personas capaces de hacer reflexionar sobre cosas que damos por hecho; Marta, gracias por tener siempre un momento para charlar y preguntarme cómo voy. También quiero dar las gracias a los que habéis empezado en el labo hace poco (o relativamente poco), y con los que he tenido menos oportunidades de coincidir. Elisa, Santi, Jose Antonio... Con vosotros he coincidido menos, pero me quedo con los momentos que hemos compartido. Mucha suerte a todas, las que ya habéis terminado, las que estáis a medio camino, y las que estáis empezando. Mil gracias también a Ruth, por haberme acogido tan bien en Alcorcón los días que he ido allí, y por transmitir siempre una energía tan positiva.

No puedo olvidarme de todas esas personas que han pasado por el labo a lo largo de estos años: Sara, Cris, Fran, Mairon, Anna... Gracias por todo lo que pude aprender de vosotros. Larglinda, a ti quiero dedicarte un gracias muy especial por haberme dado esa luz en un momento tan complicado.

A todas las personas que he conocido en Psicología. Ana, Anita, a ti tengo que darte las GRACIAS en mayúsculas, negrita, subrayado, y con un tamaño de letra de 72 y aun así me quedaría corta. Gracias por haber sido una luz constante incluso en esos momentos más complicados, por todo lo que me has ayudado y apoyado y por hacer que el Animalario de Psico sea de los primeros sitios a los que quiero ir cuando voy a Somosaguas. Alicia, mi compañera de depósito de tesis y de nuevas aventuras, gracias por todo lo que estamos compartiendo y por

todo lo que vamos a compartir. Marta, Leti, Berta... Gracias por haberme acogido en el labo y por haberme hecho sentir como una más. Gracias por todas esas conversaciones mientras comíamos en los despachos o en el McDonald's, y por todos esos momentos en el laboratorio que hacen que el trabajo se sienta menos trabajo. Mucho ánimo con lo que os queda, que cada vez es menos. Víctor y Javi, gracias por tener siempre una sonrisa, una palabra de ánimo, y tiempo para ayudarme incluso cuando estabais hasta arriba (es decir, casi siempre). Sois unos cracks, os deseo muchísima suerte en todo lo que emprendáis. Pedro y Lucía, gracias por todos esos momentos compartidos en las interminables mañanas al criostato, espero que todo os vaya genial. Antonio, gracias por salvarme esa práctica de disección, por estar tan dispuesto siempre a echar una mano, y por haber tenido siempre una sonrisa. Gracias también a los profesores de Psicología, que han visto mis primeros pasos como profe y que siempre me han guiado cuando lo he necesitado.

También quiero aprovechar este momento para darte las gracias, Alberto, por haberme iniciado en el mundo de la investigación, y por haberme inculcado esa pasión por la ciencia. Gracias por acompañarme en mis primeros pasos como científica, y por haber sido siempre un referente para mí desde aquellas primeras clases en el PEAC.

Pasando al terreno de lo personal, no podría haber llegado hasta aquí sin haber estado rodeada de personitas maravillosas que siempre han estado al pie del cañón, dándome ánimos y sostén cuando más lo necesitaba, y acompañándome en este camino. Gracias a todos los que habéis estado siempre ahí, escuchándome y animándome cuando lo he necesitado. Gracias por dejarme compartir con vosotros los momentos buenos y los no tan buenos de este universo que ha sido mi tesis. Clau, gracias por esa comprensión tan especial. Miguel, gracias por estar tan pendiente siempre. Bea y Gabriel, gracias por todas esas cenas y conversaciones que hemos compartido. Nat, gracias por estar ahí, ahora y siempre. Germán, gracias por conseguir que nunca *pierda* de vista lo importante. Christian, gracias por enseñarme que nunca caminaré sola. Cris, gracias por compartir conmigo tu ilusión, optimismo, y tu manera de ver el mundo. María, gracias por esa conexión tan especial que se ha mantenido a lo largo de estos años, y por acompañarme siempre tan de cerca. Nerea, gracias por ser mi niña mayor preferida del mundo mundial, tengo muchísima suerte de estarte viendo crecer. Irene, gracias por todas esas conversaciones acompañadas de una de tus infusiones. Celia, gracias por tu optimismo y tu alegría, y por hacerme ver siempre el lado bueno de las cosas. María, Víctor, Carlos, Marina, Ángela, Fer, Patri, Gonza, Marina, Efrén, Ana, Eva, Juan, Álex, Dani, Fran... Mil gracias, todos y cada uno de vosotros habéis hecho que este camino sea más fácil.

A mis neurolocos preferidos: Nora, Cris, Marians, Chema, Ana, Carlos, Elisa, Juls, Merce, Dani. Tuve la suerte de conoceros en el máster y de seguir compartiendo momentos con vosotros. Por muchas más barbacoas, cervezas, cumpleaños y todos los planes que nos vaya trayendo la vida, gracias a todos por estar ahí.

Gracias también a mis compis del equipazo 2 y del resto del MBA. Fulvio, Paula, Mora, Blanca... He tenido la enorme suerte de que me acompañéis en el que posiblemente haya sido el curso más difícil de mi vida, y vosotros habéis hecho que se sienta hasta fácil. Que la vida nos siga juntando mucho más.

A Beatriz, Cris, Beíta, y Carlos. Gracias por hacer de mi tesis vuestra tesis. Me hacéis sentir en casa. Me siento súper afortunada.

A mi tía Pili, gracias por haber estado tan pendiente de mis avances mientras te recorrías medio mundo. Guardo con muchísimo cariño todos esos momentos que hemos vivido juntas, ya sea en persona o a través de una pantalla. Gracias por todo tu apoyo y tu cariño.

A mis hermanos, Diego, Miguel... He tenido la suerte de que me hicieseis hermana mayor. Gracias por todo lo que hemos compartido a lo largo de toda una vida, por todo vuestro apoyo en esta última etapa y siempre, y por entenderme tan bien. Gracias por hacerme reír incluso en los momentos más complicados, cuando hablo con vosotros los problemas parecen menos problemas.

A mi Tita, gracias, porque me has sostenido de una y mil maneras distintas. Desde que era pequeña y me llevabas a hombros para que no me cansase, hasta ahora, con todas las horas que hemos pasado al teléfono hablando de la tesis y de la vida. Aunque físicamente estemos lejos, siempre te siento muy cerca. Gracias por quererme tanto, y por estar siempre ahí.

Me estoy dejando para el final a las personas que han sido los pilares más fundamentales, no solo para conseguir terminar esta etapa, si no para la vida. Mamá, Papá, sin vosotros no sería la persona que soy hoy. Gracias por todo lo que habéis hecho por mí, ahora y siempre. Gracias por vuestro apoyo incondicional y por vuestro amor y cariño. Gracias por estado a mi lado en cada paso de todo este camino, y por ayudarme a ver siempre lo importante y a no perder la perspectiva. Soy tremendamente afortunada de ser vuestra hija.

Y a la persona que más ha vivido el día a día de la tesis en los últimos tiempos... Gon, esta tesis es tan tuya como mía. Gracias por ser el mejor compañero de equipo que podría tener. Me has ayudado a no caer en los momentos más difíciles, y me has dado alas en todos los demás.

Solo con estar ahí has hecho que todo fuese más fácil. Gracias por apoyarme tanto en este último tramo del camino de la tesis, y gracias por acompañarme en el camino de la vida.

A tod@s, de corazón, GRACIAS.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	17
ABREVIATURAS	21
RESUMEN/ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	35
1 Ataxias espinocerebelosas	37
1.1 Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (enfermedad de Machado Joseph)	39
1.1.1 Neuropatología de la SCA-3	40
1.1.2 Mecanismos moleculares patogénicos en la SCA-3	41
1.1.3 Características clínicas de la SCA-3	44
1.1.4 Posibilidades terapéuticas en la SCA-3	47
2 Sistema endocannabinoide	50
2.1 Receptores para cannabinoides	51
2.1.1 Receptores cannabinoides clásicos: CB ₁ y CB ₂	52
2.1.2 GPR55	54
2.2 Endocannabinoides	55
2.3 Metabolismo de los endocannabinoides	57
2.3.1 Síntesis	58
2.3.2 Eliminación	58
2.3.3 Endocannabinoides como precursores	61
2.4 Farmacología del SEC	61
2.5 Funciones del SEC en el SNC	62
2.5.1 Control de la actividad motora	63
2.5.2 Memoria y aprendizaje	63
2.5.3 Emoción	64
2.5.4 Neuroprotección	64
3 Sistema endocannabinoide y ataxia espinocerebelosa tipo 3	68
3.1 Estudios <i>postmortem</i> de cerebelos de pacientes con SCAs	68
3.2 Estudios en un modelo transgénico murino de SCA-3	69
OBJETIVOS	73
MATERIALES Y MÉTODOS	77
1 Diseños experimentales	79
1.1 Diseño experimental 1: Búsqueda de nuevas potenciales dianas terapéuticas en el SEC en un modelo murino de SCA-3.	79
1.2 Diseño experimental 2. Estudio del papel del receptor CB ₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes	80

2	Procedimientos experimentales	80
2.1	Animales de experimentación.....	80
2.2	Genotipado.....	81
2.3	Evaluación de la progresión de la enfermedad.....	83
2.3.1	Estado de salud	83
2.3.2	Evaluación neuroconductual.....	86
2.4	Técnicas histológicas	92
2.4.1	Preparación de muestras	92
2.4.2	Inmunohistoquímica	92
2.5	Técnicas bioquímicas.....	93
2.5.1	Preparación de muestras	93
2.5.2	Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR.....	93
3	Análisis estadísticos.....	95
	RESULTADOS	97
1	Diseño experimental 1. Búsqueda de nuevas potenciales dianas terapéuticas en el SEC en un modelo murino de SCA-3.	99
1.1	Evaluación del progreso de la enfermedad en un modelo murino de SCA-3.	100
1.1.1	Estado de salud	100
1.1.2	Evaluación neuroconductual.....	102
1.2	Estudio de la expresión de elementos del SEC en un modelo murino de SCA-3 ..	111
1.2.1	ABHD12	111
1.2.2	GPR55	126
2	Diseño experimental 2. Estudio del papel del receptor CB ₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes	140
2.1	Estado de salud	140
2.2	Evaluación neuroconductual.....	142
	DISCUSIÓN	147
1	Discusión parcial diseño experimental 1. Búsqueda de nuevas potenciales dianas terapéuticas en el SEC en un modelo murino de SCA-3.....	149
1.1	Evaluación del progreso de la enfermedad en un modelo murino de SCA-3	149
1.2	Dimorfismo sexual en un modelo murino de SCA-3	153
1.3	Estudio de la expresión de nuevos elementos del SEC en un modelo murino de SCA-3	155
2	Discusión parcial diseño experimental 2. Estudio del papel del receptor CB ₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes	158
3	Discusión General.....	162

CONCLUSIONES 167

BIBLIOGRAFÍA..... 171

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ATAXINA-3.....	40
FIGURA 2. PRINCIPALES ÁREAS AFECTADAS EN LA SCA-3.	41
FIGURA 3. PRINCIPALES MECANISMOS MOLECULARES PATOGENICOS EN LA SCA-3.	44
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DEL CEREBELO Y DE LAS FUNCIONES QUE SE POSTULA QUE ESTÁN ASOCIADAS A CADA REGIÓN. .	48
FIGURA 5. ESQUEMA GENERAL DE ALGUNOS ELEMENTOS DEL SEC Y DE LAS PRINCIPALES VÍAS DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN..	52
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS LIGANDOS ENDOCANNABINOIDES MÁS ABUNDANTES.....	55
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN SIMPLIFICADA DE LA SEÑALIZACIÓN RETRÓGRADA MEDIADA POR LOS ENDOCANNABINOIDES.	57
FIGURA 8. DISTRIBUCIÓN CELULAR DE LAS ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DEL ENDOCANNABINOIDE 2-AG.....	59
FIGURA 9. MECANISMOS NEUROPROTECTORES EN LOS QUE ESTÁ IMPLICADO EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.	67
FIGURA 10. MUESTRA DEL GEL DE GENOTIPADO SCA-3.	82
FIGURA 11. MUESTRA DEL GEL DE GENOTIPADO CB ₂	83
FIGURA 12. PRUEBA DE <i>CLASPING</i>	85
FIGURA 13. PRUEBA DE <i>HANGING WIRE</i>	86
FIGURA 14. PRUEBA DE <i>ROTAROD</i>	87
FIGURA 15. PRUEBA DEL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS.	90
FIGURA 16. TEST DEL CILINDRO.....	90
FIGURA 17. EVALUACIÓN DEL PESO	100
FIGURA 18. EVALUACIÓN DEL GRADO DE DISTONÍA	101
FIGURA 19. IMAGEN CIFOSIS DE LOS ANIMALES SCA-3.....	101
FIGURA 20. SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES SCA-3.	102
FIGURA 21. ANÁLISIS DE LA FUERZA MUSCULAR.	103
FIGURA 22. ESTUDIO DE LA COORDINACIÓN MOTORA.	103
FIGURA 23. ESTUDIO DEL CONTROL MOTOR JERÁRQUICO.....	105
FIGURA 24. ESTUDIO DEL APRENDIZAJE MOTOR.	107
FIGURA 25. ESTUDIO DEL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL	109
FIGURA 26. ESTUDIO DE PARÁMETROS EMOCIONALES	110
FIGURA 27. INMUNOHISTOQUÍMICA DE ABHD12 EN CEREBELO.	112
FIGURA 28. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN EL NÚCLEO DENTADO DEL CEREBELO	113
FIGURA 29. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA SUSTANCIA BLANCA DEL CEREBELO.....	114
FIGURA 30. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA CAPA GRANULAR DEL CEREBELO	115
FIGURA 31. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA CAPA MOLECULAR DEL CEREBELO.....	116
FIGURA 32. INMUNOHISTOQUÍMICA DE ABHD12 DEL NÚCLEO PONTINO DEL TRONCO ENCEFÁLICO	117
FIGURA 33. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN EL NÚCLEO PONTINO DEL TRONCO ENCEFÁLICO	118
FIGURA 34. INMUNOHISTOQUÍMICA DE ABHD12 EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL.....	119
FIGURA 35. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA CAPA PIRAMIDAL DE LA REGIÓN CA1.....	120
FIGURA 36. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA CAPA PIRAMIDAL DE LA REGIÓN CA2.....	121
FIGURA 37. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA CAPA PIRAMIDAL DE LA REGIÓN CA3.....	122
FIGURA 38. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN LA CAPA POLIMÓRFICA DEL GIRO DENTADO.....	123
FIGURA 39. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA ENZIMA ABHD12 EN EL CUERPO ESTRIADO	124
FIGURA 40. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm PARA LA ENZIMA ABHD12	125
FIGURA 41. INMUNOHISTOQUÍMICA DE GPR55 EN CEREBELO	126
FIGURA 42. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN EL NÚCLEO DENTADO DEL CEREBELO	127
FIGURA 43. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA SUSTANCIA BLANCA DEL CEREBELO.....	128
FIGURA 44. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA GRANULAR DEL CEREBELO	129
FIGURA 45. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA MOLECULAR DEL CEREBELO	130
FIGURA 46. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA DE LAS NEURONAS DE PURKINJE	131
FIGURA 47. INMUNOHISTOQUÍMICA DE GPR55 DEL NÚCLEO PONTINO DEL TRONCO ENCEFÁLICO	132
FIGURA 48. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN EL NÚCLEO PONTINO DEL TRONCO ENCEFÁLICO	133
FIGURA 49. INMUNOHISTOQUÍMICA DE GPR55 EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL.....	134
FIGURA 50. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA PIRAMIDAL DE LA REGIÓN CA1	135
FIGURA 51. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA PIRAMIDAL DE LA REGIÓN CA2	136

FIGURA 52. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA PIRAMIDAL DE LA REGIÓN CA3	137
FIGURA 53. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN LA CAPA GRANULAR DEL GIRO DENTADO	138
FIGURA 54. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA EL RECEPTOR GPR55 EN EL CUERPO ESTRIADO.....	139
FIGURA 55. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPRESIÓN DEL RECEPTOR CB ₂ EN EL PESO.....	141
FIGURA 56. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPRESIÓN DEL RECEPTOR CB ₂ EN EL GRADO DE DISTONÍA	142
FIGURA 57. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPRESIÓN DEL RECEPTOR CB ₂ EN LA FUERZA MUSCULAR.	143
FIGURA 58. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPRESIÓN DEL RECEPTOR CB ₂ EN LA COORDINACIÓN MOTORA	143
FIGURA 59. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPRESIÓN DEL RECEPTOR CB ₂ EN EL APRENDIZAJE MOTOR.	145
FIGURA 60. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LAS PRINCIPALES ALTERACIONES QUE APARECEN EN EL MODELO DE SCA-3	151

TABLA 1. SUBTIPOS DE ATAXIAS ESPINOCEREBELOSAS.	38
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE SCA-3.....	45
TABLA 3. PROCESOS NEUROBIOLÓGICOS MEDIADOS POR EL SEC	62
TABLA 4. ALTERACIONES ENCONTRADAS EN LA EXPRESIÓN DE DISTINTOS ELEMENTOS DEL SEC EN LA SCA-3 EN HUMANOS.	69
TABLA 5. ALTERACIONES ENCONTRADAS EN LA EXPRESIÓN DE DISTINTOS ELEMENTOS DEL SEC EN LA SCA-3 EN RATÓN.	71
TABLA 6. ÍNDICE DE EVALUACIÓN DE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD.....	84
TABLA 7. MATRIZ EN LA QUE SE RECOGEN LAS TRANSICIONES DE GROOMING	91
TABLA 8. ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA POR DAB.	93
TABLA 9. SONDAS TAQMAN UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA.....	94

ABREVIATURAS

Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
2-AG	2-araquidonoilglicerol
AA	Ácido araquidónico
ABHD	Hidrolasas que contienen un dominio α/β
ABHD12	Hidrolasa que contiene un dominio α/β 12
ABHD6	Hidrolasa que contiene un dominio α/β 6
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Araquidonoiletanolamina o anandamida
AMT	Transportadores de membrana de anandamida
ARN	Ácido ribonucleico
atxn3	Ataxina 3
BSA	Álbumina de suero bovino
CAG	Citosina-Adenina-Guanina
CAI	Centro de apoyo a la investigación
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
COX-2	Ciclooxigenasa 2
DAG	Diacilglicerol
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
EA	Etanolamina
EET	Epoxyeicosatrienicos
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
FAAH	Amilohidrolasa de ácidos grasos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GPR55	Receptor acoplado a proteínas G 55
JD	Josephin Domain
KO	<i>Knockout</i>
KPBS	Tampón fosfato salino con potasio
LOX	Lipooxigenasa
LPI	Lisofosfatidilinositol
LTP	Potenciación a largo plazo
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MJD	Enfermedad de Machado Joseph
NAE	N-acetiletanolamina
NAPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamina
NAT	N-aciltransferasa
NIH	Institutos Nacionales de Salud
NMDA	N-metil-D-aspartato
Nrf2	Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PE	Fosfatidiletanolamina
PEO	Oftalmoplegia externa progresiva
PHARC	Polineuropatía, pérdida auditiva (<i>Hearing loss</i>), Ataxia, Retinitis pigmentosa y Cataratas
PIP2	Fosfatidilinositol-bi-fosfato
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
polyQ	Poliglutamina
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
RBD	Desorden del sueño REM
RLS	Síndrome de piernas inquietas
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SCA	Ataxia espinocerebelosa
SCA-3	Ataxia espinocerebelosa tipo 3
SEC	Sistema endocannabinoide
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SUMO	Modificador pequeño similar a ubiquitina
TG	Transgénico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPV1	Receptor de vanilloides
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UIM	Sitios de interacción con ubiquitinas
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN/ABSTRACT

Investigación del potencial neuroprotector de los cannabinoides en un modelo murino de ataxia espinocerebelosa tipo 3

Introducción

La ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA-3) es una enfermedad neurodegenerativa de origen genético. Esta enfermedad es causada por un aumento patológico en el número de repeticiones del triplete CAG en el gen que codifica la ataxina-3. El síntoma más característico de esta enfermedad es la aparición de ataxia progresiva, que suele ir acompañada de un amplio abanico de síntomas entre los que se incluyen alteraciones en algunas funciones cognitivas. Como en muchas otras enfermedades neurodegenerativas, hasta la fecha no se ha desarrollado ningún tratamiento efectivo para la SCA-3, por lo que se hace necesario buscar posibles dianas terapéuticas.

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema neuromodulador cuya activación puede desencadenar una serie de respuestas neuroprotectoras. Se ha visto que en la SCA-3, al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, algunos de los elementos clásicos del SEC, como los receptores CB₁ y CB₂, y las enzimas de degradación FAAH y MAGL están desregulados. Por ello, el SEC se posiciona como una prometedora opción terapéutica para esta patología.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis es profundizar en el estudio del potencial terapéutico del SEC en la SCA-3 en un modelo murino de esta enfermedad (ratones CMVMJD150Q). Para abordarlo, se establecieron los siguientes objetivos específicos, abordados en sendos diseños experimentales:

Objetivo #1: Investigar el estado de elementos no clásicos del SEC (el receptor GPR55 y la enzima ABHD12) en la SCA-3 con el fin de identificar nuevas dianas farmacológicas para su tratamiento.

Objetivo #2: Estudiar el papel del receptor CB₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3.

Resultados

En la primera parte del DISEÑO EXPERIMENTAL 1, se realizó la caracterización del progreso de la enfermedad en el modelo murino CMVMJD150Q. A medida que avanzaba la enfermedad, estos ratones desarrollan síntomas característicos de la SCA-3: debilitamiento muscular, distonía, descoordinación motora, alteraciones en el control motor jerárquico, déficits

en aprendizaje y memoria, y síntomas de estrés y ansiedad. El estudio de estos parámetros nos permitió establecer 3 etapas en la progresión de la enfermedad: una etapa sintomática temprana (hasta las 8 semanas de edad), una etapa sintomática intermedia (8-16 semanas) y una etapa sintomática avanzada (16-32 semanas). Los estudios se hicieron tanto en machos como en hembras, para ver si existen diferencias en función del sexo, como se ha descrito que puede ocurrir en otras enfermedades neurodegenerativas. De esta manera encontramos que, en términos generales, la enfermedad progresaba de manera más rápida y severa en los machos que en las hembras.

Una vez caracterizado el modelo se estudió el estado del receptor GPR55 y la enzima ABHD12, en las tres etapas de la enfermedad y en las principales regiones del encéfalo implicadas en los parámetros conductuales alterados en la enfermedad: cerebelo, tronco encefálico, hipocampo y estriado.

En todas estas regiones, a excepción del estriado, hemos encontrado cambios en la expresión de ABHD12 en los animales SCA-3 con respecto de sus controles que dependen de la edad y del sexo, pero siempre en etapas tempranas o intermedias de la enfermedad. Se observó una disminución en la expresión de la enzima en los animales SCA-3 de ambos sexos en el núcleo dentado del cerebelo y núcleo pontino del tronco encefálico. En la sustancia blanca del cerebelo y en la región CA1 del hipocampo de los machos SCA-3 se encontró un aumento en la expresión de ABHD12 en la etapa temprana e intermedia de la enfermedad respectivamente. Estas alteraciones de esta enzima podrían repercutir en los niveles de endocannabinoides y de otros mediadores lipídicos y producir un desequilibrio a nivel funcional que podría estar implicado en los procesos patológicos de la enfermedad.

No se encontraron cambios significativos en la expresión de GPR55 en ninguno de los sexos en ninguna de las regiones estudiadas a ninguna de las edades.

En el DISEÑO EXPERIMENTAL 2, la ausencia de receptor CB₂ produce un adelantamiento de la distonía en los dobles mutantes de ambos sexos y del deterioro del aprendizaje motor en las hembras. Precisamente, estos parámetros no se encuentran afectados en esta etapa sintomática temprana de la SCA-3, y el hecho de que aparezcan afectados sólo en los dobles mutantes de esta edad hace sospechar que el receptor CB₂ puede tener un efecto neuroprotector en las estructuras que median estas conductas, por lo que podría ser una diana terapéutica prometedora para la SCA-3.

Conclusiones

1. Nuestros resultados muestran aspectos sexualmente dimórficos en el desarrollo de la patología (síntomatología motora, cognitiva y emocional), en la expresión de elementos no clásicos del SEC (ABHD12), y en la respuesta a la manipulación de elementos clásicos (receptor CB₂)
2. En relación al desarrollo de la SCA-3, los machos presentan una progresión más rápida en la aparición de algunos síntomas, así como una mayor severidad en las manifestaciones de alguna sintomatología. De esta manera, en los ratones macho SCA-3 se adelanta la manifestación de déficits en aprendizaje motor y emoción. Además, en este sexo la pérdida de peso, el grado de distonía y la debilidad muscular son más evidentes que en el caso de las hembras.
3. De los elementos de señalización cannabinoide no clásicos estudiados, el GPR55 no se ve alterado en la SCA-3 en las estructuras encefálicas y a las edades estudiadas, en ninguno de los dos sexos, mientras que la enzima de degradación de cannabinoides ABHD12 sí presenta alteraciones significativas en los animales SCA-3.
4. Las alteraciones en ABHD12 no muestran el mismo tipo de respuesta (disminución/aumento) en las estructuras, etapas de la enfermedad y sexo estudiados. Esto podría deberse a los diferentes sustratos celulares en los que se puede encontrar esta enzima. Los cambios observados en ABHD12 aparecen en edades tempranas o intermedias de la SCA-3, no así en las fases más avanzadas.
5. En regiones de sustancia gris afectadas en la SCA-3 (núcleo dentado y núcleo pontino) se produce una disminución de la expresión de ABHD12 en edades tempranas en ambos sexos. Esta disminución se mantiene exclusivamente en el caso de las hembras hasta edades intermedias.
6. El aumento de la expresión de la enzima ABHD12, sólo se observa en el caso de los machos, en edades tempranas en sustancia blanca del cerebelo y en etapas intermedias en la región CA1 del hipocampo.
7. La manipulación del SEC mediante el silenciamiento del receptor CB₂ produce un adelantamiento del fenotipo neuropatológico de la SCA-3 en edades tempranas. La ausencia del receptor CB₂, por un lado, afecta a ambos sexos en relación al adelantamiento de la aparición de distonía, mientras que adelanta la aparición de los déficits en el aprendizaje motor a etapas tempranas en el caso de las hembras.

Investigating the neuroprotective potential of cannabinoids in a murine model of spinocerebellar ataxia type 3

Introduction

Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA-3) is a neurodegenerative disease of genetic origin. This disease is caused by a pathological increase in the number of CAG triplet repeats in the gene encoding ataxin-3. The most characteristic symptom of this disease is the onset of progressive ataxia, which is usually accompanied by a wide range of symptoms including alterations in some cognitive functions. As in many other neurodegenerative diseases, no effective treatment for SCA-3 has been developed to date, making it necessary to search for possible therapeutic targets.

The endocannabinoid system (ECS) is a neuromodulatory system whose activation can trigger several neuroprotective responses. It has been shown that in SCA-3, as in other neurodegenerative diseases, some of the classical elements of the ECS, like the CB₁ and CB₂ receptors, as well as the degradation enzymes FAAH and MAGL, are deregulated. Therefore, ECS is positioned as a promising therapeutic option for this pathology.

Objectives

The overall objective of this Thesis is to further study the therapeutic potential of ECS in SCA-3 in a murine model of this disease (CMVMJD150Q mice). To address this, the following specific objectives were established, addressed in separate experimental designs:

Objective #1: To investigate the status of non-classical SEC elements (the GPR55 receptor and the ABHD12 enzyme) in SCA-3 in order to identify new pharmacological targets for its treatment.

Objective #2: To study the role of the CB₂ receptor in the development of the pathological phenotype of SCA-3 by generating KO-CB₂/SCA-3 double mutant mice.

Results

In the first part of EXPERIMENTAL DESIGN 1, a characterization of the disease's progression was performed in the CMVMJD150Q murine model. As the disease progressed, these mice developed several characteristic symptoms of SCA-3: muscle weakness, dystonia, motor incoordination, alterations in hierarchical motor control, deficits in learning and memory, and symptoms of stress and anxiety. The study of these parameters allowed us to establish 3 stages in the progression of the disease: an early symptomatic stage (up to 8 weeks of age), an

intermediate symptomatic stage (8-16 weeks) and an advanced stage (16-32 weeks). The studies were done in both males and females, to see if there are sex differences, as has been described in other neurodegenerative diseases. We found that, generally speaking, the disease progressed more rapidly and severely in males than in females.

Once the model was characterized, we studied the status of the GPR55 receptor and the ABHD12 enzyme in the three stages of the disease and in the main brain regions involved in the behavioural parameters altered in the disease: cerebellum, brainstem, hippocampus, and striatum.

In all these regions, with the exception of the striatum, we have found age- and sex-dependent changes in ABHD12 expression in SCA-3 animals in comparison with their controls, but always in early or intermediate stages of the disease. A decrease in enzyme expression in SCA-3 animals of both sexes was observed in the dentate nucleus of the cerebellum and pontine nucleus of the brainstem. In the white matter of the cerebellum and in the CA1 region of the hippocampus of SCA-3 males, an increase in ABHD12 expression was found in the early and intermediate stage of the disease, respectively. These alterations of this enzyme could have an impact on the levels of endocannabinoids and other lipid mediators and produce an imbalance on the functional level that could be involved in the pathological processes of the disease.

No significant changes in GPR55 expression were found in either sex in any of the regions studied at any of the ages.

In EXPERIMENTAL DESIGN 2, absence of CB₂ receptor results in an advancement of dystonia in double mutants of both sexes and of motor learning impairment in females. Considering these parameters are not affected in this early symptomatic stage of SCA-3, and the fact that they appear affected only in double mutants of this age raises the suspicion that the CB₂ receptor may have a neuroprotective effect on the structures mediating these behaviours, and thus could be a promising therapeutic target for SCA-3.

Conclusions

1. Our results show sexually dimorphic aspects in the development of the pathology (motor, cognitive and emotional symptomatology), in the expression of non-classical elements of the SEC (ABHD12), and in the response to the manipulation of classical elements (CB₂ receptor).

2. Regarding the development of SCA-3, males present a more rapid progression in the appearance of some symptoms, as well as increased severity in the manifestations of some

symptomatology. Thus, in male SCA-3 mice, the manifestation of motor learning and emotion deficits happens earlier. In addition, in this sex, weight loss, the degree of dystonia and muscle weakness are more evident than in females.

3. Among the non-classical cannabinoid signalling elements studied, GPR55 is not altered in SCA-3 in the encephalic structures and at the ages studied, for either sex, while the cannabinoid degrading enzyme ABHD12 does show significant alterations in SCA-3 animals.

4. Alterations in ABHD12 do not show the same type of response (decrease/increase) in the studied structures, disease stages and sex. This could be due to the different cellular substrates in which this enzyme can be found. The changes observed in ABHD12 appear in early or intermediate ages of SCA-3, but do not in the more advanced stages.

5. In regions of gray matter affected in SCA-3 (dentate nucleus and pontine nucleus) there is a decrease in ABHD12 expression at early ages in both sexes. This decrease is maintained exclusively in females until intermediate ages.

6. The increase in ABHD12 enzyme expression is only observed in the case of males, at early ages in the white matter of the cerebellum and at intermediate stages in the CA1 region of the hippocampus.

7. Manipulation of the SEC by silencing the CB₂ receptor results in an earlier neuropathological phenotype of SCA-3 at early ages. On one hand, the absence of the CB₂ receptor, affects both sexes in relation to the advancement of the onset of dystonia, while on the other hand it advances the onset of motor learning deficits at early stages in the case of females.

INTRODUCCIÓN

1 Ataxias espinocerebelosas

Ataxia es un término que proviene del griego y que significa falta de orden¹, y puede hacer referencia tanto a un síntoma clínico, caracterizado por descoordinación motora, como a un conjunto de enfermedades neurodegenerativas cuya principal característica es la aparición progresiva de ataxia. Las ataxias como enfermedad pueden clasificarse según su etiología, ya que pueden ser adquiridas por diversas causas a lo largo de la vida del individuo (causas vasculares, infecciosas, metabólicas, tóxicas, etc.) o tener un origen genético. Dentro de las ataxias de origen genético podemos encontrar las ataxias ligadas al cromosoma X, las ataxias autosómicas recesivas y las ataxias autosómicas dominantes, que son el grupo más frecuente². Las ataxias espinocerebelosas, también conocidas como SCAs por sus siglas en inglés (*spinocerebellar ataxias*), pertenecen a este último grupo. Las SCAs son un conjunto muy heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas cuyo principal síntoma suele ser la pérdida de coordinación y equilibrio, acompañado por dificultades en el habla^{1,3}. La mayor parte de las SCAs se dan al producirse un aumento en el número de repeticiones del triplete CAG (Citosina-Adenina-Guanina), que codifica el aminoácido glutamina, por lo que su aparición suele estar relacionada con la aparición de proteínas poliglutamínicas tóxicas¹.

El inicio de la sintomatología de estas enfermedades suele situarse en la mediana edad, aunque pueden existir casos en los que la manifestación comience en la infancia o a edades tardías^{4,5}. La movilidad y la capacidad de comunicación de los pacientes con algún tipo de SCA se ven muy perjudicadas, lo que afecta seriamente a su calidad de vida. Hay muchas SCAs que llevan a una muerte prematura⁵⁻⁷.

Actualmente se han identificado más de 40 subtipos de SCAs genéticamente distintas (**Tabla 1**). A cada subtipo se le denomina “SCA” seguido de un número, que representa el orden en el que el locus o el gen causante de la correspondiente SCA fue identificado¹, y cada subtipo de SCA presenta una sintomatología concreta. Por otra parte, el término “espinocerebelosa” fue elegido para representar la afectación habitual de la médula espinal y del cerebelo en estas enfermedades, pero se ha visto que la médula espinal no se encuentra alterada en todas las SCAs, y que también pueden verse afectadas otras estructuras del sistema nervioso como los ganglios basales, el tronco cerebral, o los nervios periféricos¹.

Subtipo SCA	Mutación	Locus	Producto del gen (proteína)
SCA 1	(CAG)n	6p	ATXN 1
SCA 2	(CAG)n	12q	ATXN 2
SCA 3	(CAG)n	14q	ATXN 3
SCA 4	-	16q	-
SCA 5	Delección Mutación con cambio de sentido	11p	SPTBN
SCA 6	(CAG)n	19p	CACNA1A
SCA 7	(CAG)n	3p	ATXN 7
SCA 8	(CAG)n	13q	KLHL-1
SCA 10	(ATTCT)n	22q	ATXN 10
SCA 11	Cambio de marco de lectura	15q	TTBK2
SCA 12	(CAG)n	5q	PP2A-2R2B
SCA 13	Mutación puntual	19q	KCNC3
SCA 14	Mutación puntual	19q	PKC- γ
SCA 15/16 (a)	Delección	3p	ITPR
SCA 17	(CAG)n	6q	TBP
SCA 18	-	7q	-
SCA 19/22 (b)	Mutación puntual	1p	KCND3
SCA 20	Duplicación	11q	-
SCA 21	-	7p	-
SCA 23	Mutación puntual	20p	-
SCA 25	-	2p	-
SCA 26	-	19p	-
SCA 27	Mutación con cambio de sentido	13q	FGF14
SCA 28	Mutación con cambio de sentido	18p	AFG3L2
SCA 29	-	3p	-
SCA 30	-	4q	-
SCA 31	(TGGAA)n	16q	-
SCA 32	-	7q	-
SCA 34	-	16p	-
SCA 35	Mutación puntual	20p	TGM6
SCA 36	(GGCCTG)n	20p	NOP56
DRPLA	(CAG)n	12p	ATN 1

Tabla 1. Subtipos de ataxias espinocerebelosas. **ATXN 1:** ataxina-1. **ATXN 2:** ataxina-2. **ATXN 3:** ataxina-3. **SPTBN:** espectrina β -III. **CACNA1A:** subunidad del canal del calcio tipo P/Q. **ATXN 7:** ataxina-7. **KLHL-1:** proteína de unión a actina. **ATXN-10:** ataxina-10. **TTBK2:** quinasa tautubulina-2. **PP2A-2R2B:** subunidad β reguladora de la fosfatasa2A. **KCNC3:** canal de potasio familia C. **PKC- γ :** proteína quinasa C- γ . **ITPR:** receptor IP3. **TBP:** proteína de unión a caja TATA. **KCND3:** canal potasio familia D. **FGF14:** factor 14 del crecimiento de fibroblastos. **AFG3L2:** ATPasa mitocondrial. **TGM6:** transglutaminasa 6. **NOP56:** ribonucleoproteína 56. **ATN 1:** atropina 1; De acuerdo con las pruebas genéticas a pacientes originalmente clasificados en SCA15 y SCA16 (a), ambas son el mismo tipo de SCA. Sucede lo mismo con SCA19 y SCA22 (b). Los campos marcados con (-) representan datos no identificados. Adaptada de [8].

Existe una marcada variabilidad tanto geográfica como étnica en la frecuencia con la que aparecen las SCAs, debido principalmente a efectos poblacionales y demográficos, como pueden ser efectos migratorios, efectos fundadores, o deriva genética^{9,10}. El subtipo de SCA más prevalente es la ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA-3)^{11,12}. La SCA-3 comprende entre el 15% y el 45% de todas las SCAs en la mayoría de etnias y países, llegando a alcanzar el máximo de su frecuencia relativa en Rio Grande do Sul (Brasil), donde supone el 89% de SCAs¹¹. Es en este subtipo de SCA en el que nos vamos a centrar en la presente Tesis Doctoral.

1.1 Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (enfermedad de Machado Joseph)

La ataxia espinocerebelosa tipo 3 también es conocida por sus siglas SCA-3 o como enfermedad de Machado Joseph (MJD). Fue descrita por primera vez en dos familias portuguesas en la década de los 70^{13,14}. A nivel global se considera una enfermedad rara, ya que su prevalencia se estima entre los 0,3-2,0 casos por cada 100.000 habitantes¹⁵, pero al igual que ocurre con el resto de las SCAs su frecuencia no es homogénea, incluso dentro del mismo país. Por ejemplo, en el caso de Portugal la SCA-3 es relativamente poco frecuente en la parte continental (1/100.000), pero es muy prevalente en las Islas Azores, siendo en la Isla de Flores donde la prevalencia es la más alta del mundo (1/239)^{11,15}.

La SCA-3 se produce cuando aparece un aumento en el número de repeticiones del triplete citosina-adenina-guanina (CAG), que codifica para el aminoácido glutamina, en la región codificante del exón 10 del gen ATXN3, que codifica para la proteína ataxina-3¹⁶. Este gen se encuentra en el locus 14q31.1, y se identificó en 1994¹⁶.

La ataxina-3 (Atxn3) es una proteína modular (**Figura 1**), que contiene un dominio globular N-terminal (conocido como *Josephin domain*, JD), y una cola flexible C-terminal que contiene sitios de interacción con ubiquitinas (UIM, del inglés *ubiquitin interaction motifs*) y una región rica en poliglutamina (polyQ)^{17,18}. En condiciones no patogénicas, esta región polyQ tiene entre 12 y 40 repeticiones de CAG. Las mutaciones que llevan a la expansión de la secuencia de poliglutamina representan el mayor desencadenante de la aparición de la SCA-3, que suele manifestarse cuando los individuos presentan más de 60 repeticiones^{5,19,20}. Es poco habitual que aparezca un número de repeticiones intermedias²¹. El número de repeticiones determina la severidad y la edad de aparición de los síntomas, ya que cuanto mayor sea este número las manifestaciones se darán antes y de manera más severa^{4,15,22}. De hecho, una vez que el número de repeticiones alcanza el umbral patogénico se vuelve inestable, y suele ocurrir un fenómeno conocido como anticipación, en el que la longitud de las repeticiones aumenta con el paso de

las generaciones, con el consiguiente incremento en la severidad de los síntomas y la aparición cada vez más temprana de la enfermedad²³. Esta inestabilidad intergeneracional en el número de repeticiones del triplete CAG suele ocurrir con mayor frecuencia en la transmisión vía paterna, ya que estos alelos son más propensos a modificar su longitud al ser transmitidos a la siguiente generación^{24,25}.

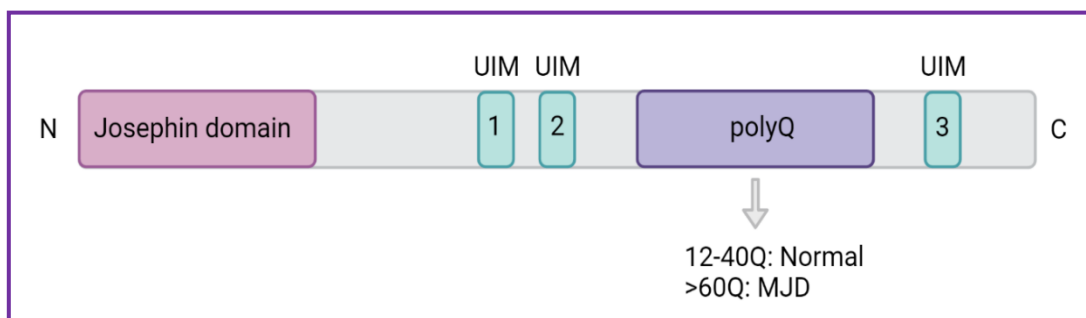


Figura 1. Representación esquemática de la ataxina-3. Adaptado de [18].

La ataxina-3 se expresa de manera ubicua en tejidos tanto neuronales como no neuronales, y en condiciones no patológicas se localiza en el citoplasma y en el núcleo celular. Esta proteína regula la estabilidad de otras proteínas. En condiciones fisiológicas normales, la ataxina-3 tiene actividad catalítica, ya que es una enzima desubiquitinazante que elimina y desmonta cadenas de ubiquitina de sustratos específicos. Mientras que la ataxina-3 mutada con un elevado número de repeticiones induce estrés celular debido a su tendencia a formar agregados, las funciones habituales de la ataxina-3 no mutada están relacionadas precisamente con contrarrestar estas condiciones de estrés originadas por agregados proteicos, tanto de esta como de otras proteínas. Por lo tanto, parece probable que la aparición de la enfermedad venga determinada por la pérdida de función de esta proteína^{17,26,27}.

1.1.1 Neuropatología de la SCA-3

Desde un punto de vista neuropatológico, hay afectación en diversas estructuras y de manera variable, principalmente en cerebelo, tronco encefálico, ganglios basales y médula espinal²⁸ (**Figura 2**). En el cerebelo se ha descrito atrofia y pérdida de neuronas en el núcleo dentado, mientras que las células de Purkinje permanecen relativamente preservadas en comparación con otros subtipos de SCAs^{29,30}, aunque está descrita una cierta pérdida de las

mismas, especialmente en la corteza del vermis³¹. También hay afectación en los pedúnculos superiores y medios cerebelares, y en el tracto espinocerebeloso. Por su parte, en el tronco encefálico existe neurodegeneración en los núcleos pontino, vestibular y motores. Respecto a los ganglios basales, se han encontrado alteraciones en el estriado, globo pálido, núcleo subtalámico y en la sustancia nigra. También aparece neurodegeneración en la asta anterior de la médula espinal^{15,30,32}.

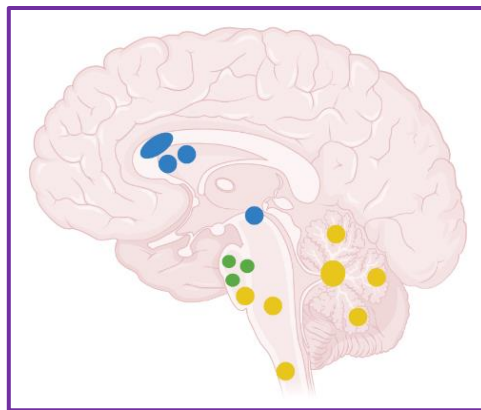


Figura 2. Principales áreas afectadas en la SCA-3. **Amarillo:** pérdida de neuronas. **Verde:** afectación de nervios craneales. **Azul:** afectación de núcleos extrapiramidales. Adaptada de [29].

1.1.2 Mecanismos moleculares patogénicos en la SCA-3

A pesar de que el origen genético de la SCA-3 se definió hace décadas, aún no se conocen por completo los mecanismos por los que se produce la muerte neuronal, aunque existe consenso en que son varios los procesos celulares y moleculares implicados. Estos procesos pueden afectar tanto a la función de la ataxina-3 normal como a la vulnerabilidad celular ante la mutación, y actúan en conjunto generando una disfunción en la célula que termina conduciendo a la degeneración y muerte neuronal¹⁵. Entre los mecanismos implicados en la neurodegeneración en la SCA-3 se incluyen (**Figura 3**):

• Alteraciones en la conformación de la ataxina-3

Como en otras enfermedades poliglutamínicas, las mutaciones en la ataxina-3 hacen que la proteína no se pliegue correctamente y forme agregados, lo que produce una alteración en la homeostasis proteica²¹. Estos agregados a menudo se encuentran en el interior de los núcleos celulares de poblaciones específicas de neuronas. La ataxina-3 mutada parece ser más tóxica en el núcleo que en el citoplasma³³, poniendo de manifiesto la importancia de los agregados nucleares en la patogénesis de la enfermedad. Las inclusiones intranucleares de ataxina-3 son esferas positivas para ubiquitina que pueden tener un tamaño desde uno a varios micrómetros de diámetro y que pueden contener también otras proteínas. Estas inclusiones son especialmente abundantes en las neuronas del núcleo pontino, pero también se han observado en otras poblaciones del tronco encefálico, en el tálamo, y en el estriado, aunque en este último es menos frecuente. A pesar de que la formación de agregados es un marcador de la enfermedad, no existe una correlación clara entre las regiones que presentan estas formaciones y las regiones que muestran una mayor degeneración^{15,30,34}.

No se conocen los mecanismos exactos por los que los agregados proteicos son perjudiciales para la célula, pero se ha postulado que pueda ser debido a que recluten proteínas, factores de transcripción, y otras unidades del proteasoma importantes para las funciones celulares³⁵⁻³⁸, o porque incapaciten físicamente la función nuclear o el transporte³⁹⁻⁴³. De hecho, se han detectado agregados en los axones en varias de las regiones afectadas en la SCA-3, y se ha sugerido que los agregados axonales puedan ser incluso más relevantes para la neurodegeneración que los agregados nucleares⁴⁴.

• Alteraciones en los mecanismos post-traduccionales

Como se ha mencionado anteriormente, no existe una correlación entre la abundancia de agregados proteicos en las neuronas y el grado de afectación que presenta el tejido. Esto podría ser debido a las modificaciones post-traduccionales de la ataxina-3, que podrían estar alteradas en la proteína mutada desencadenando mecanismos que expliquen la agregación selectiva y el patrón de degradación. Hasta ahora se han descrito tres mecanismos de modificación post-traduccionales en la ataxina-3. El primero, la ubiquitinación, es un proceso que potencia la actividad desubiquitinasa que posee la proteína^{45,46}, y que se ha visto que se encuentra incrementado en el caso de la ataxina-3 mutada⁴⁷. El segundo, la SUMOización, es la unión covalente de un SUMO (del inglés *small ubiquitin-like modifier*) a la proteína, lo que se ha demostrado que reduce la formación de fibras de ataxina-3 *in vitro* y la acumulación de agregados de ataxina-3 en neuronas corticales^{45,48}. El tercero, por su parte, sería la fosforilación, que afectaría a distintas características de la proteína, entre ellas a su localización nuclear y su agregación^{45,47}.

• Alteraciones en la proteólisis

Otro de los mecanismos patogénicos que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad es la aparición de fragmentos de ataxina-3 tóxicos debido a una proteólisis incorrecta⁴⁹. Se han encontrado fragmentos resultantes de la proteólisis defectuosa de la ataxina-3 tanto en modelos animales de SCA-3 como en tejidos *post-mortem* de pacientes⁵⁰ que llevan a un aumento de la agregación y de la toxicidad⁵¹. La toxicidad de estos fragmentos puede deberse al aumento de la tendencia a formar agregados y a acumularse en el núcleo, a su capacidad de unirse a la ataxina-3 no mutada y a alteraciones en la función de la ataxina-3 y su inactivación⁵⁰.

• Alteraciones en la regulación de la expresión génica

Se ha detectado una disminución en la expresión de genes que codifican proteínas asociadas a la superficie de la membrana celular⁵². Las causas que subyacen a estas alteraciones aún no se conocen por completo, aunque se sabe que la ataxina-3 interacciona con varias proteínas relacionadas con la regulación de la expresión génica⁵³. Además, también se ha visto que expansiones anormales de la ataxina-3 causaban hipoacetilación en histonas específicas⁵⁴ y una disminución de la actividad de la histona acetiltransferasa⁵⁵. Todo esto sugiere que la desregulación transcripcional puede tener un papel importante en la patogénesis de la SCA-3⁵⁶.

• Alteraciones en la señalización por calcio

Por otra parte, hay evidencias de que en la SCA-3 se produce una alteración de la homeostasis del calcio, ya que en modelos animales se comprobó que la señalización por calcio estaba alterada⁵⁷. Algunos autores han sugerido que la disfunción en las células de Purkinje observada en esos mismos animales podía estar asociada con la fisiología alterada de los canales de potasio dependientes de voltaje⁵⁸, lo que contribuiría a la patogénesis de la enfermedad.

• Procesos de estrés oxidativo

Respecto a la actividad mitocondrial, en modelos celulares de SCA-3 se observó una disminución en la actividad enzimática mitocondrial, en los niveles de glutatión y en el número de copias de ADN mitocondrial⁵⁹, así como en la actividad del complejo mitocondrial II⁶⁰. También se ha visto que la forma mutada de ataxina-3 puede perturbar las dinámicas mitocondriales, ya que se produce una disminución en el potencial de membrana mitocondrial y aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno⁶¹. Todo esto llevaría a una reducción de la respuesta antioxidante y a un aumento del estrés oxidativo, lo que favorecería la patogénesis en la enfermedad.

• Autofagia

La autofagia es un proceso celular encargado de la degradación y reciclaje de componentes celulares. Es el principal responsable, además del sistema ubiquitina-proteasoma, de degradar las proteínas propensas a formar agregados, incluyendo las proteínas polyQ⁶². En muchas enfermedades neurodegenerativas los mecanismos de autofagia se encuentran comprometidos⁶³. En el caso de la SCA-3, se han encontrado acumulaciones anormales de distintas proteínas relacionadas con la autofagia, como LC3, p62 y Atg16L⁶⁴, que colocan, en algunos casos, con los agregados de ataxina-3⁶⁵. Además, recientemente se ha comprobado que la ataxina-3 no mutada interactúa con la beclina-1, una proteína de autofagia, a través del

fragmento polyQ. La expansión en esta región en la ataxina-3 mutada llevaba a una disminución en la interacción con beclina-1, contribuyendo a una alteración de los procesos de autofagia⁶⁶.

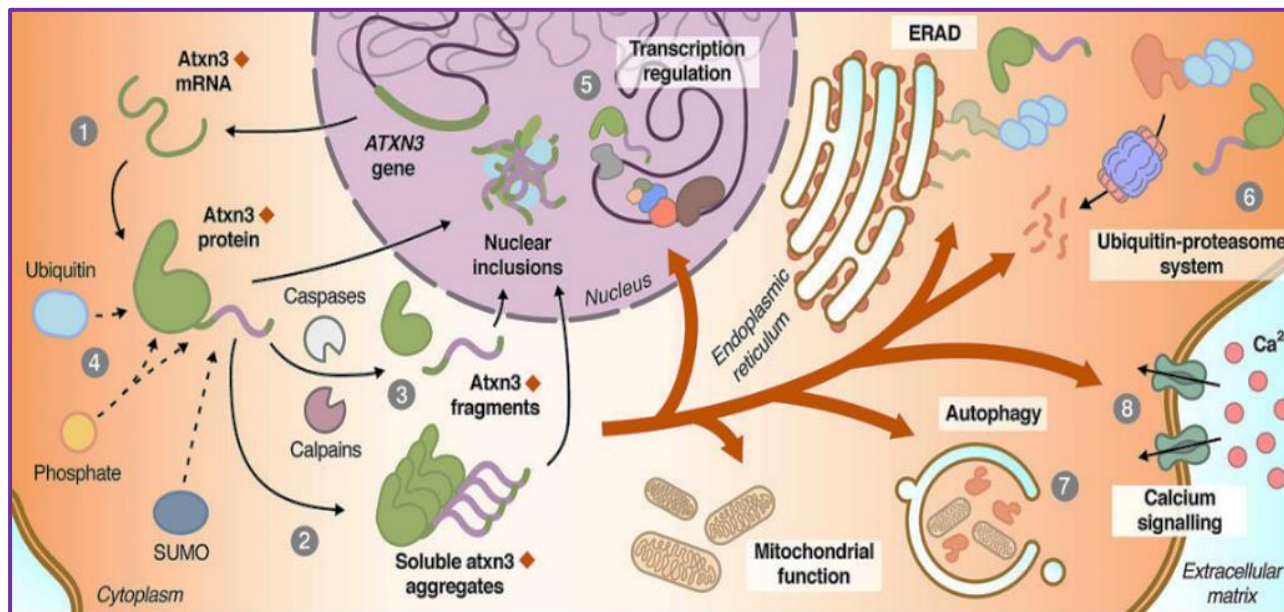


Figura 3. Principales mecanismos moleculares patogénicos en la SCA-3. **1)** Fragmentos mutantes de ARN de ataxina-3. **2)** Formación de agregados proteicos. **3)** Formación de inclusiones intranucleares. **4)** Alteraciones en los procesos post-traduccionales. **5)** Desregulación en los procesos de transcripción. **6)** Fallos en el sistema ubiquitina-proteasoma. **7)** Alteraciones en la autofagia. **8)** Alteraciones en la homeostasis del calcio. Adaptada de [49]

1.1.3 Características clínicas de la SCA-3

Los pacientes con SCA-3 generalmente no presentan síntomas evidentes durante la primera parte de su vida, y las primeras manifestaciones suelen aparecer en la mediana edad. La edad media de aparición de esta enfermedad se sitúa en los 40 años, con extremos entre los 4 y los 70 años. La etapa presintomática va seguida por un periodo de declive progresivo, que en los casos más severos puede terminar en muerte prematura. La supervivencia media asociada a esta enfermedad es de 21 años, en un rango que abarca desde los 7 a los 29 años²⁸.

El síntoma más característico de la SCA-3 es la aparición de ataxia progresiva, una disfunción en la coordinación motora que afecta a extremidades, equilibrio, habla y mirada. Además, es frecuente que aparezcan otros síntomas como síndrome piramidal con hiperreflexia, signo de Babinski y espasticidad; neuropatía con amiotrofia; alteraciones oculomotoras con nistagmo, retracción del párpado, oftalmoplegia externa progresiva (PEO, del inglés *progressive external ophthalmoplegia*), oftalmoparesia y ojos saltones; y fasciculaciones faciales y linguales. También pueden aparecer signos extrapiramidales, incluyendo distonía, rigidez y/o bradiquinesia^{21,49}. Sin embargo, la SCA-3 es muy heterogénea, no solo en cuanto a edad de manifestación sino también en cuanto a los síntomas neurológicos y la severidad de estos. Para

facilitar la clasificación clínica, la SCA-3 puede dividirse según una propuesta de Coutinho y Andrade⁶⁷, que catalogan los posibles fenotipos de la enfermedad en tres tipos principales.

Estos autores observaron que casi todos los pacientes presentaban signos de afectación cerebelar y PEO asociados con signos piramidales en distintos grados. De esta manera, los distintos subtipos clínicos vendrían determinados por la presencia o ausencia de signos extrapiramidales, así como por la presencia o ausencia de signos periféricos.

- La SCA-3 de **tipo 1** estaría caracterizada por una edad de inicio temprana (entre los 5 y los 30 años) y una progresión rápida de los síntomas, que se manifestarían en forma de ataxia cerebelar, PEO, y otros síntomas piramidales y extrapiramidales (como distonía).

- La SCA-3 de **tipo 2** correspondería con aquellos casos en los que la edad de inicio de los síntomas es intermedia (en torno a los 36 años), con manifestaciones de ataxia cerebelar y PEO, y pudiendo o no presentar síntomas piramidales y con síntomas extrapiramidales leves. Los pacientes con este tipo de SCA-3 podrían evolucionar con el paso de los años a alguno de los otros dos subtipos, dependiendo de si terminan manifestando fuertes síntomas extrapiramidales (tipo 1) o periféricos (tipo 3).

- La SCA-3 de **tipo 3**, por su parte, presentaría una edad de inicio tardía (en torno a los 50 años), y se caracterizaría por presentar ataxia cerebelar y PEO, además de alteraciones periféricas, con o sin ligeros síntomas piramidales o extrapiramidales.

Por otra parte, otros autores consideran un cuarto tipo⁶⁸ que englobaría SCA-3 poco frecuentes con síntomas parkinsonianos, déficits cerebelosos leves y neuropatía sensoriomotora distal o amiotrofia; y un quinto tipo⁶⁹ que cursaría con paraplejía espástica sin ataxia cerebelar (**Tabla 2**).

Subtipo	Síntomas característicos	Edad inicio
Tipo 1	Ataxia cerebelar, PEO, síntomas piramidales y extrapiramidales	Temprana (5-30 años)
Tipo 2	Ataxia cerebelar, PEO, posibles síntomas piramidales, síntomas extrapiramidales leves	Intermedia (35 años aprox)
Tipo 3	Ataxia cerebelar, PEO, alteraciones periféricas, posibles síntomas piramidales y/o extrapiramidales leves	Tardía (50 años aprox)
Tipo 4	Síntomas parkinsonianos, déficits cerebelosos leves, neuropatía sensoriomotora distal o amiotrofia	Variable
Tipo 5	Paraplejía espástica	Variable

Tabla 2. Clasificación de los subtipos de SCA-3.

Además de todos estos síntomas de índole motora, ya en los años 90 se comenzó a observar que los pacientes manifestaban otros síntomas^{70,71} que pueden interferir gravemente con su calidad de vida⁷².

Por un lado, en la SCA-3 se ha visto que existen alteraciones en la función olfatoria. Se ha comprobado que existe activación cerebelar durante la olfacción⁷³, y la hiposmia es una alteración habitual en las enfermedades neurodegenerativas⁷². Sin embargo, no hay resultados concluyentes ya que en diversos estudios llevados a cabo en pacientes con SCA-3 se han encontrado resultados contradictorios⁷³⁻⁷⁵.

Por otra parte, uno de los aspectos más incapacitantes en la SCA-3 es la presencia de fatiga⁷². En esta patología, la fatiga está relacionada con la aparición de somnolencia diurna, con la duración de la enfermedad, con la necesidad de silla de ruedas y con la aparición de trastornos del humor como ansiedad o depresión severa^{72,76,77}.

En la SCA-3 también es frecuente que aparezca un amplio rango de desórdenes del sueño a lo largo del progreso de la enfermedad, que abarca desde el síndrome de piernas inquietas (RLS, por sus siglas en inglés *restless leg syndrome*), trastorno del comportamiento del sueño REM (RBD, del inglés *REM sleep behavioral disorder*), apnea del sueño e insomnio^{72,78}. De estos síntomas los más frecuentes en esta enfermedad son el RBD y el RLS, de los cuales el primero se ha visto que correlaciona significativamente con estados de ansiedad y depresión⁷⁹. Además, este síntoma se cree que puede aparecer antes que lo hagan los síntomas motores⁸⁰.

Además, la idea tradicional de que el cerebelo, que es la principal estructura afectada en esta enfermedad, es una estructura puramente de control motor ha sido desechada, ya que durante las últimas décadas se ha comprobado que el cerebelo está implicado en procesos relacionados con la emoción y la cognición^{25,81-83} (**Cuadro 1**). Por ello, en los últimos años, en los pacientes con SCAs se ha prestado atención a la posible alteración de sus funciones cognitivas y/o emocionales. Hoy en día, es un hecho constatado que los pacientes con SCA-3 pueden presentar alteraciones en distintas funciones cognitivas (**Cuadro 2**), sin que exista correlación ni con el número de repeticiones ni con la duración de la enfermedad⁸⁴. En concreto, se ha visto que los pacientes pueden presentar déficits en la función de atención visual⁷¹ y en la atención auditiva verbal⁸⁵. Además, se han observado alteraciones en las funciones ejecutivas, ya que se ha descrito que los pacientes con SCA-3 pueden tener déficits en la función ejecutiva de cambio de tarea⁸⁵. Respecto a la memoria, se ha encontrado que en los pacientes con SCA-3 pueden aparecer alteraciones tanto en la memoria a corto plazo (más concretamente en la memoria

visual, en la memoria visuoespacial y en la memoria verbal) como en la memoria a largo plazo (en la memoria procedimental)^{84,86}.

Además de todo esto, y tal y como se ha ido comentando en relación a otros síntomas característicos de esta enfermedad, existen evidencias de alteraciones en el estado de ánimo en un alto porcentaje de pacientes con SCA-3, los cuales presentan sintomatología típica de estrés, depresión, trastorno de ansiedad, y apatía^{77,86,87}.

1.1.4 Posibilidades terapéuticas en la SCA-3

Como en muchas otras enfermedades neurodegenerativas, hasta la fecha no se ha desarrollado ningún tratamiento efectivo para la SCA-3. Las estrategias existentes están enfocadas únicamente en paliar los síntomas, y los tratamientos se ofrecen en función del subtipo de SCA-3 que presente el paciente, los síntomas que manifieste y las comorbilidades asociadas. La respuesta a los tratamientos suele ser muy variable, pudiendo llegar en último término a recurrir a la neurocirugía para paliar la distonía y los temblores o a la gastrostomía cuando la disfagia es tan severa que no permite una nutrición adecuada²¹.

Hasta la fecha se han llevado a cabo distintos ensayos clínicos para la SCA-3, pero ninguno ha conducido a un tratamiento que produzca un impacto positivo significativo en el estado de los pacientes. Es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad con el objetivo de buscar nuevas dianas terapéuticas que puedan permitir el desarrollo de fármacos más efectivos para el tratamiento de la SCA-3. Por ello, los cannabinoides ofrecen una opción terapéutica interesante, ya que se ha demostrado que tienen importantes efectos neuroprotectores al actuar sobre diferentes procesos que llevan a la degeneración neuronal^{88,89}.

Cuadro 1. Cerebelo y funciones cognitivas y emocionales

Tradicionalmente al cerebelo se le ha asignado funciones relacionadas con el control motor, sin embargo, esta perspectiva comenzó a cambiar hace años³⁰⁹. Los pacientes que presentan daño cerebelar suelen presentar, además de la sintomatología motora típica de ataxia, disartria y disfagia, otras alteraciones como déficits en las funciones ejecutivas, en el procesamiento visuoespacial, y en el procesamiento lingüístico, además de desregulación afectiva y cambios en la personalidad. Todos estos son síntomas cognitivos y emocionales están relacionados con una enfermedad que se denomina Síndrome Cognitivo Afectivo Cerebelar (CCAS, del inglés *cerebellar cognitive affective syndrome*)³¹⁰.

Se postula que existe un nivel de organización en el cerebelo que hace que el control sensoriomotor esté topográficamente separado de la regulación cognitiva y emocional (**Figura 4**). Lesiones en las áreas descritas como sensoriomotoras dan lugar a afectaciones cerebelares de carácter motor, mientras que si la lesión ocurre en el cerebelo cognitivo o en el cerebelo límbico se producen alteraciones típicas del CCAS^{309,311,312}.

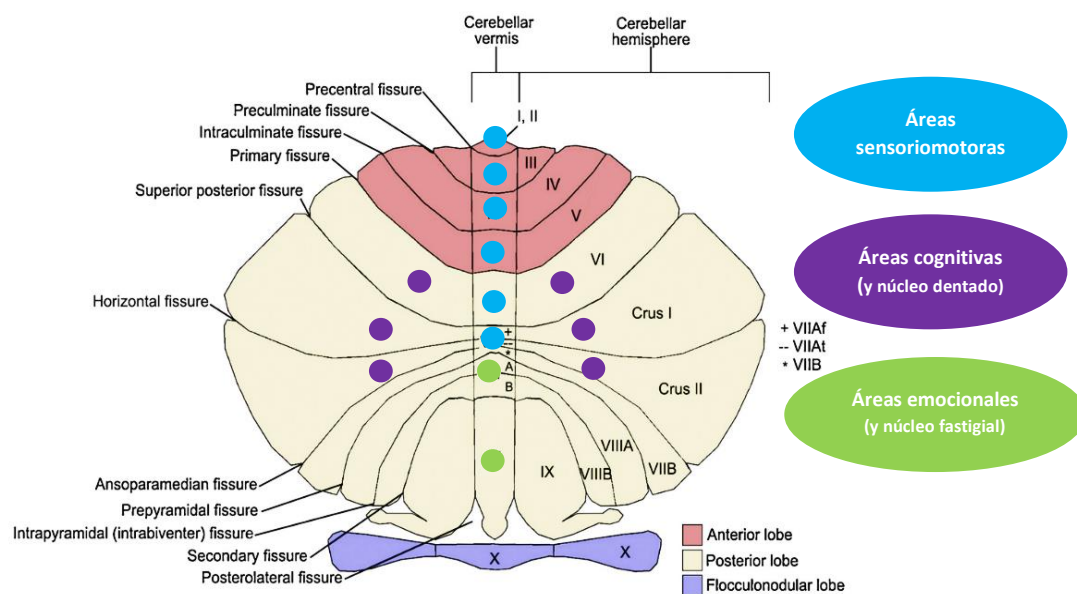


Figura 4. Representación del cerebelo y de las funciones que se postula que están asociadas a cada región. Adaptada de [309].

Cuadro 2: Funciones cognitivas alteradas en la SCA-3

Atención: proceso cognitivo que permite a una persona priorizar sus recursos para procesar los estímulos relevantes del entorno, ignorando los irrelevantes. Existen distintos tipos de atención, como la atención visual, que es aquella que permite discriminar estímulos en un entorno visual complejo, o la atención auditiva, que es la que permite centrar la atención en estímulos auditivos concretos^{313,314}.

Funciones ejecutivas: conjunto de habilidades y procesos cognitivos que permiten la adaptación al medio y la resolución de problemas a partir de la integración de las distintas informaciones disponibles. Por regla general, son las responsables del control y la autorregulación de la actividad mental y los recursos cognitivos, participando en aspectos tales como la motivación, el procesamiento de la información, y el control de la conducta^{315,316}.

Memoria: función cognitiva compleja que puede definirse como la capacidad del cerebro de codificar, almacenar y recuperar información. Existen distintos tipos de memoria en función del grado de procesamiento de la información: memoria sensorial, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo^{317,318}.

Memoria sensorial: es la que llega a través de los sentidos, por lo que la información procesada puede ser visual (icónica), auditiva (ecoica), olfativa, etc. En este tipo de memoria se mantiene la información un periodo de tiempo muy breve (200-300ms) antes de desaparecer o de transmitir la información al siguiente tipo de memoria, la memoria a corto plazo.

Memoria a corto plazo: también conocida como memoria operativa o memoria de trabajo. Mantiene la información accesible de manera temporal, pudiendo manipularla e intervenir en otros procesos cognitivos superiores como el razonamiento y la resolución de problemas. Este tipo de memoria se divide en cuatro subcomponentes: el bucle fonológico, que opera con información verbal (ej: lectura), la agenda visuoespacial, que trabaja con imágenes y el espacio (ej: aprendizaje de un itinerario), el almacén episódico, que integra información de distintas fuentes (verbal, visual y espacial) para crear una interpretación de la situación presente, y el sistema ejecutivo, que es el responsable de la regulación de la memoria operativa.

Memoria a largo plazo: permite el almacenamiento de la información de manera duradera, y puede clasificarse en memoria implícita o procedimental, en la que se almacena de forma inconsciente la información sobre procedimientos automáticos, como montar en bicicleta, y en memoria explícita o declarativa, que almacena la información consciente, tanto a nivel de conocimientos (memoria semántica) como a nivel autobiográfico (memoria episódica).

2 Sistema endocannabinoide

La planta *Cannabis sativa*, también conocida como cannabis o cáñamo, es una planta que ha tenido diversas aplicaciones desde hace milenios. Estas aplicaciones han ido desde el uso recreativo como droga por su capacidad de alterar la percepción sensorial hasta aplicaciones medicinales por sus propiedades terapéuticas. A lo largo de distintas civilizaciones se han encontrado registros de su uso con una amplia variedad de fines medicinales, como control del dolor, estimulación del apetito, náuseas, fiebre, infecciones y desórdenes ginecológicos⁹⁰. Por ejemplo, existe evidencia de que ya en la antigua China, hace unos 5000 años, extractos de esta planta se utilizaban para aliviar calambres y dolores. Sin embargo, no fue hasta 1964 cuando se identificó el principal compuesto psicoactivo de la planta, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)⁹¹, lo que, junto a la posterior caracterización de otras moléculas no psicotrópicas del cannabis, como el cannabidiol (CBD)⁹², permitió un gran avance en la comprensión de los mecanismos de acción de los compuestos de la planta⁹³.

Hasta la década de 1980 el término “cannabinoides” incluía típicamente aquellos compuestos terpenoides presentes en la planta *Cannabis sativa*, así como sus ácidos carboxílicos, análogos y productos de transformación⁹⁴. De los más de 500 compuestos que presenta esta planta, alrededor de 85 se encuentran englobados en esta categoría. Estos compuestos cumplen un amplio espectro de funciones en la planta, desde pigmentación hasta dar olor y sabor a las mismas, y varían en número y cantidad no sólo en función del clima, tipo de suelo y variedad cultivada, sino también según la parte de la planta de la que se extraigan. Los niveles más altos de estos cannabinoides se encuentran en la resina que se produce en los tricomas de las inflorescencias de la planta femenina⁹³.

Los compuestos cannabinoides ejercen sus acciones en los diferentes organismos cuando se unen a una serie de receptores presentes en la membrana de diversos tipos celulares denominados receptores cannabinoides. Sin embargo, estos compuestos provenientes de la planta no son los únicos capaces de interactuar con estos receptores, por lo que a pesar de que tradicionalmente el término “cannabinoides” ha hecho referencia a dicho grupo de sustancias presente en los preparados de la planta, hoy en día engloba también a todas aquellas moléculas químicas, independientemente de su origen o estructura, que interactúan con los receptores cannabinoides. De esta manera, podemos encontrar tres tipos distintos de cannabinoides en función de su origen: los fitocannabinoides, que son aquellos cannabinoides de origen vegetal; los endocannabinoides, que son las moléculas endógenas producidas por los

organismos animales; y los cannabinoides sintéticos, que son aquellos compuestos originados en el laboratorio mediante síntesis química.

El estudio de los primeros cannabinoides descritos, como el Δ^9 -THC, permitió encontrar sus dianas celulares gracias a la creación de análogos estructurales como fue el ligando sintético CP-55,940, que en 1988 permitió comprobar la capacidad de unión de los cannabinoides a receptores celulares específicos en membranas de cerebro de rata⁹⁵. Dos años más tarde, en 1990, se consiguió clonar el primer receptor para cannabinoides, al que se le dio el nombre de receptor CB₁⁹⁶, y en 1993 se clonó un segundo receptor para cannabinoides, el receptor CB₂⁹⁷. El descubrimiento de estos receptores para cannabinoides permitió que poco después de la descripción del receptor CB₁ se identificaran sus ligandos endógenos, los endocannabinoides N-araquidonoiletanolamina o anandamida (AEA)⁹⁸ y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG)^{99,100}.

Por todo esto, al conjunto de los endocannabinoides, sus receptores, y su maquinaria de síntesis y degradación se le denomina sistema endocannabinoide (SEC, **Figura 5**), un sistema que modula múltiples respuestas fisiológicas tanto a nivel central como periférico y que contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular. La relevancia del estudio de este SEC ha ido en aumento, ya que se ha observado que se encuentra alterado en múltiples condiciones patológicas. Esto hace que su manipulación farmacológica se plantee como una prometedora herramienta terapéutica en el tratamiento de diversas patologías¹⁰¹.

2.1 Receptores para cannabinoides

Los receptores para cannabinoides poseen un rango muy amplio de acciones biológicas, y se expresan en diversos órganos y tejidos, entre los que se encuentra el sistema nervioso. Como ya se ha mencionado anteriormente, a día de hoy hay dos receptores definidos por toda la comunidad científica como receptores clásicos para cannabinoides, los receptores CB₁ y CB₂, pero no son los únicos con los que interaccionan los cannabinoides. Estudios realizados en ratones KO para CB₁^{102,103} y CB₂¹⁰⁴ mostraron que los cannabinoides pueden ejercer ciertos efectos fisiológicos no mediados por ninguno de estos dos receptores. Se ha visto que algunos cannabinoides interaccionan con receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés *transient receptor potential*), como el receptor para vanilloides de tipo 1 (TRPV1), o con los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR, del inglés *peroxisome proliferator activated receptor*), como los receptores PPAR α y PPAR γ ⁹³. Además, se ha comprobado que los cannabinoides pueden unirse a otros receptores acoplados a proteínas G (GPCR, del inglés *G protein coupled receptor*) además de los receptores CB₁ y CB₂, como el receptor GPR55.

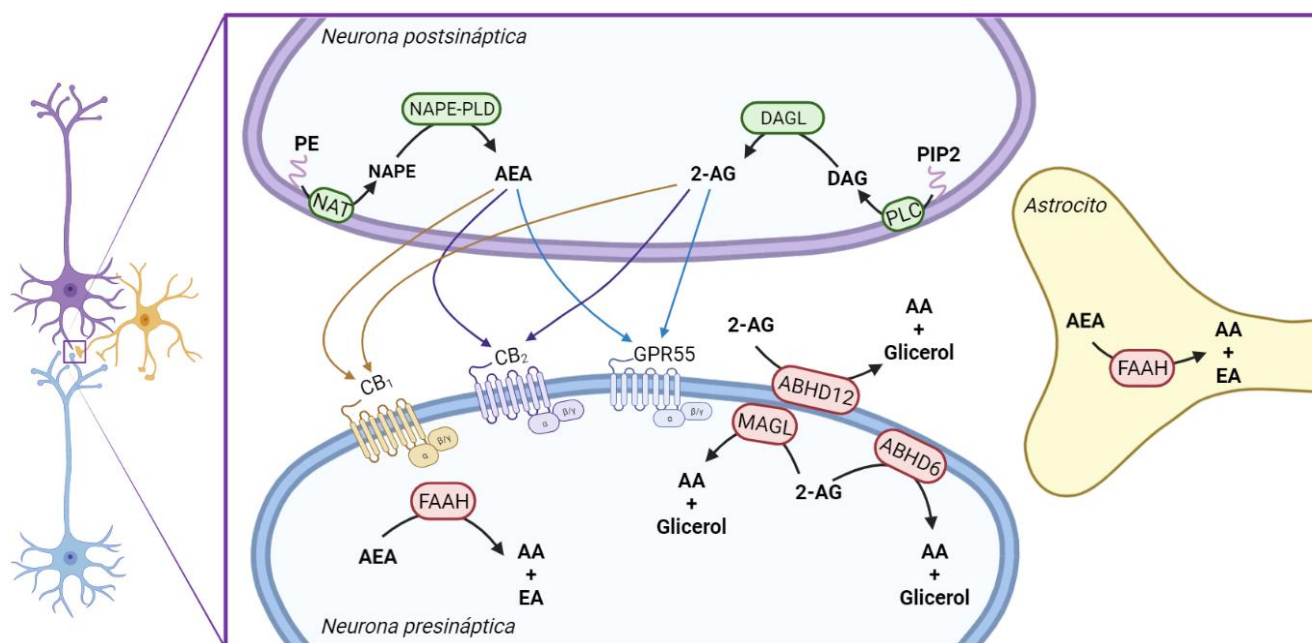


Figura 5. Esquema general de algunos elementos del SEC y de las principales vías de síntesis y degradación. En verde, enzimas de síntesis; en rojo, enzimas de degradación. **PE:** Fosfatidiletanolamina. **NAT:** N-aciltransferasa. **NAPE:** N-araquidonoilfosfatidiletanolamina. **NAPE-PLD:** N-araquidonoilfosfatidiletanolamina fosfolipasa D. **AEA:** Anandamida. **2-AG:** 2-araquidonoilglicerol. **DAGL:** Dicailglicerol lipasa. **DAG:** Diacilglicerol. **PLC:** Fosfolipasa C. **PIP2:** Fosfatidilinositol-bisfosfato. **AA:** Ácido araquidónico. **EA:** etanolamina. **FAAH:** Amilohidrolasa de ácidos grasos. **MAGL:** Monoacilglicerol lipasa. **ABHD12:** Hidrolasa que contiene un dominio α/β 12. **ABHD6:** Hidrolasa que contiene un dominio α/β 6. Adaptado de [101,166,319].

2.1.1 Receptores cannabinoides clásicos: CB₁ y CB₂

Los receptores CB₁ y CB₂ fueron identificados mediante técnicas moleculares de clonación^{96,97}, y ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), con una estructura de siete fragmentos transmembrana con un extremo amino terminal extracelular y otro extremo carboxilo terminal citosólico. Sin embargo, ambos presentan una baja homología en lo que a su secuencia se refiere, ya que solo comparten un 44% a nivel de proteína y un 68% en los dominios transmembrana, que son los que contienen los sitios de unión para los cannabinoides^{105,106}.

El receptor CB₁, por su parte, está codificado por el gen *CNR1*, que se encuentra en los loci 6q14-6q15, y está formado por 472 aminoácidos en humanos (473 en ratones y en ratas, presentando un 97-99% de homología con estas especies)^{106,107}. Se localiza fundamentalmente en el sistema nervioso central (SNC) y es el GPCR más abundante del encéfalo. La densidad de este receptor es muy elevada en estructuras como hipocampo, ganglios basales, corteza y cerebelo, y de forma más moderada se ha encontrado también en núcleo accumbens, área tegmental ventral y amígdala^{108,109}. Además de su localización en el encéfalo, este receptor se encuentra también en el sistema nervioso periférico (SNP), además de en tejidos

cardiovasculares, inmunes, gastrointestinales y reproductores¹¹⁰. La distribución de este receptor en el SNC se correlaciona con su implicación en la función motora, analgesia, y funciones cognitivas como aprendizaje y memoria, entre otras^{106,110}.

En el SNC, CB₁ se expresa principalmente en las neuronas, y, aunque en menor cantidad, también se ha identificado en células de glía como astrocitos, oligodendrocitos y microglía¹⁰⁶. A nivel subcelular, este receptor se encuentra principalmente en los terminales presinápticos de las neuronas, tanto a nivel central como periférico, donde media la inhibición de la liberación de neurotransmisores^{106,111}, aunque también se ha observado su expresión a nivel postsináptico, donde podrían participar en la modulación de la excitabilidad dendrítica¹¹². También se ha identificado la presencia de este receptor en la membrana mitocondrial externa (mtCB₁), lo que sugiere su papel regulador en la respiración celular y en la homeostasis del calcio, regulando de esta manera procesos bioenergéticos^{113,114}.

Por otra parte, el receptor CB₂ está codificado por el gen *CNR2*, que se localiza en los loci 1p35-1p36, y presenta 360 aminoácidos en humanos. Este receptor presenta una mayor variabilidad entre especies que el receptor CB₁, ya que por ejemplo, ratones y humanos solo comparten un 80% de la secuencia de aminoácidos^{106,115}. El receptor CB₂ se expresa mayoritariamente en las células del sistema inmune como linfocitos y monocitos¹¹⁶, aunque también se expresa en órganos y tejidos periféricos como bazo, corazón, hígado y tejido óseo, entre otros. A nivel del SNC la presencia de receptores CB₂ es mucho más baja, y se localiza principalmente en microglía y astrocitos, donde tienen un papel esencial en los procesos de activación de estas células ante condiciones de neuroinflamación¹¹⁰. En estos casos se suele producir una regulación a la alza de la expresión de este receptor en las células de glía que, al activarse, promueve una disminución en la liberación de citoquinas proinflamatorias, así como la estabilización de la barrera hematoencefálica para impedir la entrada de células inmunes periféricas¹¹⁷. De forma más reciente, también se ha visto expresión de este receptor en determinadas poblaciones neuronales, tanto a nivel central como periférico¹¹⁸⁻¹²⁰.

Los procesos mediados por el receptor CB₂ y su correlación con el sistema inmune favorece el mantenimiento de la homeostasis cerebral en condiciones patológicas. Esto, unido a que la activación de este receptor no se asocia con los efectos psicoactivos de los cannabinoides, hacen que este receptor se presente como una posible diana farmacológica muy prometedora en diversas patologías^{121,122}.

2.1.2 GPR55

El receptor acoplado a proteínas G 55 (GPR55), es una proteína formada por 319 aminoácidos y codificada por el gen *GPR55*, que se localiza en el locus 2q37. Presenta una baja homología con los receptores CB₁ y CB₂ (aproximadamente un 13 y un 14%, respectivamente)¹²³. Se clonó en 1999¹²⁴, y fue identificado por primera vez como un posible receptor cannabinoide en un screening de patentes in silico llevado a cabo por GlaxoSmithKline y AstraZeneca¹²⁵ en el que se observó que interaccionaba con algunos agonistas y antagonistas cannabinoides. GPR55 puede acoplarse a las proteínas G_{α13}, G_{αq/11}, G_{α12} o G_{α12/13}, dependiendo del tejido o de la línea celular.

El fosfolípido LPI (del inglés *lysophosphatidylinositol*) está considerado el ligando endógeno de GPR55¹²⁶. Además, numerosos ligandos endógenos de los receptores CB₁ y CB₂ han demostrado actuar como moduladores de GPR55, como la AEA o el 2-AG¹²⁷. Sin embargo, se han encontrado discrepancias farmacológicas significativas dependiendo del enfoque de las pruebas realizadas. Por ejemplo, el Δ⁹-THC activaba GPR55 de acuerdo con ciertos autores^{127,128}, mientras que según otros ensayos funcionales no mostraba actividad^{126,129}.

GPR55 se expresa tanto en tejidos periféricos como en áreas del SNC, lo que pone de manifiesto su implicación en diversas funciones biológicas. A nivel periférico, GPR55 se expresa en tejidos vasculares, musculares, óseos, intestinales e inmunes, entre otros, y está implicado en funciones como la vasodilatación dependiente de endotelio¹³⁰, la proliferación y migración celular¹³¹, las dinámicas óseas¹³², el balance energético¹³³, procesos gastrointestinales¹³⁴, la inflamación y el dolor¹³⁵. Respecto a su expresión en el SNC, se ha encontrado en tálamo, corteza frontal, sistema límbico, hipotálamo, cerebelo y estriado¹³⁶. Tanto neuronas¹²⁷ como células de glía¹³⁷ expresan GPR55 funcional. En cuanto a su expresión a nivel subcelular, en las neuronas no está claro si GPR55 se expresa a nivel presináptico, postsináptico, o ambos¹²⁷.

GPR55 podría tener un papel clave en la regulación del desarrollo en ciertas partes del SNC, ya que influye en la morfología y en el crecimiento axonal de las neuronas de la retina¹³⁸ y de la médula espinal¹³⁹. Además, existe una patología asociada a la delección del locus 2q37, en el que se encuentra, entre otros, el gen que codifica para el receptor GPR55. Entre los síntomas característicos de este síndrome, aparecen alteraciones en el desarrollo, como pueden ser dismorfismo facial, braquidactilia, y trastorno del desarrollo intelectual, entre otros¹⁴⁰.

A nivel central se ha propuesto que GPR55 podría potenciar la liberación vesicular de glutamato¹⁴¹, lo que estaría relacionado con su capacidad para incrementar la concentración de calcio intracelular y de inhibir las corrientes de potasio¹²⁸. Por tanto, esto sugiere que la

activación de GPR55 localizado presinápticamente tendría un efecto opuesto a la activación del receptor CB₁, que es predominantemente inhibitoria. De hecho, se ha visto que algunos antagonistas o agonistas inversos del receptor CB₁ (por ejemplo, AM251) tienen actividad como agonistas de GPR55^{127,142}.

En un modelo *knockout* (KO) de ratón para GPR55¹⁴³ se vio que la pérdida de la expresión de este receptor producía déficits en la coordinación motora y en la marcha, observándose así un fenotipo característico de ataxia. Además, también se vio que estos ratones presentaban alteraciones en la nocicepción térmica¹⁴⁴.

Por otra parte, la expresión de GPR55 en el estriado dorsolateral parece tener un papel relevante en la memoria procedimental y en el aprendizaje motor¹⁴⁵. GPR55 también se encuentra ampliamente expresado en hipocampo y cerebelo, que son estructuras implicadas en otros procesos cognitivos, aunque hasta la fecha no hay estudios que investiguen la función de este receptor en dichas estructuras en relación a funciones cognitivas concretas¹³⁶.

En relación a los procesos emocionales y cognitivos, existen estudios que sugieren que GPR55 puede tener una función importante. Este receptor se expresa en áreas cerebrales relacionadas con la ansiedad, como en el sistema límbico, especialmente en hipocampo. En un estudio se vio que la activación de GPR55 producía un efecto ansiolítico, y que al administrar antagonistas de GPR55 se evitaba ese efecto ansiolítico y se inducía ansiedad¹⁴⁵. Además, también se ha visto que la expresión de GPR55 se vio incrementada ante situaciones de estrés en hembras en el hipocampo, y en machos en la corteza prefrontal¹⁴⁶.

2.2 Endocannabinoides

Los ligandos endógenos de los receptores cannabinoides son mediadores lipídicos derivados de fosfolípidos de membrana que son capaces de unirse y activar receptores cannabinoides. Dentro de estos ligandos endógenos, los más representativos son dos derivados del ácido araquidónico, la N-araquidonoiletanolamina o anandamida (AEA)⁹⁸ y el 2-

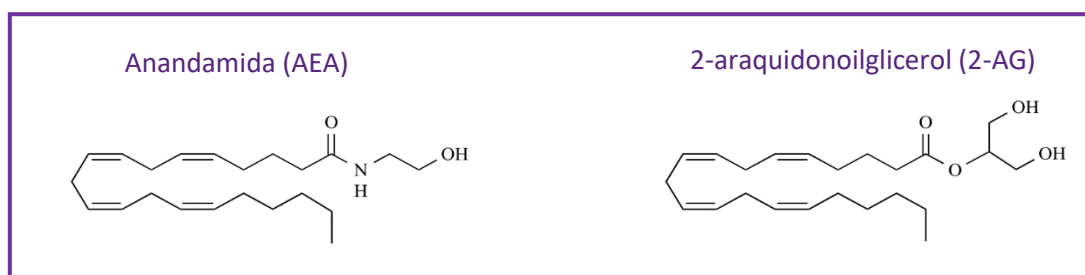


Figura 6. Estructura química de los ligandos endocannabinoides más abundantes.

araquidonoilglicerol (2-AG)^{99,100}, que pertenecen a las familias de N-aciletanolaminas (NAEs) y 2-monoacilgliceroles (MAG), respectivamente (**Figura 6**).

La AEA fue el primer endocannabinoides identificado, en 1992⁹⁸, y es un derivado del ácido araquidónico y la etanolamina. Aunque en general se encuentra en proporciones bajas en el encéfalo, existe una correlación entre las áreas del SNC en las que se han encontrado niveles altos de este endocannabinoides y las áreas en las que hay una mayor expresión del receptor CB₁¹⁴⁷. Las cantidades relativamente bajas de AEA pueden ser explicadas por la biodisponibilidad de su precursor, además de por la dificultad de medir de manera exacta su concentración local¹⁴⁸. Activa a los receptores CB₁ y CB₂, actuando como un agonista puro o parcial en función del tejido y de la respuesta biológica, aunque presenta una afinidad mucho más elevada por el receptor CB₁. La AEA también presenta afinidad por otros receptores, como GPR55, TRPV1 o PPAR_γ¹⁰⁷.

Poco después de la identificación de la AEA, dos laboratorios encontraron de manera independiente y simultánea que el 2-AG también era capaz de activar los receptores cannabinoides^{99,100}. El 2-AG actúa como agonista total de los receptores cannabinoides clásicos con una afinidad similar a la de la AEA, presentando también cierta afinidad por los receptores GPR55 y TRPV1¹⁴⁹. Su concentración en el cerebro es aproximadamente tres órdenes de magnitud superior a la de la AEA, siendo el endocannabinoides más abundante del encéfalo. Por otra parte, 2-AG además de actuar como endocannabinoides también es un importante intermediario en el metabolismo lipídico, por lo que sus concentraciones fisiológicas podrían no reflejar únicamente la cantidad necesaria para activar los receptores cannabinoides¹⁴⁸.

A lo largo de las últimas décadas se han encontrado otros compuestos lipídicos que interaccionan con los receptores cannabinoides con distintas potencias y eficacias, como por ejemplo la N-araquidonildopamina (NADA)¹⁵⁰, el 2-araquidonilgliceril éter (noladin éter o noladina)¹⁵¹, o la O-araquidonoiletanolamina (virodamina)¹⁵², entre otras¹⁴⁸. Esto sugiere que la familia de los endocannabinoides es mucho más grande de lo que en principio se planteaba, y que pueden existir mecanismos de biosíntesis, acción e inactivación que aún no estén completamente dilucidados¹⁵³.

Los endocannabinoides son moduladores de la transmisión sináptica y presentan ciertas diferencias con los neurotransmisores clásicos. Los endocannabinoides no se almacenan en vesículas, sino que son producidos bajo demanda por enzimas localizadas en la membrana celular (**Figura 7**). Por ello, ejercen su acción principalmente en las células contiguas¹⁵⁴. La señalización cannabinoide ocurre de manera retrógrada, en la que la activación de la neurona

postsináptica desencadena la biosíntesis de los endocannabinoides a partir de fosfolípidos de la membrana celular. Los endocannabinoides difunden al espacio sináptico y se unen a los receptores cannabinoides, principalmente CB₁, localizados en la membrana del terminal presináptico. La activación de los receptores cannabinoides inicia una cascada de señalización que inhibe los canales de calcio y activa los de potasio, lo que en última instancia inhibe la liberación de los neurotransmisores¹⁰⁶. El resultado final de la señalización cannabinoide dependerá de la naturaleza de las células participantes. Si el receptor CB₁ se encuentra en neuronas glutamatérgicas, la señalización cannabinoide será inhibitoria, mientras que si se localiza en neuronas GABAérgicas el resultado tenderá a ser excitatorio.

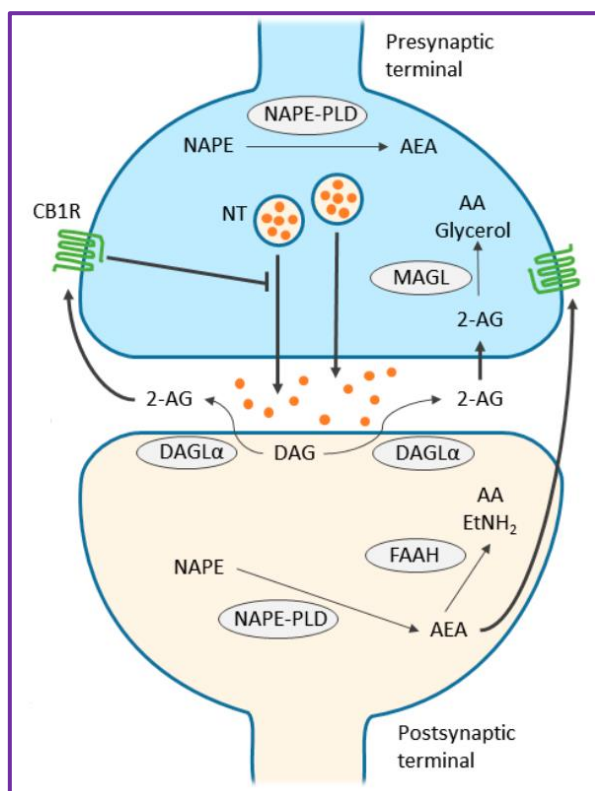


Figura 7. Representación simplificada de la señalización retrógrada mediada por los endocannabinoides.

Tras la activación neuronal, los endocannabinoides se producen en las terminales postsinápticas, liberándose a la hendidura sináptica. A continuación, se unen a los receptores cannabinoides localizados en la neurona presináptica, inhibiendo así la liberación del neurotransmisor. Adaptada de [107].

La señalización retrógrada está ampliamente distribuida en el SNC, aunque parece estar más concentrada en tipos neuronales específicos (glutamato, GABA o acetilcolina) y en regiones como hipocampo, cerebelo, amígdala, estriado o médula espinal¹⁵⁵.

2.3 Metabolismo de los endocannabinoides

Como muchas otras moléculas bioactivas, la actividad de los endocannabinoides está controlada por sus niveles endógenos, y por lo tanto por un equilibrio entre los mecanismos de síntesis y degradación¹⁴⁸ (Figura 5). El nivel constitutivo de endocannabinoides se denomina

tono endocannabinoide, y esos niveles dependen del tejido en el que se encuentren. El tono endocannabinoide es el resultado de la tasa de producción menos la tasa de degradación¹¹⁰.

2.3.1 Síntesis

Respecto a la AEA y otras N-acetiletanolaminas (NAEs), un gran número de enzimas están implicadas en su síntesis, lo que sugiere que el tono endógeno de este endocannabinoide está sujeto a un complejo abanico de reacciones. La biosíntesis de AEA, al igual que otras NAEs, se produce por la hidrólisis de la fosfatidiletanolamina (PE, del inglés *phosphatidylethanolamine*) de la membrana celular mediante dos reacciones enzimáticas. En primer lugar, a partir de la PE y de un glicerofosfolípido se forma N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE, por sus siglas del inglés *N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine*) gracias a la acción de la enzima una N-aciltransferasa (NAT) dependiente de Ca^{2+} . En segundo lugar, la NAPE es hidrolizada por una fosfolipasa D (PLD, del inglés *phospholipase D*) específica para este precursor (NAPE-PLD), también dependiente de Ca^{2+} . Esta enzima tiene una baja afinidad con otros fosfolípidos de membrana. La acción de la NAPE-PLD produce ácido fosfatídico y AEA. Una vez sintetizada la AEA, se difunde al espacio extracelular donde puede ejercer su acción de manera autocrina o paracrina^{148,156,157}.

Respecto al 2-AG, sus vías de biosíntesis más conocidas requieren la acción combinada de dos enzimas de membrana: la fosfolipasa C (PLC, del inglés *phospholipase C*), y la diacilglicerol lipasa (DAGL). La PLC hidroliza el fosfatidilinositol-bi-fosfato (PIP2, del inglés *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), presente en la membrana celular, y se genera así diacilglicerol (DAG) y ácido araquidónico. A continuación, la DAGL actúa sobre el DAG, generándose así el 2-AG. Cabe destacar que la PLC reconoce diferentes fosfolípidos cuya distribución varía entre tejidos, por lo que la formación de DAG, y por lo tanto de 2-AG, es dependiente de tejido^{148,156,158}.

2.3.2 Eliminación

Una vez que los endocannabinoides difunden al medio extracelular, su acción se ve regulada, por un lado, mediante recaptación en la neurona postsináptica, y por otro, mediante hidrólisis por la acción de dos enzimas principalmente, la amido-hidrolasa de ácidos grasos (FAAH)¹⁵⁹ y la lipasa de monoacilglicéridos (MAGL)¹⁶⁰.

Dada la naturaleza lipídica de los endocannabinoides, estos pueden atravesar las membranas por difusión¹⁵³. Sin embargo, también existe un mecanismo más específico de recaptación mediado por transportadores de membrana de anandamida (AMT, por sus siglas en

inglés *anandamide membrane transporter*)^{153,161}. Una vez en el interior celular, la AEA es degradada mediante la acción de una enzima conocida como FAAH (de sus siglas en inglés *fatty acide amide hydrolase*)¹⁵⁹. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la AEA, dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina. La FAAH es una proteína integral de membrana, presente en el retículo endoplásmico¹⁶² y en las mitocondrias¹⁶³, y se localiza principalmente de manera postsináptica en neuronas de gran tamaño, como pueden ser las neuronas de Purkinje en el cerebelo o las neuronas piramidales en la corteza cerebral e hipocampo, y en células de glía, especialmente en astrocitos¹⁶⁴.

El 2-AG, por su parte, también es sustrato de la FAAH, aunque en menor medida que la AEA, ya que su principal enzima de degradación es la monoacilglicerol lipasa (MAGL)¹⁶⁰. Esta enzima degrada monoacilgliceroles produciendo los ácidos grasos correspondientes y glicerol. La MAGL se expresa de manera ubicua por todo el organismo, incluyendo el sistema nervioso, en donde se localiza en los terminales presinápticos de las neuronas^{160,165}. Esta enzima es una enzima soluble, que se encuentra en la periferia intracelular de la membrana citoplásmica¹⁶⁶. Sin embargo, se ha visto que la inhibición o la inmunosupresión de la MAGL no hace que se elimine la actividad hidrolasa sobre el 2-AG. De hecho, se ha comprobado que la MAGL es responsable de la hidrólisis de aproximadamente el 85% del 2-AG, por lo que se cree que puede haber otras enzimas implicadas en la degradación de este endocannabinoide¹⁶⁶.

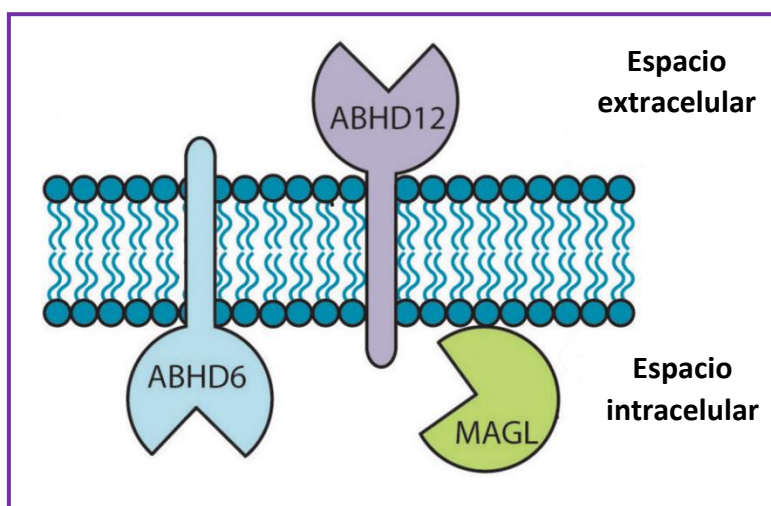


Figura 8. Distribución celular de las enzimas de degradación del endocannabinoide 2-AG. Adaptada de [166].

En las últimas décadas se han identificado, usando una aproximación proteómica, dos enzimas que podrían actuar como hidrolasas potenciales del 2-AG, las enzimas ABHD6 y ABHD12¹⁶⁶. Estas enzimas pertenecen a la familia de las ABHD (del inglés, *α - β -hydrolase domain-containing*), un grupo de enzimas que intervienen en la síntesis y degradación de lípidos¹⁶⁷. La

enzima ABHD6 (por sus siglas en inglés *α - β -hydrolase domain-containing 6*) se expresa en neuronas postsinápticas. Es una proteína de membrana, cuyo sitio activo está orientado hacia el citoplasma celular. Se ha propuesto que esta enzima regula las concentraciones de 2-AG en su lugar de síntesis, lo que complementa el papel regulador de la MAGL sobre las concentraciones de 2-AG en la neurona postsináptica. La enzima ABHD6 es responsable de la hidrólisis del 4% del 2-AG, aproximadamente¹⁶⁶.

La enzima ABHD12 (por sus siglas en inglés *α - β -hydrolase domain-containing 12*), por su parte, es una glicoproteína 398 aminoácidos cuyo peso molecular es de 45 kDa. Está codificada por el gen *abhd12*, que se localiza en el cromosoma 20p11.21¹⁶⁸. La enzima ABHD12 es una proteína integral de membrana, cuyo sitio activo se encuentra dispuesto hacia el espacio extracelular, lo que podría complementar la actividad de la enzima ABHD6¹⁶⁷ (**Figura 8**). Es responsable del aproximadamente 9% de la hidrólisis del 2-AG¹⁶⁶, siendo la segunda enzima que más cantidad de 2-AG degrada, después de la MAGL y por delante de la ABHD6. Se ha encontrado expresión de esta enzima en macrófagos, osteoclastos, neuronas y microglía, siendo la microglía el subtipo celular que más ABHD12 expresa¹⁶⁹. En el SNC se ha descrito la expresión de esta proteína en corteza, amígdala, hipocampo, bulbo olfatorio, hipotálamo, cerebelo, y tronco¹⁷⁰.

Se sabe que esta enzima no está implicada únicamente en el metabolismo de los endocannabinoides, ya que también interviene en el metabolismo de los lisofosfolípidos, en especial de la lisofosfatidilserina. Los lisofosfolípidos son pequeñas moléculas bioactivas que actúan principalmente a través de la activación de GPCRs y que regulan distintas funciones celulares como la homeostasis del Ca^{2+} , la arquitectura del citoesqueleto y el crecimiento y supervivencia celular, entre otros^{167,171}.

Se ha encontrado que mutaciones que inactivan la enzima ABHD12 son las responsables de la aparición de una enfermedad neurodegenerativa conocida como PHARC, cuyas siglas en inglés hacen referencia a la sintomatología característica de esta patología: polineuropatía, pérdida auditiva (*hearing loss*), ataxia, retinitis pigmentosa y cataratas^{170,172,173}. Esta patología cursa de manera lenta y progresiva, y se postula que la ABHD12 mutada puede ocasionar su aparición debido a su incapacidad de hidrolizar el 2-AG, lo que podría estar relacionado con alteraciones en la plasticidad sináptica y en la neuroinflamación. Estudios realizados en ratones *knockout* para ABHD12¹⁷¹ comprobaron que la falta de expresión de esta enzima producía una sintomatología similar a la de aquellos pacientes con PHARC, ya que presentaban déficits

auditivos y problemas motores, junto con un incremento en las concentraciones de lyso-PS, lo que está relacionado con respuestas proinflamatorias.

2.3.3 Endocannabinoides como precursores

Además de las rutas de hidrólisis, los endocannabinoides también son sustratos de las enzimas que metabolizan el ácido araquidónico (AA). Estas vías llevan a la producción de nuevos metabolitos biológicamente activos, por lo que no se consideran estrictamente reacciones de degradación. En particular, la AEA y el 2-AG son metabolizados por lipooxigenasas (LOXs), por la ciclooxigenasa 2 (COX-2), y por el citocromo P₄₅₀, produciéndose leukotrienos, prostaglandinas, y ácidos epoxyeicosatrienicos (EET), respectivamente^{165,174,175}. Los productos del metabolismo de las LOXs y del citocromo P₄₅₀ actúan como ligandos de los receptores cannabinoides, mientras que las moléculas resultantes de la acción de la COX-2 ejercen su efecto sobre otros receptores diferentes a los del SEC^{148,174,175}.

2.4 Farmacología del SEC

Los receptores cannabinoides no solo son activados por sus ligandos endógenos, sino también por una amplia variedad de moléculas exógenas, y se pueden clasificar en función de su efecto sobre los receptores cannabinoides. Por un lado, los agonistas son compuestos capaces de unirse a un receptor activando así una respuesta biológica. Según su estructura química se pueden clasificar en agonistas clásicos, que poseen de un anillo tricíclico, como los fitocannabinoides y sus análogos sintéticos como el HU-210 y la Nabilona; agonistas no clásicos, donde encontraríamos los análogos bicíclicos o tricíclicos del Δ^9 -THC como el CP-55,940; y aminoalquilindoles, que son derivados de la pravadolina con mayor afinidad por los receptores cannabinoides que el resto de agonistas, como el WIN55,212-2. Por otro lado, los antagonistas son moléculas capaces de unirse a un receptor bloqueando el inicio de la respuesta biológica, como SR141716 (*Rimonabant*®) para el receptor CB₁ y SR144528 para el receptor CB₂. Por último, los moduladores alostéricos son moléculas que se unen al receptor en un sitio distinto al centro activo, conocido como sitio alostérico, dando lugar a cambios en la conformación del receptor que pueden potenciar o reducir el efecto de sus agonistas, como es el caso del compuesto VCE006.1, un modulador alostérico positivo del receptor GPR55.

También existen moduladores del tono cannabinoide, que actúan sobre las enzimas que regulan el SEC, como el caso del URB597, que inhibe la enzima de degradación FAAH, o el JZL184, que inhibe la enzima de degradación MAGL¹⁷⁶.

2.5 Funciones del SEC en el SNC

El SEC posee un papel muy importante en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y conductuales relacionados con las áreas del sistema nervioso donde se expresan los receptores cannabinoides (Tabla 3), incluyendo procesos como el control de la actividad motora, la memoria y el aprendizaje, y las emociones, entre otros. Además, también se encuentra altamente implicado en la regulación de la supervivencia neuronal participando en varios mecanismos de neuroprotección como el control de la excitotoxicidad, de la neuroinflamación, del estrés oxidativo y de la autofagia^{101,177}.

Proceso	Función SEC	Localización receptores cannabinoides en SNC
Actividad motora	Estimulación/inhibición del movimiento	Ganglios basales, cerebelo, corteza motora, médula espinal
Memoria y aprendizaje	Modulación de la extinción de la memoria regulando los procesos de LTP/LTD	Hipocampo, corteza prefrontal, cerebelo
Emoción y motivación	Alteraciones en ansiedad, motivación y sistema de recompensa	Amígdala, sistema límbico, corteza cerebral
Control del apetito y de la ingesta	Modulación del apetito y del balance energético	Núcleos hipotalámicos y límbicos
Émesis	Control de la náusea y el vómito	Área postrema (tronco cerebral)
Termorregulación	Regulación de la temperatura corporal	Núcleos hipotalámicos
Nocicepción	Analgesia espinal y supraespinal	Médula espinal, tálamo, corteza cerebral
Neuroprotección	Regulación de la supervivencia celular	Neuronas y células de glía de diversas áreas del SNC
Neurogénesis	Participación en la generación de nuevas neuronas	Giro dentado del hipocampo, zona subventricular

Tabla 3. Procesos neurobiológicos mediados por el SEC. Adaptada de [101].

En los siguientes apartados se explicará de manera más extensa la relación del SEC con los principales procesos relacionados con la SCA-3.

2.5.1 Control de la actividad motora

Uno de los procesos fisiológicos en los que interviene el SEC es en el control de la actividad motora, especialmente en relación a los movimientos automatizados que se regulan desde los ganglios basales y a la coordinación motora que se controla desde el cerebelo. Todas estas áreas presentan una alta expresión del receptor CB₁, cuya activación parece tener un efecto bifásico ya que en condiciones experimentales se ha visto que la administración de dosis bajas de agonista tiene un efecto estimulador sobre la actividad motora, mientras que a dosis altas la actividad motora se ve inhibida¹⁷⁸. Estos efectos son el resultado de la interferencia directa o indirecta de estos agonistas en la actividad de los principales neurotransmisores implicados en los circuitos cerebrales que regulan la actividad motora. Por ejemplo, en los ganglios basales la activación del receptor CB₁ afecta al equilibrio entre las señales glutamatérgicas y GABAérgicas de las neuronas del caudado-putamen y el globo pálido, lo que resulta finalmente en una inhibición de la actividad motora. Sin embargo, la activación de otros receptores como TRPV1 o CB₂ localizados en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra produce el efecto contrario¹⁰¹. En el caso del cerebelo, la activación del receptor CB₁ modula las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas de las células de Purkinje, por lo que alteraciones en estas sinapsis producirán cambios en el procesamiento de la información dando lugar a errores en la coordinación y ejecución de los movimientos¹⁷⁹.

2.5.2 Memoria y aprendizaje

El SEC tiene un papel esencial en la modulación de los procesos de aprendizaje y memoria. Se ha visto que la activación del receptor CB₁ en hipocampo puede producir cambios en la memoria episódica a corto plazo, en la memoria de trabajo y en la memoria a largo plazo, siendo especialmente sensibles a la activación de CB₁ las dos primeras^{180,181}. La estimulación del receptor CB₁ puede tener un doble efecto. Por un lado, se han observado en modelos murinos déficits en la memoria al administrar ligandos exógenos^{182,183}. Esto podría ocurrir debido a la aparición de un desequilibrio en las neuronas GABAérgicas de los circuitos hipocampales, cuya función se ve comprometida, alterando así los procesos de LTP (del inglés *long term potentiation*) y disminuyendo la densidad y longitud de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales¹⁸⁴. Sin embargo, también se han observado mejoras en la memoria al promover un incremento endógeno del tono cannabinoide mediante la inhibición farmacológica de la enzima FAAH¹⁸⁵. Se ha propuesto que esto puede ser debido a que en condiciones fisiológicas el SEC activa durante un periodo de tiempo corto una serie limitada de circuitos neuronales, mientras

que la administración de agonistas externos estarían sobrecargando el sistema produciendo el efecto opuesto¹⁸⁶.

2.5.3 Emoción

Se sabe que el SEC interviene en distintos procesos emocionales, ya que los efectos del consumo de cannabis recreacional producen cambios en el estado de ánimo. Algunos de los efectos más populares son aquellos que llevan a un estado de euforia, relajación y bienestar. Sin embargo, la activación del receptor CB₁ también puede tener como consecuencia aparición de ansiedad, pánico y reacciones psicóticas, por lo que el SEC podría ser muy relevante en el estudio de los estados emocionales relacionados con ansiedad, estrés, depresión y adicción¹⁸⁷. Esta respuesta bifásica puede depender de factores tales como la concentración de ligando, el contexto externo y la experiencia previa del individuo¹⁸⁸.

2.5.4 Neuroprotección

Ante una situación de daño, en las neuronas se ponen en marcha una serie de mecanismos de neurodegeneración comunes como pueden ser procesos de inflamación, excitotoxicidad, o estrés oxidativo, entre otros. Los cannabinoides activan una serie de vías de señalización destinadas a revertir ese daño celular⁸⁹, como pueden ser: disminución de liberación de citoquinas proinflamatorias y aumento de liberación de citoquinas antiinflamatorias, reducción de los fenómenos de excitotoxicidad, disminución de la concentración de radicales libres, o disminución de la concentración de calcio intracelular, entre otros¹⁸⁹. Como el SEC está implicado en la supervivencia y apoptosis celular, acciones farmacológicas destinadas a incrementar o disminuir el tono endocannabinoide podrían tener efectos en la supervivencia celular^{190,191}. Algunos de los principales mecanismos neuroprotectores en los que está implicado el SEC son los siguientes (**Figura 9**):

• Efectos sobre la homeostasis del glutamato (excitotoxicidad)

En los procesos neurodegenerativos, tanto agudos como crónicos, se produce una alteración en la homeostasis del glutamato que lleva a un aumento en la concentración extracelular de este neurotransmisor. Al interaccionar con diferentes receptores celulares, como el receptor NMDA, se induce un incremento rápido y continuado de los niveles de calcio intracelular, lo que ocasiona una sobreactivación de mecanismos celulares dependientes de calcio que pueden terminar resultando en degeneración y muerte neuronal^{101,192}. De esta

manera, al activarse el receptor CB₁ presináptico se inhibirá la liberación del glutamato, disminuyendo el daño neuronal¹⁸⁹.

• Modulación de la homeostasis del calcio

Como consecuencia de la sobreactivación de los receptores de glutamato se produce un aumento de la concentración intracelular de los niveles de calcio y sodio, lo que lleva a la activación de cascadas intracelulares degradativas que pueden comprometer la supervivencia celular. La activación del receptor CB₁ por los cannabinoides inhibe la entrada de calcio a la célula al bloquear los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, limitando la sobreactivación de estas vías intracelulares degradativas y, por lo tanto, la muerte neuronal^{101,193}.

• Neuroinflamación

Otro mecanismo citotóxico asociado a la neurodegeneración, tanto aguda como crónica, es la activación de elementos gliales como la microglía activa o los astrocitos reactivos, lo que lleva a la generación de eventos inflamatorios locales. La inflamación puede inducir o agravar el daño celular debido a la acumulación de mediadores citotóxicos, como distintas citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6), eicosanoides, óxido nítrico, y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), que favorecen la muerte de las neuronas. Algunos agonistas cannabinoides pueden actuar como moléculas antiinflamatorias mediante la regulación de la respuesta inmune y de la liberación de estos mediadores proinflamatorios. Este efecto está mediado principalmente por la activación de los receptores CB₂, aunque también pueden intervenir otros receptores como CB₁, PPAR γ y GPR55^{101,194}.

• Estrés oxidativo

Uno de los procesos más relevantes en la degeneración neuronal es el estrés oxidativo, que se produce al acumularse productos tóxicos como las ROS o las especies reactivas de nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) que, si no son eliminadas, dañan proteínas, ADN y lípidos de membrana, pudiendo llevar a la muerte celular. La producción de estos ROS está relacionada con la excitotoxicidad y con la disfunción mitocondrial. Los cannabinoides pueden tener un papel neuroprotector por su capacidad de disminuir la concentración de radicales libres mediante un efecto dual que parece estar mediado por mecanismos independientes de los receptores cannabinoides. Por un lado, algunos cannabinoides pueden actuar como lavadores de radicales libres debido a la presencia de un anillo fenólico en su estructura química que neutraliza el efecto tóxico de esas moléculas¹⁹⁵, mientras que, por otro lado, algunos cannabinoides son capaces de interactuar con las vías de señalización

antioxidantes como la mediada por el factor de transcripción Nrf2 o los receptores nucleares PPAR¹⁹⁶.

• Autofagia

La autofagia es un mecanismo celular que interviene en la degradación de proteínas y orgánulos celulares a nivel lisosomal. Este proceso interviene tanto en procesos fisiológicos normales como en diferentes condiciones patológicas. La activación de la autofagia tiene un papel clave en la eliminación de los agregados proteicos característicos de ciertas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la SCA-3^{33,197}. En este contexto, algunos agonistas cannabinoides han demostrado su eficacia como inductores de autofagia, lo que podría llegar a implicar que puedan tener un papel neuroprotector a través de la activación de estos mecanismos en este tipo de enfermedades neurodegenerativas¹⁹⁸.

• Efectos vasodilatadores

El daño cerebral agudo asociado a los infartos cerebrales y a los ictus lleva a la generación de mediadores derivados del endotelio que afectan al tono vascular local, produciendo una vasoconstricción que limita el flujo de sangre en el área y agravando por tanto el daño cerebral. Los cannabinoides pueden actuar como moduladores del tono vascular, pudiendo ejercer una función neuroprotectora a través de la vasodilatación mediante los receptores CB₁, CB₂ y TRVP1^{101,199}.

• Control sobre la temperatura corporal

La hipotermia es un mecanismo que se considera neuroprotector debido a que disminuye la tasa metabólica y la demanda de oxígeno, además de reducir el estrés oxidativo y la corriente de calcio al interior celular, entre otros. Los cannabinoides pueden intervenir en la regulación de la temperatura corporal mediante el receptor CB₁, pudiendo tener un efecto neuroprotector al disminuirla, lo que puede ser de interés especialmente en los procesos neurodegenerativos agudos, como la isquemia o el ictus²⁰⁰.

• Neurogénesis

Se ha encontrado que los cannabinoides pueden regular a través de los receptores CB₁ y CB₂ los mecanismos de proliferación y diferenciación de precursores neurales, así como de favorecer su migración a los sitios lesionados, por lo que podrían resultar beneficiosos frente al daño neurodegenerativo gracias a su capacidad de inducir neurogénesis en el cerebro adulto^{201,202}.

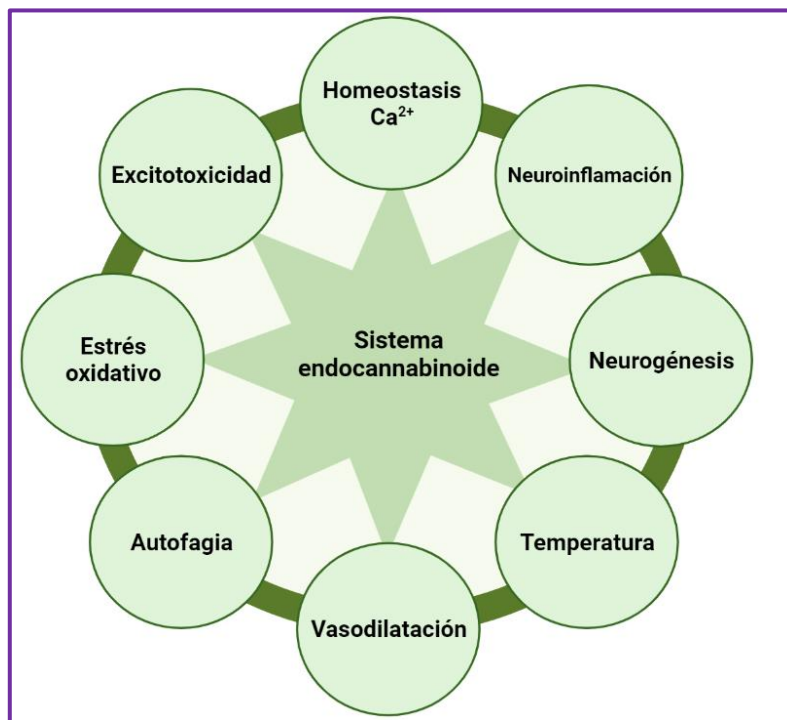


Figura 9. Mecanismos neuroprotectores en los que está implicado el sistema endocannabinoide.

Estas propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides se están investigando ampliamente en la actualidad con el fin de encontrar posibles estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversas patologías neurodegenerativas agudas (como por ejemplo isquemia, lesiones cerebrales y medulares) y crónicas, como el caso de las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Además, en muchas de estas patologías se ha encontrado que el SEC está desregulado, lo que hace que los endocannabinoides dejen de actuar como mediadores homeostáticos y contribuyan a la evolución de la enfermedad^{88,93,189}. Por ello, las terapias basadas en cannabinoides son una estrategia muy prometedora para modificar la progresión de una enfermedad neurodegenerativa, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas específicas dentro del SEC.

3 Sistema endocannabinoide y ataxia espinocerebelosa tipo 3

En base a las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides, en nuestro laboratorio se comenzó a estudiar su posible aplicación terapéutica para tratar las ataxias espinocerebelosas, y más en concreto la SCA-3, ya que, como se ha explicado en apartados anteriores, estas enfermedades comparten mecanismos patogénicos con otras de las patologías neurodegenerativas mencionadas anteriormente, y aún no existen tratamientos que mejoren el pronóstico de estas enfermedades.

Para abordar este objetivo, los primeros estudios que se llevaron a cabo en nuestro laboratorio estuvieron encaminados a describir las posibles alteraciones de los principales componentes del SEC en las SCAs, y en especial la SCA-3, con el fin de elucidar si estas alteraciones pudieran estar relacionadas con la patología de estas enfermedades y así, poder desarrollar un tratamiento basado en cannabinoides para tratar la sintomatología, e incluso, retrasar la progresión de la enfermedad.

Estos primeros estudios se llevaron a cabo tanto en tejidos *postmortem* de cerebelos de pacientes humanos con distintos tipos de ataxias espinocerebelosas^{203,204} como en un modelo de ratón de SCA-3^{205,206}.

3.1 Estudios *postmortem* de cerebelos de pacientes con SCAs

En los estudios *postmortem* de cerebelos procedentes de pacientes con distintos tipos de ataxias espinocerebelosas se encontraron alteraciones en la expresión de algunos de los elementos clásicos del SEC con respecto a los sujetos control: los receptores CB₁ y CB₂²⁰³, y las enzimas de degradación de cannabinoides FAAH y MAGL²⁰⁴. Los principales resultados se resumen en la **Tabla 4**.

Se encontró que la expresión del receptor CB₁ era distinta en los cerebelos de los sujetos control y en los de pacientes con SCA. En los controles la expresión de este receptor se daba en la zona basal de las neuronas de Purkinje, en las formaciones conocidas como “formaciones en pincel”, lo que podría indicar que el marcaje correspondía a las células en cesto, en vez de a las propias neuronas de Purkinje. Sin embargo, en el caso de los pacientes con SCA, el marcaje no aparecía únicamente en estas formaciones de tipo pincel, sino que también aparecía en el cuerpo entero de la célula de Purkinje. Además, también se vio que la expresión del receptor CB₁ se encontraba incrementada en los pacientes con SCA respecto a los controles en las neuronas del núcleo dentado, en la capa granular de la corteza y en la sustancia blanca del

cerebelo. Respecto al receptor CB₂, su expresión se veía aumentada en los pacientes con SCA respecto a los controles tanto en la capa granular como en la sustancia blanca del cerebelo, así como en el núcleo dentado. Además, en el caso de los pacientes existía expresión de este receptor no sólo en células gliales sino también en neuronas, especialmente en las células de Purkinje, cosa que no ocurría en los sujetos control. En cuanto a las enzimas de degradación, se encontró que la expresión de la enzima FAAH era mayor en los pacientes con SCA, en concreto en la capa granular y en la capa de las células de Purkinje. La expresión de la MAGL, por su parte, estaba incrementada tanto en las células de Purkinje como en las neuronas del núcleo dentado, además de en la sustancia blanca del cerebelo en los pacientes con SCA respecto a los controles.

Elemento SEC	Estructura del SNC	Alteraciones en la SCA-3 en humanos
Receptor CB ₁	Cerebelo	Expresión uniforme en el soma de las células de Purkinje, en vez de concentrada en las formaciones en pincel.
		Expresión incrementada en capa granular, sustancia blanca, y núcleo dentado.
Receptor CB ₂	Cerebelo	Expresión incrementada en capa granular, células de Purkinje, sustancia blanca y núcleo dentado.
		Expresión tanto en células gliales como en neuronas.
Enzima FAAH	Cerebelo	Expresión incrementada en capa granular y células de Purkinje.
Enzima MAGL	Cerebelo	Expresión incrementada en células de Purkinje, sustancia blanca y núcleo dentado.

Tabla 4. Alteraciones encontradas en la expresión de distintos elementos del SEC en la SCA-3 en humanos.

3.2 Estudios en un modelo transgénico murino de SCA-3.

En nuestro laboratorio se llevaron a cabo estudios en un modelo murino de SCA-3 de 135 repeticiones del triplete CAG (CMVMJD135)²⁰⁷. Este modelo permitió estudiar la evolución del SEC a lo largo de las diferentes fases de la enfermedad, ya que los resultados obtenidos en los cerebelos *postmortem* de pacientes mostraban las alteraciones del SEC en una fase muy avanzada de la patología. Los estudios neuroconductuales en estos ratones permitieron establecer tres etapas en la progresión de la enfermedad: una primera etapa sintomática

temprana hasta las 16 semanas de edad; una segunda etapa sintomática intermedia, desde las 16 hasta las 32 semanas de edad; y una última etapa sintomática avanzada, desde las 32 hasta las 56 semanas de edad. Los estudios neuropatológicos y bioquímicos llevados a cabo en las regiones del encéfalo más afectadas por la enfermedad (cerebelo²⁰⁵, tronco encefálico²⁰⁵ y estriado²⁰⁶) revelaron que las neuronas de Purkinje de los ratones SCA-3 se encontraban bastante preservadas, sin signos significativos de neurodegeneración. Por su parte, en el núcleo dentado, en el núcleo pontino y en el cuerpo estriado de los ratones SCA-3 se observó atrofia y muerte neuronal. Todo esto está en consonancia con lo que ocurre en los pacientes con esta enfermedad^{15,29,30,32}. También se encontró que la neurodegeneración no estaba asociada a activación glial ni a procesos neuroinflamatorios.

En este modelo murino de SCA-3 se caracterizaron los elementos clásicos del SEC (receptores CB₁ y CB₂, enzimas de síntesis DAGL y NAPE-PLD, enzimas de degradación FAAH y MAGL, y endocannabinoides como AEA y otras N-aciletanolaminas, 2-AG y otros diacilglicerol) en las estructuras más afectadas por la enfermedad: cerebelo, tronco encefálico y estriado. Los resultados se resumen en la **Tabla 5**.

Se encontró que los niveles de expresión del receptor CB₁ se encontraban disminuidos en los animales transgénicos con respecto a los controles en las neuronas del núcleo dentado y en las neuronas aferentes y eferentes del estriado, mientras que se encontraron aumentos de su expresión en los terminales de las células en cesto de la capa de las células de Purkinje. Este incremento del receptor CB₁ puede explicar que en este modelo de SCA-3, a diferencia de otras SCAs, las neuronas de Purkinje no se vean afectadas. Por el contrario, la disminución de la expresión del receptor CB₁ en el estriado y núcleo dentado puede llevar a un aumento de la excitotoxicidad que explicaría la afectación de las neuronas de estas regiones.

A diferencia de los resultados obtenidos de los estudios en muestras *postmortem* de cerebelo humano, no se encontraron variaciones en la expresión del receptor CB₂ en los animales SCA-3 con respecto de los controles en ninguna de las áreas estudiadas. Este receptor se expresa principalmente en células de glía, especialmente en estado activado, y, como se ha dicho anteriormente, en este modelo no se encontraron signos de neuroinflamación ni de activación glial.

Respecto a las enzimas implicadas en el metabolismo de los endocannabinoides, no se encontraron alteraciones en los animales SCA-3 con respecto de sus controles en la expresión de las enzimas DAGL, NAPE-PLD ni MAGL en ninguna de las áreas estudiadas. Sin embargo, se observó un incremento de la de la expresión de la enzima FAAH en las células de Purkinje y en

la sustancia blanca del cerebelo, núcleo pontino del tronco encefálico y en el estriado. De forma paralela al aumento de expresión de la enzima FAAH, se encontró un descenso en las concentraciones de los ligandos AEA y OEA en el tronco encefálico de este modelo. Este descenso de endocannabinoides podría contribuir a los procesos de neurodegeneración.

Elemento SEC	Estructura del SNC	Alteraciones en la SCA-3 en ratón
Receptor CB ₁	Cerebelo	Expresión incrementada en células de Purkinje.
		Expresión disminuida en neuronas del núcleo dentado.
	Estriado	Expresión disminuida en neuronas del estriado.
Enzima FAAH	Cerebelo	Expresión incrementada en células de Purkinje y sustancia blanca.
	Estriado	Expresión incrementada en estriado.
	Tronco encefálico	Expresión incrementada en núcleo pontino.
Endocannabinoide AEA	Tronco encefálico	Concentración disminuida.
Endocannabinoide OEA	Tronco encefálico	Concentración disminuida.

Tabla 5. Alteraciones encontradas en la expresión de distintos elementos del SEC en la SCA-3 en ratón.

A la vista de la desregulación de algunos de los elementos clásicos del SEC en la SCA-3, se hace necesario profundizar en el estudio del estado de otros elementos del SEC más allá de los elementos clásicos, además de plantear que una manipulación farmacológica dirigida a corregir las alteraciones existentes pueda derivar en una mejora de la sintomatología o en una reducción en la progresión de la enfermedad.

OBJETIVOS

Tal y como se ha explicado en la Introducción, nuestros estudios previos sobre el estado del SEC en las SCA-3 han mostrado que algunos elementos clásicos de este sistema se encuentran alterados en las principales estructuras del encéfalo afectadas en esta enfermedad neurodegenerativa. Entre las principales alteraciones encontradas está el aumento de la expresión de los receptores clásicos CB₁ y CB₂, así como aumentos de la expresión de las enzimas de degradación de endocannabinoides FAAH y MAGL^{203–206}. La **hipótesis** central que planteamos en la presente Tesis Doctoral es que el SEC se encuentra desregulado en la SCA-3, contribuyendo a los procesos patogénicos de la enfermedad, y que la manipulación farmacológica del mismo puede tener efectos beneficiosos para el tratamiento de la SCA-3, y por extensión de otras SCAs. Por ello, el **objetivo general** de este proyecto de investigación es estudiar el potencial terapéutico del SEC en la SCA-3. Para abordarlo, se han establecido los siguientes **objetivos específicos**:

Objetivo #1: Investigar elementos no clásicos del sistema endocannabinoide que pudieran ser utilizados como nuevas dianas farmacológicas (GPR55 y ABHD12) en los ratones CMVMJD150Q, en relación con la progresión de la enfermedad, con el objetivo de conocer si hay cambios en estos elementos similares a los identificados en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre los receptores CB₁/CB₂ y las enzimas FAAH/MAGL^{205,206}.

Objetivo #2: Estudiar el papel del receptor CB₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes derivados del cruce de ratones deficientes en el gen de del receptor CB₂ (KO-CB₂) con animales CMVMJD150Q. Con este objetivo se pretende ver si con el silenciamiento del receptor CB₂ se produce un agravamiento de la neuropatología descrita en la SCA-3.

Los dos objetivos anteriores se abordarán a través de dos diseños experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Diseños experimentales

1.1 Diseño experimental 1: Búsqueda de nuevas potenciales dianas terapéuticas en el SEC en un modelo murino de SCA-3.

Como ya se ha comentado anteriormente, en la SCA-3 se han encontrado alteraciones en algunos elementos clásicos del SEC^{205,206}. Con este diseño nos propusimos ampliar el estudio investigando posibles cambios que puedan darse en nuevos elementos de este sistema, o que están relacionados con su actividad.

Para ello, en la presente Tesis Doctoral hemos utilizado un modelo transgénico murino de SCA-3, el modelo CMVMJD150, cedido por la Dra. Patricia Maciel (*Universidade de Minho, School of Health Sciences, Braga, Portugal*)²⁰⁷. En este modelo los ratones transgénicos expresan el ADN de la variante *c* del gen de la ataxina-3 humana que contiene aproximadamente 150 repeticiones del triplete CAG.

El primer paso en este diseño experimental ha sido caracterizar la progresión de la enfermedad mediante la evaluación de diferentes parámetros. Por una parte, se llevó a cabo el seguimiento del estado de salud, mediante el registro del peso, de la distonía (medida a partir del grado de *claspings*) y de la supervivencia de los animales. También se realizaron diferentes pruebas de comportamiento que nos permitieron evaluar distintos aspectos de las capacidades motoras (fuerza muscular, medida con la prueba de *hanging wire*; coordinación motora, con la prueba de *rotarod*) y capacidades cognitivas y/o emocionales (aprendizaje motor, mediante *rotarod*; aprendizaje y memoria espacial, con el laberinto acuático de Morris; y control motor jerárquico y estrés mediante el test del cilindro). Estos estudios nos permitieron establecer tres etapas en la progresión de la enfermedad.

Una vez caracterizada la progresión de la enfermedad se procedió a estudiar el estado del receptor GPR55 y la enzima de degradación de cannabinoides ABHD12. El receptor GPR55 es un posible receptor cannabinoide implicado en la conducta motora, ansiedad, y aprendizaje y memoria espacial, entre otros^{143,145,146}. La enzima ABHD12, que participa en la degradación de los endocannabinoides, ha sido relacionada con el desarrollo de una patología (PHARC¹⁷⁰) que incluye ataxia como uno de sus síntomas principales. El estudio de estos dos elementos puede aportar información interesante acerca de los mecanismos patogénicos que subyacen a la SCA-3 y, en su caso, podrían plantearse como dianas terapéuticas.

Estos estudios se llevaron a cabo en ambos sexos por separado, ya que está descrito que en algunas enfermedades neurodegenerativas la progresión y los síntomas pueden ser

diferentes en función del sexo^{208,209}. Los animales experimentales se sacrificaron a tres edades diferentes representativas de las tres etapas de la enfermedad, y se recogieron los tejidos de las principales regiones del encéfalo implicadas en los parámetros conductuales alterados en la enfermedad. Para estos análisis se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR.

1.2 Diseño experimental 2. Estudio del papel del receptor CB₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes

En estudios previos realizados en cerebelos postmortem de pacientes que murieron diagnosticados de algún tipo de ataxia se encontró un incremento de la expresión del receptor CB₂²⁰³. Esto podría ser un mecanismo de defensa endógeno para intentar reducir el daño producido por los procesos inflamatorios que se dan en este tipo de enfermedades, puesto que la activación de CB₂ reduce la generación de factores neurotóxicos y proinflamatorios²¹⁰. Por ello, el receptor CB₂ podría ser una diana neuroprotectora prometidora, además de por su estrecha relación con el sistema inmune y por no tener actividad psicoactiva²¹¹. Aunque en un modelo anterior de SCA-3 con menos repeticiones no se observaron cambios en los marcadores de neuroinflamación ni en los niveles de expresión del CB₂, en nuestro modelo murino de SCA-3 utilizado para esta Tesis hemos visto signos neuroinflamatorios (datos no publicados) y el receptor CB₂ podría jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad.

Para determinar el papel del receptor CB₂ en la progresión de la SCA-3 se generaron dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3. En estos animales se llevaron a cabo pruebas neuroconductuales para evaluar sus características fenotípicas a las 8 semanas de edad, cuando comienzan a manifestarse los primeros síntomas de la enfermedad. Estas pruebas nos permiten estudiar diferentes parámetros comportamentales relacionados con funciones motoras, así como funciones cognitivas. Al igual que en los anteriores diseños experimentales, los estudios se hicieron en machos y en hembras por separado

2 Procedimientos experimentales

2.1 Animales de experimentación

En la presente tesis doctoral se ha utilizado un modelo murino C57BL/6J de SCA-3 cedidos por la Dra. Patricia Maciel (*Universidade de Minho, School of Health Sciences, Braga, Portugal*).

Este modelo es el CMVMJD150, en el que los ratones transgénicos expresan la variante c del gen de la ataxina-3 humana con 150 repeticiones del triplete CAG²⁰⁷.

Para la generación de dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3 se han realizado cruces del modelo anterior con un modelo murino KO-CB₂ cedido por el Dr. Julián Romero (Universidad Francisco de Vitoria, Madrid, España)²¹², en el que los animales tienen silenciada la expresión del gen *CNR2*, que codifica el receptor CB₂, mediante el sistema loxP/Cre recombinasa.

Los animales estuvieron estabulados en el CAI Animalario de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (22±2°C) y humedad relativa (55±10%), con ciclos diarios de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Los animales se agruparon en jaulas con otros ratones del mismo sexo, habiendo un máximo de siete ratones por jaula. Todos los animales tuvieron de manera constante agua y comida *ad libitum*.

Con el objetivo de mantener la colonia, para generar animales genéticamente idénticos se hicieron cruces entre hermanos. Para el modelo murino de SCA-3 se diseñaron cruces de forma que el animal transgénico obtenido estuviese en condiciones de heterocigosis para la ataxina-3 mutada, mientras que para el modelo KO-CB₂ los cruces se diseñaron para que toda la descendencia fuese homocigota KO-CB₂.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo protocolos estandarizados de trabajo según la normativa europea (Directiva 2010/63/EU) y española (RD 53/2013) para el correcto manejo de animales de experimentación, y de acuerdo con las normas aprobadas por el comité ético de la Universidad Complutense de Madrid. En todo momento se siguieron las recomendaciones de reemplazo, reducción y refinamiento.

Se utilizaron tanto machos como hembras, debido a las diferencias que existen a nivel de algunos de los parámetros estudiados.

2.2 Genotipado

Para determinar si los animales de experimentación presentaban el gen de la ataxina-3 humana mutada y/o el gen CB₂, se llevó a cabo el genotipado de los mismos a partir de la amplificación del ADN genómico extraído de los fragmentos de oreja obtenidos de los marcajes.

Tanto para la extracción de ADN genómico como para la amplificación de este se utilizaron kits de la casa comercial de Sigma-Aldrich, siguiéndose el protocolo proporcionado por la casa comercial con adaptaciones. Para la extracción de ADN se añadió al tejido 25µl de solución de

extracción y 6,25µl de solución de preparación de tejidos a cada muestra, y, tras incubarlo 10 minutos a temperatura ambiente y 3 minutos a 95°C, se añadieron 25µl de solución de neutralización B, quedando preparado así para proceder con la amplificación del mismo.

• Genotipado ataxina-3

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) en la que se amplificaban los fragmentos de ADN correspondientes a la ataxina-3 murina (550pb) que aparecía en los animales WT y SCA-3, y a la ataxina-3 humana (450pb), que aparecía únicamente en los animales que eran SCA-3 (**Figura 10**). Para la delimitación de la ataxina-3 murina se utilizaron los cebadores mmjd89 (5' GCT AGC TAG AGC TAC TTA TTG 3') y mmjd54 (5' GAC TCC AGA GAG CAC CTG 3'), y para la detección de la ataxina-3 humana se utilizaron los cebadores TR1 (5' GAA GAC ACC GGG ACC GAT CCA G 3') y TR2 (5' CCA GAA GGC TGC TGT AAA AAC GTG C 3')²⁰⁷.

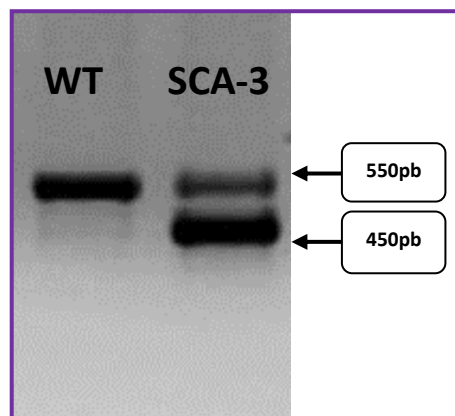


Figura 10. Muestra del gel de genotipado SCA-3. **WT:** *wild type*, no presenta el gen *atxn3* mutado. **SCA-3:** presenta el gen *atxn3* mutado.

Para llevar a cabo la PCR se añadieron a 2µl del ADN genómico obtenido anteriormente, 5µl de REExtract-N-Amp PCR Reaction Mix (de Sigma-Aldrich, formada por tampón, sales, dNTPs, Taq Polimerasa, tinte REDTaq, y anticuerpo JumpStart Taq), 0,2µl de H₂O, 0,6µl de cebador TR1, 0,6µl de cebador TR2, 0,8µl de cebador mmjd54 y 0,8µl de cebador mmjd89. El programa de amplificación seguido fue el siguiente: 5 minutos a 95°C para la desnaturalización del ADN, seguido de 35 ciclos de tres pasos (1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineación de oligonucleótidos a 60°C y 1 minuto de extensión de la cadena de ADN a 72°C), seguido de una extensión final del ADN a 72°C durante 5 minutos.

A continuación, los productos de la PCR se cargaron y corrieron en un gel de agarosa/TBE 0,5X (de sus siglas en inglés, *Tris/Borate/EDTA*) al 2%, y se visualizaron con Gel Red en un transiluminador de luz ultravioleta.

• Genotipado CB₂

Se amplificó el fragmento de ADN correspondiente al gen que codifica para el receptor CB₂ (1800pb), mediante la técnica de PCR. Para detectar la presencia o ausencia de este

receptor, se utilizaron los cebadores oP2 (5'-GGT CGA CTC CAA CGC TAT CT-3') y oP3 (5'-GCC TTG AAC CTC CAT CTG TT-3').

Para realizar la PCR, a 2µl del ADN genómico obtenido anteriormente se le añadieron, 5µl de REExtract, 2,5µl de H₂O, 0,25µl de cebador oP2 y 0,25µl de cebador oP3. El programa utilizado para la amplificación de este gen fue el siguiente: 2 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial del ADN, 35 ciclos de 3 pasos (30 segundos de desnaturalización a 94°C, 15 segundos a 60°C para la unión de los oligonucleótidos (bajando 0,5°C cada ciclo) y 45 segundos a 72°C para extensión de la cadena de ADN). Por último, 8 minutos a 72°C para la extensión final.

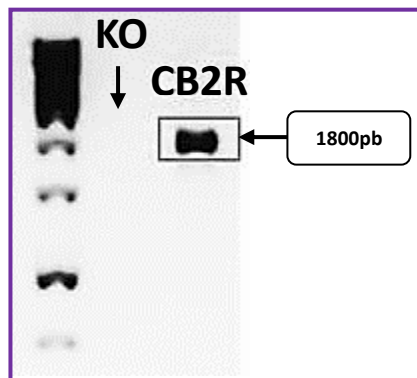


Figura 11. Muestra del gel de genotipado CB₂. **KO:** Knockout, no expresa el gen para el receptor CB₂. **CB₂R:** expresa el gen para el receptor CB₂.

Los productos de la PCR se visualizaron con Gel Red en un transiluminador de luz ultravioleta tras haberse cargado en un gel de agarosa/TBE 0,5X (de sus siglas en inglés, *Tris/Borate/EDTA*) al 1,5% (**Figura 11**).

2.3 Evaluación de la progresión de la enfermedad

La caracterización de las alteraciones comportamentales que ocurren a lo largo de la enfermedad se llevó a cabo mediante distintas pruebas que permiten evaluar diferentes aspectos que pueden reflejar los síntomas que aparecen en los pacientes con SCA-3, tanto motores como cognitivos y/o emocionales. Además, durante el tiempo que los ratones estuvieron estabulados se llevó a cabo un seguimiento de su estado de salud mediante la monitorización del peso, del grado de distonía (reflejo de *clasp*ing) y de la severidad de la enfermedad de los animales.

2.3.1 Estado de salud

Con el fin de garantizar el bienestar de los animales, se llevó a cabo una vigilancia regular del estado de salud de los animales. Para ello se hizo a cabo un seguimiento observacional adaptado de la evaluación general de la severidad de los animales dictado por la directiva 2010/63/EU (**Tabla 6**) según el cual se observó el estado de los ratones en relación a su aspecto (posibles variaciones en peso, estado del pelaje, posibles indicadores de dolor, posibles inflamaciones, etc.), a sus funciones corporales (posibles alteraciones en la respiración), a su entorno (presencia

y consistencia de heces, estado del recinto, posible poliuria), y a su comportamiento (interacciones con otros animales, posibles estereotipias o tricotilomanías, posibles alteraciones en la postura y en la movilidad).

Categoría	Aspecto	Indicador específico
Aspecto	Condición corporal	Variaciones en peso
		Estado de la piel/pelo
	Ojos	Hundidos o apagados
		Cerrados o semicerrados
	Otros	«Expresión de dolor», por ejemplo, ojos semicerrados y abombamiento de la nariz en los ratones
		Constricción del abdomen
Zonas del cuerpo inflamadas		
Funciones corporales	Respiración	Acelerada, forzada, jadeos
	Temperatura corporal	Aumento o disminución; temperatura corporal medida, color de las extremidades en los roedores
	Sentidos	Vista/ equilibrio
Entorno	Entorno del recinto	Lecho, material para anidar, elementos de enriquecimiento
Comportamiento	Interacción social	Cambio con respecto al temperamento normal; interacciones aprensivas o agresivas con otros animales, ansiedad.
		Aislamiento o separación
	Comportamientos indeseados	Comportamiento repetitivo o estereotípico
		Arrancamiento de pelaje (tricotilomanía)
		Agresividad aumentada hacia personas u otros animales
	Postura y movilidad	Postura anormal
		Deambulación anormal, cojera, falta de movimiento/letargia/renuencia a moverse si se le estimula
		Movimientos carentes de coordinación
		Abdomen encorvado, cabeza caída
	Otros	Temblores
Ataques/convulsiones/espasmos		
Vocalización: espontanea o provocada.		
Indicadores específicos	Poliglutaminopatía	Posible pérdida de fuerza
		Cambios en ritmo cardiaco

Tabla 6. Índice de evaluación de la severidad de la enfermedad. Obtenido de la Directiva europea 2010/63/EU.

Peso

Para determinar el progreso del peso en los ratones, y para comprobar si existían variaciones en el peso entre los animales de los distintos grupos experimentales, se llevó a cabo un seguimiento del peso de manera regular, registrándolo cada ocho semanas en la evaluación de la progresión de la enfermedad tanto en machos como en hembras. Esto se hizo desde las 8 semanas de edad hasta el sacrificio de los animales. En el caso del experimento de los dobles mutantes, el peso se registró una única vez a las 8 semanas de edad.

Clasping

En los ratones transgénicos SCA-3 aparece un reflejo conocido como reflejo de *clasping*²¹³ (Figura 12), en el que cuando los ratones se encuentran suspendidos de la cola tienden a recoger las patas traseras e incluso encogerse sobre sí mismos. En el caso de los ratones control, la tendencia más recurrente es extender las patas traseras. La aparición de este reflejo de *clasping* es un indicador de la progresión en varios modelos murinos de neurodegeneración, y se relaciona con la distonía que presentan los pacientes con SCA-3²¹⁴.

Para evaluar este reflejo se suspende al ratón de la cola, sujetándola cerca de la base, en una zona sin objetos cercanos. Se observa la posición de las extremidades traseras durante 10 segundos y se asigna un valor de 0 si se encuentran extendidas lejos del abdomen, de 1 si una de las extremidades traseras se retrae hacia el abdomen durante más de la mitad del tiempo, de 2 si ambas extremidades traseras se encuentran parcialmente retraídas hacia el abdomen durante más de la mitad del tiempo, y de 3 si ambas extremidades se retraen completamente hacia el abdomen, llegando a tocarlo, durante más del 50% del tiempo observado²¹⁴. Esta prueba se llevó a cabo tres veces, y el valor final se obtuvo mediante la media de estas.

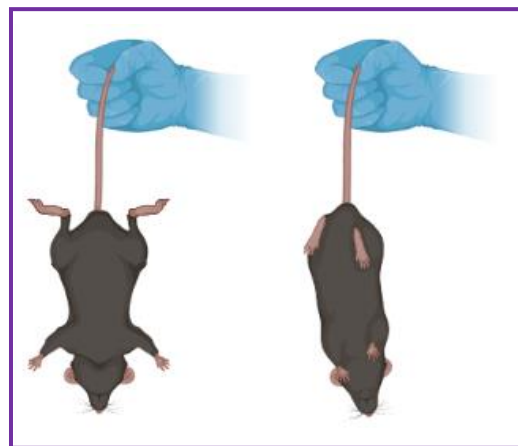


Figura 12. Prueba de *clasping*.

Esta prueba se repitió cada ocho semanas en la evaluación de la progresión de la enfermedad, desde las 8 semanas de edad hasta su sacrificio. En el caso del experimento de los dobles mutantes, esta prueba se realizó una única vez a las 8 semanas de edad.

Supervivencia

Para conocer la supervivencia de los ratones SCA-3 en comparación con los animales WT, se llevó a cabo un seguimiento del tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la muerte de los ratones. Para comparar la supervivencia entre ambos grupos se utilizó el estimador no paramétrico de Kaplan-Meier²¹⁵. Como los animales TG mueren antes que los animales WT a consecuencia del deterioro producido por la enfermedad, siguiendo las directrices de la directiva 2010/63/EU, se decidió finalizar el análisis de supervivencia a las 60 semanas de edad sacrificando a los WT.

2.3.2 Evaluación neuroconductual

A lo largo de la progresión de la enfermedad se evaluaron las alteraciones mediante distintas pruebas comportamentales que miden diferentes aspectos de las funciones motoras, cognitivas y emocionales: *hanging wire* (fuerza muscular), *rotarod* (coordinación motora y equilibrio), *rotarod* modificado de aprendizaje (aprendizaje motor), laberinto acuático de Morris (aprendizaje y memoria espacial), y el test del cilindro (control motor jerárquico y ansiedad). Todos estos aspectos reflejan las posibles disfunciones que se dan a nivel sintomatológico en la SCA-3 en pacientes.

Hanging Wire

Las alteraciones neuromusculares pueden detectarse mediante pruebas que midan fuerza muscular, como es el caso de la prueba conocida como *hanging wire* (Figura 13). En esta prueba se suspende al ratón en una rejilla, por lo que esta prueba requiere tanto de equilibrio como de fuerza de agarre²¹⁶.

Tras colocar al ratón sobre una rejilla, esta se agita levemente para conseguir que el ratón se agarre, se invierte y se suspende a 30 centímetros de la superficie. Se mide el tiempo que el animal tarda en caer desde que se da la vuelta la rejilla, poniendo como límite un tiempo máximo de 60 segundos. Este test se repite tres veces, y como rendimiento final de la misma se considera la media de las tres mediciones realizadas²⁰⁷.

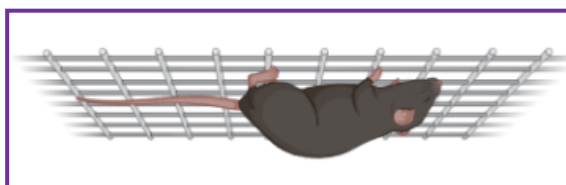


Figura 13. Prueba de *hanging wire*

Esta prueba se repitió cada ocho semanas en la evaluación de la progresión de la enfermedad, desde las 8 semanas de edad hasta el sacrificio de los animales. En el caso del

experimento de los dobles mutantes, esta prueba se realizó una única vez a las 8 semanas de edad.

Rotarod

El *rotarod* (Figura 14) es un instrumento formado por un cilindro de 3 centímetros de diámetro que puede girar a velocidad constante o creciente, haciendo que los ratones deban andar continuamente hacia delante para no caer. Este cilindro se encuentra situado a unos 15 centímetros de la base del *rotarod*, para motivar a los ratones para que anden en vez de saltar. La cantidad de tiempo que los animales son capaces de permanecer en el cilindro sin caerse permite medir tanto su coordinación motora como su equilibrio²¹⁶.

En nuestro caso, inicialmente se somete a los ratones a tres entrenamientos de 1 minuto cada uno, con el *rotarod* girando a una velocidad constante de 4 rpm, dejando un descanso de 10 minutos entre ellos. Tras el último entrenamiento, después de una pausa de 30 minutos, se llevan a cabo tres pruebas en las que se mide la latencia de caída de los ratones cuando el *rotarod* acelera de manera constante de 4 a 40 rpm en 5 minutos, siendo este el tiempo máximo de permanencia. Entre pruebas se deja una pausa de 15 minutos. El valor final de permanencia en el *rotarod* se considera la media de las tres latencias registradas.

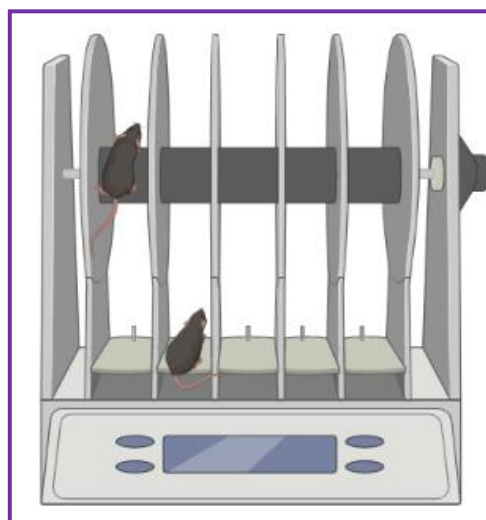


Figura 14. Prueba de *rotarod*.

Esta prueba se repitió cada ocho semanas en la evaluación de la progresión de la enfermedad, desde las 8 semanas de edad hasta su sacrificio. En el caso del experimento de los dobles mutantes, esta prueba se realizó una única vez a las 8 semanas de edad.

Rotarod modificado de aprendizaje

El aprendizaje motor es un proceso complejo cuyo objetivo es la optimización y adquisición de habilidades motoras. Modificaciones en el protocolo de la prueba de *rotarod* nos permiten evaluar la adquisición de habilidades motoras de manera selectiva, separando el aprendizaje motor de la destreza basal de los animales asociada tanto a la coordinación como a la postura²¹⁷. Para poder obtener de manera selectiva el factor de aprendizaje de la prueba de *rotarod*, se siguió el protocolo diseñado por Shiotsuki *et al.*²¹⁷. Para ello, se utiliza un *rotarod* con

un cilindro liso de diámetro mayor (9 cm) a una velocidad constante baja (10 rpm). Los ratones que nunca antes han realizado esta prueba tienen dificultades para mantenerse sobre el cilindro debido a su diámetro y a que, al ser liso, no pueden agarrarse, lo que les dificulta la tarea. Sin embargo, la baja velocidad a la que gira el cilindro permite que los animales puedan mejorar con el paso de los entrenamientos, poniendo de manifiesto si existen alteraciones en el aprendizaje motor.

Para evaluar el aprendizaje motor, se mide el tiempo que el ratón tarda en caer, y una vez que el ratón ha caído, se vuelve a colocar inmediatamente sobre el *rotarod*, y así hasta que se ha caído cinco veces. Si el ratón permanece durante más de 180 segundos sobre el tambor, cuenta como un intento. Esta prueba se repite durante cuatro días consecutivos, y el valor final de cada día es la suma de las cinco latencias de caída diarias.

Esta prueba se llevó a cabo en el estudio de la progresión de la enfermedad una única vez antes del sacrificio a 8 y 16 semanas. En el caso del experimento de los dobles mutantes, esta prueba se realizó una única vez a las 8 semanas de edad.

Laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris (**Figura 15**), también conocido como *water maze* o test de natación de Morris, es una de las pruebas más utilizadas hoy en día para evaluar aprendizaje y memoria espacial en modelos murinos²¹⁸. Esta es una tarea de navegación espacial en la que el animal tiene que nadar buscando una plataforma oculta usando claves visuales lejanas para localizar la plataforma, mientras se registran sus movimientos mediante un programa especializado en esta tarea. Este test se basa en el principio de que los ratones van a estar motivados para escapar del ambiente acuático por la ruta más rápida y directa. Se ha demostrado que las alteraciones en esta prueba son independientes de los defectos locomotores no extremos, porque las reducciones locomotoras terrestres no afectan a la velocidad de natación²¹⁹.

Para realizar esta prueba²²⁰ se utiliza una piscina de 120 centímetros de diámetro, y se divide en cuatro cuadrantes iguales imaginarios. En cada una de las paredes de la habitación que corresponden a los cuadrantes se coloca una clave visual que destaque, como pueden ser cartulinas cortadas como distintas formas geométricas de colores que contrasten con el fondo, para que sean fácilmente identificables por los animales. Por otra parte, se coloca una videocámara en el techo que recoja los movimientos de los ratones, que posteriormente serán analizados mediante el programa Smart v3.0 (Panlab, Barcelona, España).

Como la cepa de ratones utilizada en esta Tesis es de color negro, el agua de la piscina se tiñe de blanco con pintura no tóxica, para que el programa pueda seguir los movimientos del ratón. En el centro de uno de los cuadrantes de la piscina se coloca una plataforma de plexiglás de color blanco de 10 centímetros de diámetro, de tal forma que los animales no puedan verla mientras nadan en la piscina, y que siempre debe estar situada en el mismo punto. El nivel del agua debe quedar 1 centímetro por encima de la plataforma, para que los ratones no vean la plataforma ni naden por encima de ella, y a una altura que haga que el ratón no pueda ni escapar ni tocar el fondo con la cola. La temperatura del agua se mantiene constante a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Esta prueba consta de un entrenamiento que se repite durante 4 días. Cada día se realizan cuatro ensayos en los que se deposita al ratón en la piscina, cada ensayo partiendo de un cuadrante diferente (exceptuando el cuadrante en el que se encuentra la plataforma), y se cronometra el tiempo que el ratón tarda en encontrar la plataforma, dejándole un máximo de 60 segundos por ensayo. Entre ensayos debe transcurrir un tiempo mínimo de 5 minutos. Si el ratón no localiza la plataforma, se le lleva suavemente hasta depositarle encima de la misma, y se le mantiene 15 segundos sobre ella. El tiempo medio que los ratones tardan cada día en encontrar la plataforma nos permite obtener una curva de aprendizaje, y la relación entre el tiempo medio que los ratones tardan en encontrar la plataforma el cuarto día vs el primero nos da información sobre el aprendizaje.

24 horas después del último entrenamiento, se retira la plataforma y se realiza la prueba final. Esta prueba se hace dejando al ratón 60 segundos en la piscina, partiendo de un punto desde el que no hayan empezado anteriormente, preferiblemente opuesto al cuadrante en el que se encontraba situada la plataforma. El programa registrará los movimientos del ratón, y de esta manera se pueden obtener parámetros como el tiempo que hubiese tardado el ratón en encontrar la plataforma o el número de veces que el ratón cruza la zona exacta en la que se encontraba la plataforma, medidas que aportan información sobre aprendizaje y memoria espacial²²¹.

Esta prueba se realizó una única vez antes del sacrificio a los animales de 16 semanas de edad en el estudio de la progresión de la enfermedad a machos y a hembras.

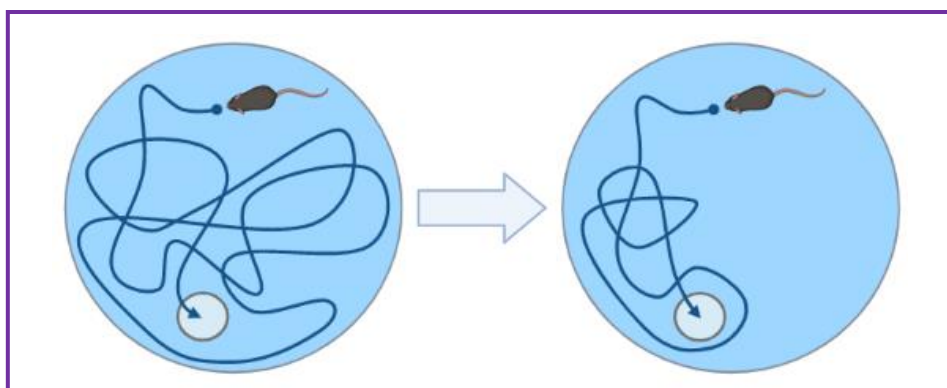


Figura 15. Prueba del laberinto acuático de Morris. En esta figura se muestra el escenario típico de un ratón sin alteraciones en memoria y aprendizaje espacial a medida que avanza la prueba.

Test del cilindro

El acicalamiento, o *grooming*, es un proceso innato muy complejo determinado por un orden jerárquico muy definido en el que se sigue una secuencia cefalocaudal compuesta de las siguientes fases: lavado de patas delanteras, lavado de nariz, lavado de cabeza, lavado de cuerpo y lavado de patas traseras y cola²²². Típicamente se compondrá de movimientos encadenados, que seguirán de manera repetitiva y consistente la secuencia cefalocaudal. Una vez que la secuencia comienza, lo habitual es que el ratón la complete hasta el final. Estas secuencias comprenden entre el 10 y el 15% de los procesos totales de *grooming* del animal²²³.

El acicalamiento tiene para el ratón distintas funciones, entre las que podemos encontrar higienización, termorregulación o comunicación social. Alteraciones en el tiempo y en la frecuencia de *grooming* se utilizan como indicadores de ansiedad, estrés y apatía, y, más allá de estos parámetros globales, se ha visto que alteraciones en la secuencia cefalocaudal de grooming pueden relacionarse con patologías humanas en las que se vean afectadas las cadenas de control motor y las actividades motoras complejas, como es el caso de la SCA-3²²³.

Para estudiar el *grooming* (**Figura 16**), se pulveriza al ratón con agua destilada a temperatura ambiente y se le deja en un cilindro de metacrilato transparente de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura sin distractores alrededor. Se graba al animal durante 5 minutos y posteriormente se analiza el patrón de *grooming*.

Para evaluar correctamente los patrones de *grooming*, seguimos una escala estandarizada²²⁴ para representar la actividad de *grooming* específica. La escala se divide en las siguientes transiciones:

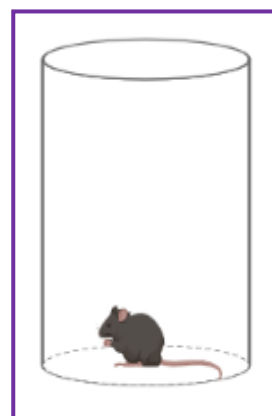


Figura 16. Test del cilindro

(0) no *grooming*, (1) lavado de patas delanteras, (2) lavado de nariz, (3) lavado de cabeza, (4) lavado de cuerpo, y (5) lavado de patas traseras y cola. Un episodio correcto sería aquel en el que el ratón realizase todas las transiciones partiendo de no hacer *grooming* (0) a lavarse las patas traseras y la cola (5), pasando en orden por todas las fases de la secuencia sin retroceder, hasta detenerse de nuevo (0-1-2-3-4-5-0). Una transición incorrecta sería, por ejemplo, que comenzase a lavarse la nariz directamente (0-2), o que de lavarse el cuerpo pasase a lavarse la cabeza (4-3). Un episodio de *grooming* se considera finalizado en el momento en el que el ratón pasa más de 6 segundos sin retomar el acicalamiento. Una vez que pasan esos 6 segundos, si el ratón vuelve a hacer *grooming* se considerará un episodio diferente. Se colocan todos estos datos en una matriz (**Tabla 7**) y se calculan las medidas de *grooming* generales (número de episodios de *grooming*, duración total de *grooming* y tiempo medio por episodio) y medidas de *grooming* microestructurales (transiciones totales, transiciones medias por episodio y porcentaje de transiciones incorrectas)^{225,226}.

Esta prueba se realizó una única vez antes del sacrificio a los animales, a 8 y a 16 semanas de edad, en el estudio de la progresión de la enfermedad. En el caso del experimento de los dobles mutantes, esta prueba se realizó una única vez a las 8 semanas de edad.

		Transición final					
Transición inicial		0	1	2	3	4	5
	0						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						

Tabla 7. Matriz en la que se recogen las transiciones de *grooming*. Las casillas sombreadas son las que corresponden a las transiciones correctas. Modificada de [²²⁴].

2.4 Técnicas histológicas

2.4.1 Preparación de muestras

Tras el sacrificio por decapitación, para las técnicas histológicas se destinó medio encéfalo en el caso del experimento de caracterización de GPR55 y ABHD12. Los encéfalos se mantuvieron durante 24 horas a 4°C en paraformaldehído al 4% en PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) para fijar los tejidos, para después crioprotegerlos embebiéndolos en sacarosa al 30% en PBS durante otras 24 horas a la misma temperatura. Por último, se congelaron en isopentano y se almacenaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Los hemisferios congelados se cortaron en secciones sagitales en un criostato (Leica CM 1900, Heerbrug, Suiza) a 30µm, después de embeberlos en Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe B.U., Países Bajos). Los cortes resultantes se almacenaron en solución anticongelante a -20°C hasta su uso.

2.4.2 Inmunohistoquímica

Se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con distintos anticuerpos para evaluar la expresión de determinadas proteínas en distintas áreas de interés para el estudio de la patología. Para ello, las secciones obtenidas previamente se montaron en portas gelatinizados y se dejaron atemperar un mínimo de una hora. A continuación, se rehidrataron a temperatura ambiente con tampón KPBS (del inglés *Phosphate-buffered saline containing potassium*) durante 15 minutos y se permeabilizaron con una solución de KPBS con 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) durante 20 minutos. Tras lavar durante 10 minutos con KPBS se bloqueó la peroxidasa endógena aplicando 30 minutos solución de bloqueo de peroxidasa (DakoCytomation) y, después de 15 minutos de lavados se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en KPBS con 0,2% de Triton X-100 y 2% de albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*) (Tabla 8). Tras esta incubación, las muestras se lavaron durante una hora con KPBS, y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-rabbit (1:300) (Vector Elite) durante 1 hora. El anticuerpo secundario se diluyó en la misma solución que el primario. A continuación, se hicieron lavados con KPBS durante 1 hora. Para conseguir el producto visible de la reacción se incubó con el complejo avidina-biotina (Vector Elite) durante 30 minutos y con diaminobencidina (DAB, sustrato y cromógeno, DakoCytomation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, se deshidrataron en pases sucesivos de etanol al 70%, al 96%, y al 100% de 5 minutos cada uno, terminando con un último pase en xilol de 5 minutos. Las preparaciones se montaron con un medio de montaje no

acuoso DPX (Fluka Analytical, Alemania) y se almacenaron hasta su posterior observación en el microscopio. Para asegurar la especificidad de los anticuerpos se llevaron a cabo controles negativos en los que se realizaron todas las incubaciones a excepción de la del anticuerpo primario.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
anti-ABHD12	Conejo	1:500	sc-85252	Santa Cruz Biotechnology, SC, EEUU
anti-GPR55	Conejo	1:200	ab203663	Abcam, Cambridge, UK

Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados para el estudio de la expresión proteica mediante técnicas de inmunohistoquímica por DAB.

Para la observación de las muestras y la posterior captura de imágenes se utilizó un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) y una cámara Leica DMC4500 acoplados al software Leica Application Suite v 4.12.0. Para el análisis del marcaje, se tomaron microfotografías de alta resolución adaptadas a las necesidades de cada área estudiada. El valor final para cada uno de los grupos es la media de los animales incluidos en el estudio. Los datos se expresan como porcentaje normalizado respecto al número medio de células de los casos control. El programa utilizado para el análisis de las imágenes fue el ImageJ v1.52.

2.5 Técnicas bioquímicas

2.5.1 Preparación de muestras

Para la caracterización de nuevas posibles dianas terapéuticas del SEC, tras el sacrificio de los animales y la posterior extracción del encéfalo, la mitad de este se diseccionó en distintas áreas, que fueron congeladas en hielo seco y almacenadas a -80°C hasta su posterior utilización. Las áreas obtenidas fueron estriado, hipocampo, cerebelo y tronco encefálico, entre otras.

2.5.2 Análisis de la expresión de genes mediante RT-PCR

Para la extracción de ARN de las áreas correspondientes, los tejidos se homogeneizaron en trizol (Tri-Reagent, Sigma), siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se añadieron 0,2mL de cloroformo, y se centrifugó durante 15 minutos a 13000 rpm y a 4°C, lo que permitió la separación en fases del ARN, ADN y proteínas. Se seleccionó la fase acuosa, en la que

se encontraba el ARN, y se almacenaron las otras dos para futuras aplicaciones. A esta fase acuosa se le añadieron 500µl de isopropanol para precipitar el ARN, y tras esperar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1mL de etanol 70% para lavar el ARN, y tras un último centrifugado durante 5 minutos a 9000 rpm y a 4°C se resuspendió en agua libre de RNAsas. El ARN obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro.

La transcripción inversa del ARN se llevó a cabo con el kit comercial QuantiTect Reverse Transcription (Quiagen, Limburgo, Países Bajos) a partir de 0,5µg de ARN. Para llevar a cabo esta técnica se requiere un primer paso en el que se elimina el ADN genómico, seguido de la reacción inversa de la transcriptasa. Todos los pasos se realizaron siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial.

La cuantificación de los genes correspondientes se hizo mediante una PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello se partió de 4µl de ADNc por duplicado, y se añadió 6,25 µl de la mezcla de reacción FastStart Taqman® Probe Master (Roche, Madrid, España), 0,75 µl de los primers y sondas específicas para cada gen (**Tabla 9**) (Applied Biosystems, Madrid, España), y 0,25 µl de agua ultrapura estéril libre de DNAsas. Se utilizaron placas multipocillo y la amplificación se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System siguiendo las recomendaciones del fabricante para este tipo de sondas.

Para evaluar la expresión génica se utilizó como gen de referencia el gen de la GAPDH (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) y en cada PCR se incluyeron los correspondientes controles negativos. La expresión de los distintos genes se calculó siguiendo el método de la segunda derivada y cuantificación relativa con corrección de eficiencias utilizando la versión 1.4 del programa informático Applied Biosystems Sequence Detection.

Gen	Proteína	Referencia Applied Biosystems
<i>abhd12</i>	ABHD12	Mm01333078_m1
<i>gapdh</i>	GAPDH	Mm_99999915_g1

Tabla 9. Sondas Taqman utilizadas en los estudios de expresión génica mediante PCR cuantitativa.

3 Análisis estadísticos

Para hacer comparaciones entre dos grupos independientes, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para las comparaciones entre más de dos grupos, se utilizó un análisis ANOVA de medidas repetidas seguido por la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples²²⁷. Para comparar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se utilizó el test de contraste de hipótesis de Log-Rank. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la versión 5.00 del programa informático GraphPad Prism. El análisis empleado, así como el tamaño muestral se especificarán en la leyenda de cada figura.

RESULTADOS

1 Diseño experimental 1. Búsqueda de nuevas potenciales dianas terapéuticas en el SEC en un modelo murino de SCA-3.

La SCA-3 es una enfermedad neurodegenerativa altamente compleja, caracterizada por el deterioro progresivo de los pacientes. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad no se hacen evidentes hasta alcanzar los estadios avanzados de la patología, cuando el grado de afectación es alto e irreversible. El que la sintomatología sea leve o poco apreciable en las primeras etapas de degeneración hace que sea difícil encontrar tratamientos eficaces que puedan detener o frenar el progreso de la enfermedad antes de alcanzar las etapas más avanzadas. En este sentido, la generación de modelos animales ha supuesto un gran avance, ya que permite aumentar los conocimientos respecto a la progresión de la enfermedad, así como los mecanismos implicados en la patología y las posibles dianas terapéuticas. En relación a la SCA-3, existen varios modelos de ratón que manifiestan la enfermedad²¹³. Sin embargo, ninguno de estos modelos refleja de manera completa la sintomatología que aparece en los pacientes.

Por otra parte, es habitual que las investigaciones biomédicas se centren en un único sexo, generalmente el masculino²²⁸, asumiendo que los resultados son extrapolables al otro sexo²⁰⁸. Sin embargo, muchas enfermedades neurodegenerativas afectan de manera distinta a hombres y a mujeres, por lo que es crítico tener en cuenta la influencia del sexo por su impacto y sus posibles implicaciones terapéuticas para la enfermedad²⁰⁹.

Aunque en el caso de la SCA-3 existen estudios en los que no se han visto diferencias en ciertos parámetros de la enfermedad, como la severidad de los síntomas atáxicos, en la calidad de vida percibida, en los síntomas depresivos^{10,229,230}, o en el número de repeticiones entre hombres y mujeres²³¹, algunos estudios han observado que el número de signos no atáxicos aumenta de manera más rápida en mujeres que en hombres²²⁹.

Por todo ello, en este diseño experimental hemos incluido como objetivo comprobar si en este modelo murino existen diferencias entre machos y hembras en la progresión de la enfermedad, tanto a nivel motor como a nivel cognitivo y emocional.

Otro de los objetivos de la presente investigación ha sido el estudio de nuevas dianas terapéuticas dentro del SEC que no han sido estudiadas en relación a esta enfermedad hasta la fecha. Por ello nos hemos entrado en el estudio de la expresión de una enzima de degradación de cannabinoides, la ABHD12, y de un posible receptor para cannabinoides, GPR55, en varias áreas afectadas en la enfermedad.

1.1 Evaluación del progreso de la enfermedad en un modelo murino de SCA-3.

1.1.1 Estado de salud

En las primeras observaciones sobre el estado de salud de los ratones, a las 8 semanas de edad, los ratones transgénicos (TG) eran físicamente indistinguibles de los ratones *wild type* (WT), ya que únicamente presentaban ligeras diferencias estadísticamente significativas en el peso, tanto en el caso de las hembras como de los machos, siendo menor en los animales SCA-3. En el caso de las hembras, la ganancia de peso fue similar para ambos grupos hasta las 16 semanas de edad. A partir de este momento, las hembras WT seguían ganando peso, mientras que el peso de las hembras SCA-3 se estabilizó (**Figura 17 A**). El peso de los machos SCA-3, sin embargo, se mantiene constante desde las 8 semanas de edad, mientras que los machos control presentan un incremento de peso (**Figura 17 B**).

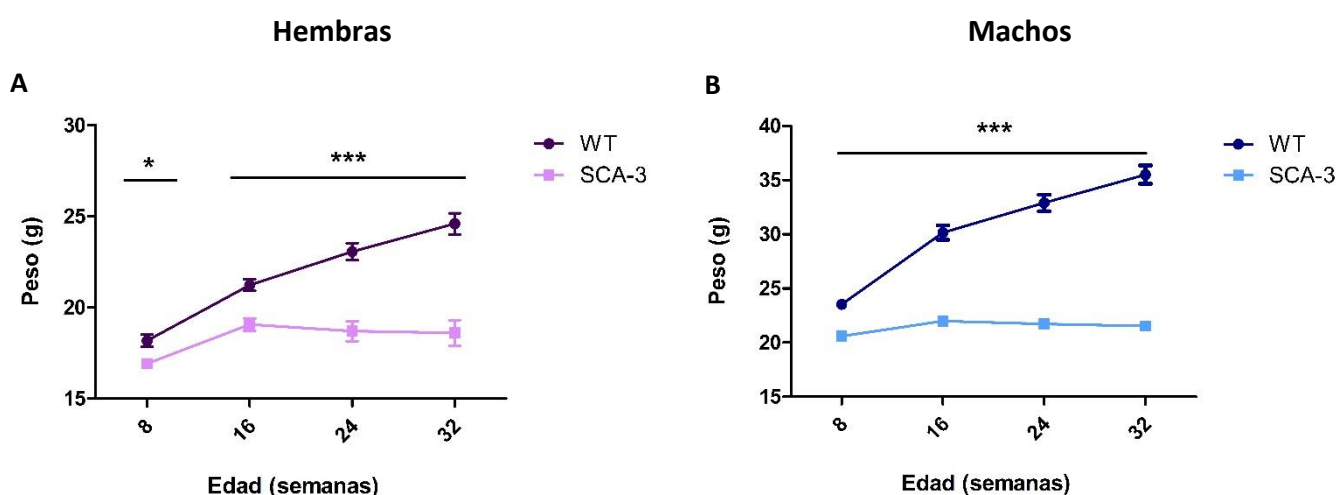


Figura 17. Evaluación del peso de los ratones hembra (A) y los ratones macho (B). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (* $p<0,05$ vs WT; *** $p<0,001$ vs WT).

A las 16 semanas, además de la pérdida de peso observada, los ratones transgénicos, comienzan a presentar temblores. A partir de esa edad los animales transgénicos, tanto machos como hembras, comenzaban también a mostrar el reflejo de *clasp* característico en modelos animales de ciertas enfermedades neurodegenerativas. Este reflejo se ha relacionado con la distonía típica de los pacientes con SCA-3²³². En el caso de las hembras SCA-3, observamos una estabilización en la escala de distonía a partir de la semana 16 (**Figura 18 A**), mientras que en el

caso de los machos SCA-3 el grado de distonía aumenta a medida que progresa la enfermedad (Figura 18 B).

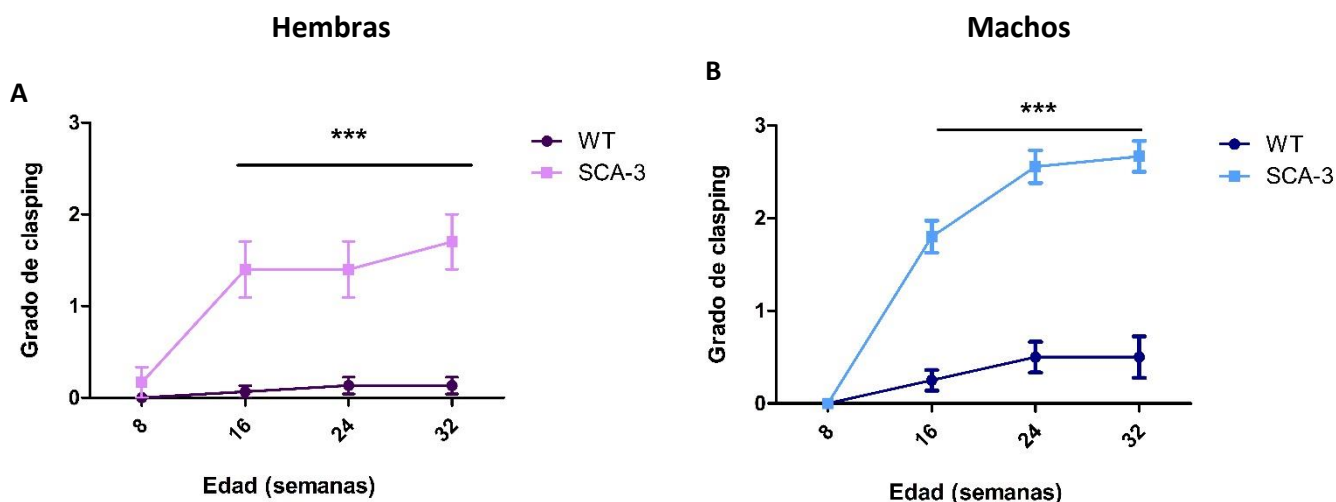


Figura 18. Evaluación del grado de distonía de los ratones hembra (A) y los ratones macho (B) mediante la medición del grado de *clapping*. Los datos se expresan como media ± SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (**p<0,001 vs WT).

A las 32 semanas de edad, tanto hembras como machos SCA-3 no se acicalaban tanto como sus compañeros controles, por lo que su pelaje aparecía más desordenado, y presentaban una postura anormal en reposo, ya que los animales permanecían sobre su abdomen extendiendo ligeramente las patas delanteras y traseras. Además, a esa edad los animales SCA-3 presentaban cifosis, que es una alteración en la curvatura de la columna vertebral, en la región dorsal (Figura 19), y que aparece en otros modelos de SCA-3²¹³.

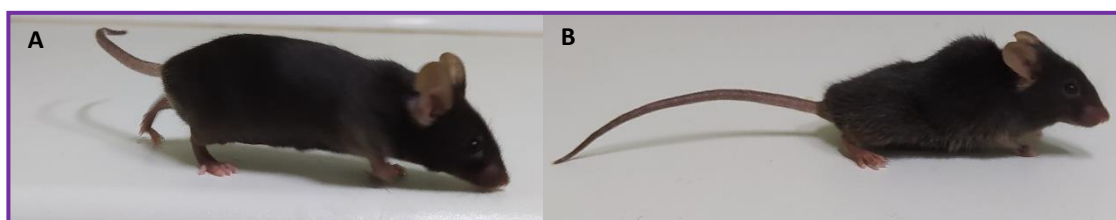


Figura 19. Imagen representativa de un ratón WT (A), y un ratón SCA-3 (B), a las 32 semanas de edad, donde se puede apreciar la postura anormal en reposo y la cifosis de los animales SCA-3.

La supervivencia de los ratones SCA-3 se comparó con la supervivencia de los ratones control mediante una curva de Kaplan-Meier. En el caso de las hembras (Figura 20 A), los animales SCA-3 presentan un incremento de mortalidad escalonado que comienza a las 36 semanas hasta llegar a un valor máximo de supervivencia de 52 semanas. En el caso de los

machos TG (**Figura 20 B**) se observa un adelantamiento de dicha mortalidad, que comienza a las 32 semanas de edad, así como un descenso más abrupto de la supervivencia, siendo el máximo de supervivencia de 51 semanas.

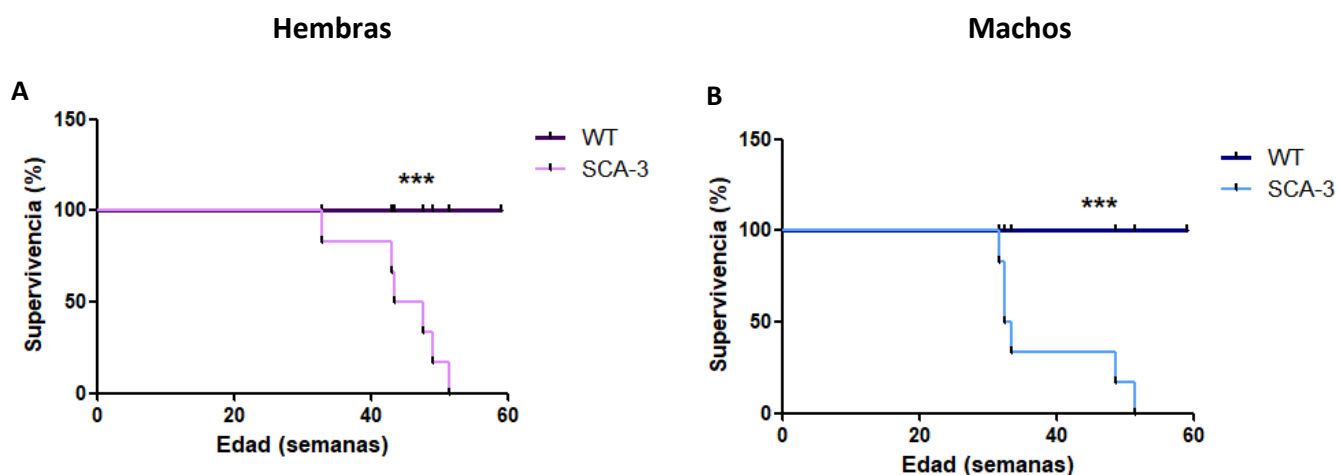


Figura 20. Supervivencia de los animales SCA-3. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones hembra (A) y de los ratones macho (B). Los datos se analizaron mediante el test estadístico de Log-Rank (6 animales por grupo) (***) $p < 0,001$ vs WT).

1.1.2 Evaluación neuroconductual

En este modelo de SCA-3 se observaron alteraciones en la fuerza muscular y en la coordinación motora. Además, también se encontraron alteradas otras funciones como el aprendizaje motor, control motor jerárquico, memoria y aprendizaje espacial, y niveles de estrés y ansiedad.

Fuerza muscular

Mediante la prueba de *hanging wire* se observa que, a partir de las 8 semanas de edad, tanto machos como hembras transgénicos tienen menor fuerza muscular que los ratones control. En el caso de las hembras SCA-3 (**Figura 21 A**), se observa una estabilización en el deterioro de la fuerza muscular a partir de las 16 semanas, mientras que en el caso de los machos TG (**Figura 21 B**) se observa un empeoramiento progresivo, de manera que a las 32 semanas de edad ya no eran capaces de llevar a cabo esta prueba.

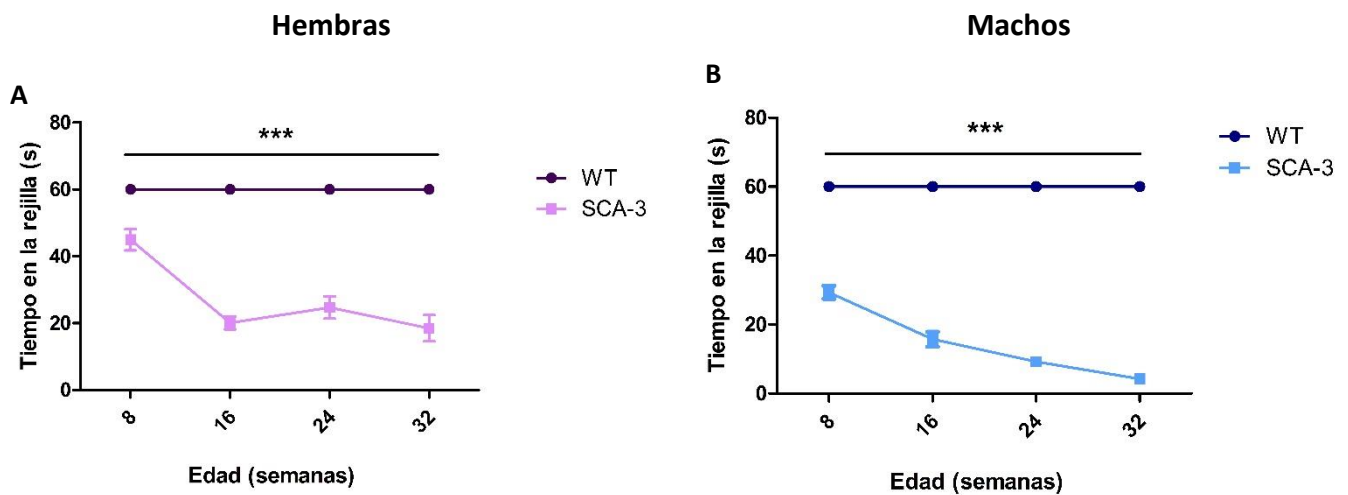


Figura 21. Análisis de la fuerza muscular de los ratones hembra (A) y los ratones macho (B) mediante la prueba de *Hanging Wire*. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (** $p < 0,001$ vs WT).

Coordinación motora

A partir de las 16 semanas, tanto los machos como las hembras SCA-3 comienzan a manifestar problemas en la coordinación motora, lo que se ve reflejado en una disminución en el tiempo de permanencia en el *rotarod*. De nuevo, en el caso de los machos se observa un empeoramiento más pronunciado (Figura 22 B), y, a diferencia de las hembras (Figura 22 A), a las 24 semanas apenas pueden mantenerse en el rotarod, siendo incapaces de realizar esta prueba a las 32 semanas de edad.

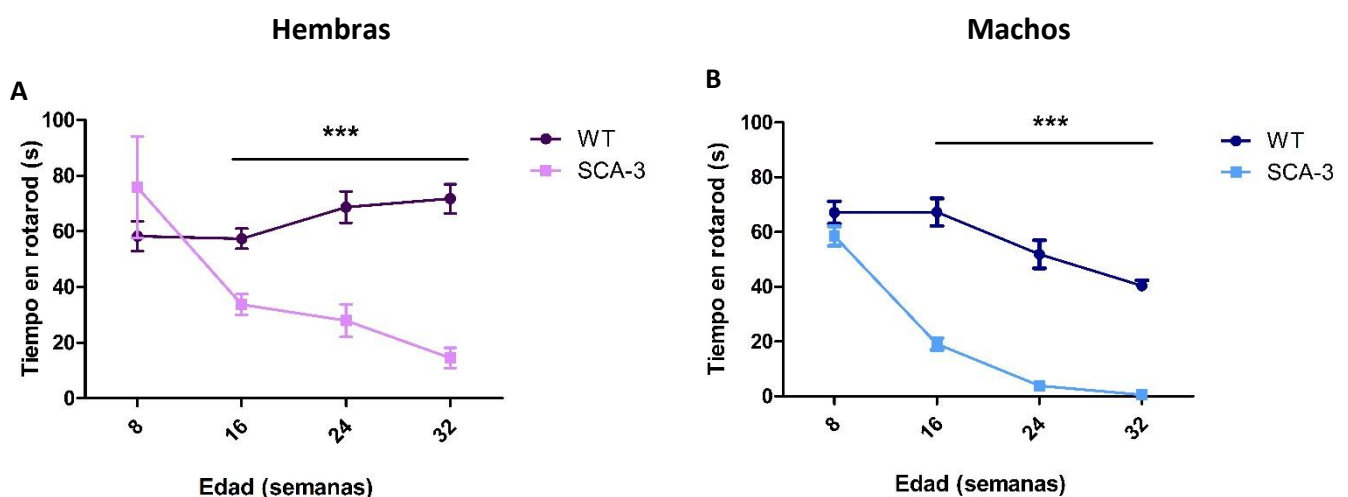


Figura 22. Estudio de la coordinación motora de los ratones hembra (A) y los ratones macho (B) mediante la prueba del *rotarod*. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (** $p < 0,001$ vs WT).

Control motor jerárquico

El *grooming* es un proceso que está determinado por un orden jerárquico muy definido en el que se sigue una secuencia cefalocaudal altamente estructurada, lo que se conoce como microestructura del *grooming*. El estudio de esta microestructura (transiciones totales, transiciones medias por episodio y porcentaje de transiciones incorrectas) puede dar información sobre posibles alteraciones en el control motor jerárquico^{225,226}. Alteraciones a la hora de realizar correctamente las transiciones de la secuencia de grooming se han relacionado con déficits a nivel de control motor jerárquico, ya que es una secuencia altamente estructurada y controlada. Estos parámetros se midieron a las 8 y a las 16 semanas, tanto en hembras como en machos. A las 32 semanas de edad los ratones transgénicos presentaban una actividad de este tipo demasiado disminuida como para evaluar esta conducta.

De todos los parámetros medidos, en el caso de las hembras no hemos encontrado diferencias significativas entre las hembras SCA-3 y las WT ni en el número total de transiciones (**Figura 23 A**) ni en el número de transiciones medias por episodio (**Figura 23 E**), pero sí que aparece un aumento en el porcentaje de transiciones incorrectas en las hembras SCA-3 respecto a las WT a 16 semanas (**Figura 23 C**). Respecto a los machos, tampoco se ven diferencias significativas entre el número de transiciones totales (**Figura 23 B**), pero sí que aparece una disminución significativa en el número de transiciones por episodio en los ratones SCA-3 respecto a los WT a 16 semanas (**Figura 23 F**). Además, a 16 semanas también se observa un mayor porcentaje de transiciones incorrectas en los ratones SCA-3 respecto a los WT (**Figura 23 D**).

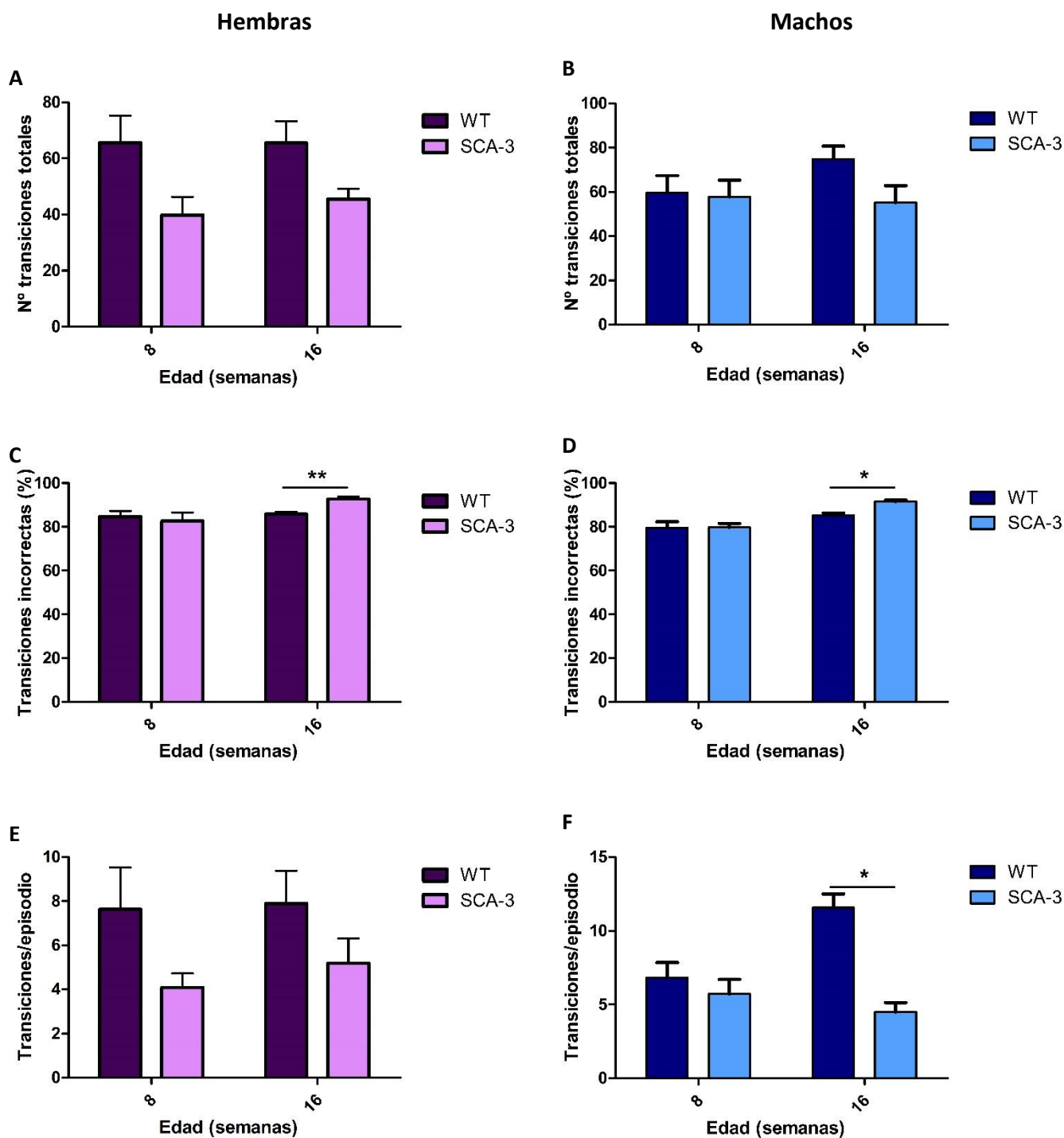


Figura 23. Estudio del control motor jerárquico mediante el análisis del *grooming*. Número de transiciones totales de los ratones hembra (A) y de los ratones macho (B). Porcentaje de transiciones incorrectas en hembras (C) y machos (D). Transiciones medias por episodio de *grooming* de hembras (E) y machos (F). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney seguida de un post-hoc Bonferroni (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs WT).

Aprendizaje motor

Cambios en el protocolo de la prueba del rotarod nos ha permitido evaluar el aprendizaje motor minimizando la influencia de otros factores como la destreza basal asociada a la coordinación y a la postura²¹⁷. Esta prueba se llevó a cabo a las 8 y a las 16 semanas, ya que a las 32 semanas presentaban un nivel de alteración motora que les incapacitaba para realizar esta prueba. En el caso de los ratones macho SCA-3, aparecen déficits en el aprendizaje motor desde etapas tempranas de la enfermedad, puesto que los animales SCA-3 presentan una curva de aprendizaje más aplanada y aparecen diferencias estadísticamente significativas entre grupos a 8 semanas (**Figura 24 B**) y a 16 semanas (**Figura 24 D**) y en el efecto del aprendizaje entre WT y SCA-3. Esto se ve reflejado también en el déficit que aparece en los ratones SCA-3 a ambas edades en el ratio de aprendizaje respecto a sus controles a las dos edades estudiadas (**Figura 24 F**). En hembras, los déficits en el aprendizaje motor no aparecen hasta las 16 semanas. A las 8 semanas de edad (**Figura 24 A**), no aparecen diferencias significativas entre grupos ni se observa un efecto significativo del aprendizaje motor a lo largo de los días de la prueba. Tampoco aparecen diferencias entre grupos al estudiar el ratio de aprendizaje a esa edad (**Figura 24 E**). A las 16 semanas, sin embargo, sí que aparecen déficits en el aprendizaje motor, reflejados tanto en la curva de aprendizaje como en el ratio de aprendizaje (**Figura 24 C y E**).

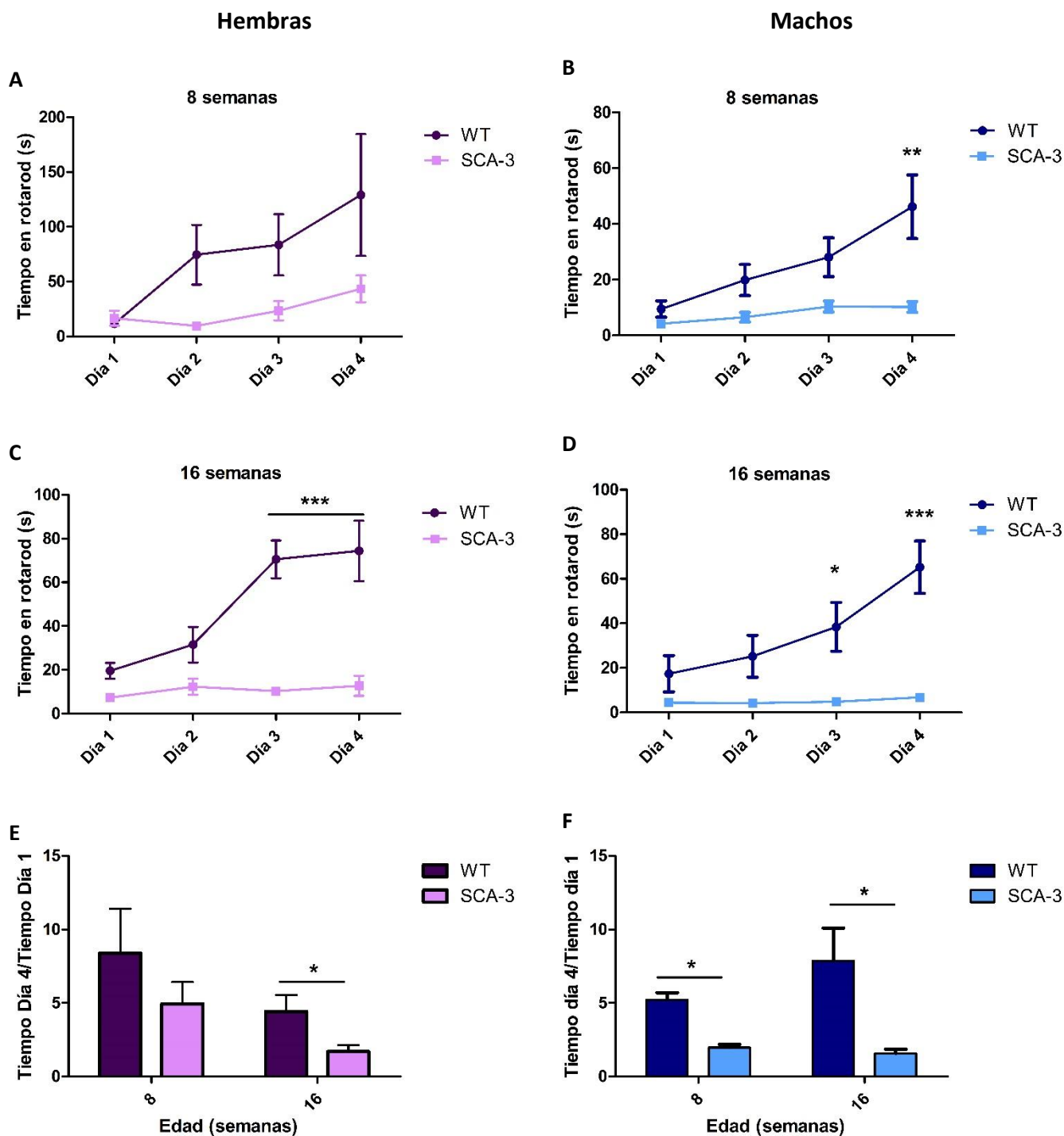


Figura 24. Estudio del aprendizaje motor mediante el rotarod modificado de aprendizaje. Curvas de aprendizaje de los ratones hembra de 8 (A) y 16 (C) semanas de edad, y de los de los ratones macho de 8 (B) y 16 (D) semanas de edad. Relación entre el tiempo de latencia del día 4 vs día 1 de los ratones hembra (E) y los ratones macho (F). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue una ANOVA de dos vías seguido de un post-hoc Bonferroni o un test no paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs WT).

Aprendizaje y memoria espacial

El laberinto acuático de Morris es una de las pruebas más utilizadas para evaluar la memoria y el aprendizaje espacial. En este caso, a las 16 semanas de edad, tanto las hembras como los machos SCA-3 presentan una disminución de su capacidad de memoria y de aprendizaje espacial respecto a los controles. Dentro de los distintos parámetros analizados no aparecen diferencias significativas entre ratones transgénicos y ratones control en la curva de aprendizaje (**Figura 25 A y B**), pero sí que se observan alteraciones en el ratio de aprendizaje entre el último y el primer día del entrenamiento (**Figura 25 C y D**). Además, también presentan diferencias en los parámetros medidos el día que se retira la plataforma 24 horas después del último entrenamiento (**Figura 25 E y F**), observándose un aumento significativo en el tiempo que tardan en llegar al lugar donde ésta se encontraba durante el entrenamiento, así como en el número de veces que la cruzarían (**Figura 25 G y H**), en los animales SCA-3 respecto a los animales *wild type*. Cabe destacar que no se encontraron diferencias en la velocidad media de natación entre los ratones control y los ratones transgénicos (datos no mostrados), lo que demuestra que las diferencias encontradas no se deben a déficits motores en los ratones SCA-3.

Ansiedad, estrés y apatía

El *grooming* es un proceso innato muy complejo con diversas funciones biológicas. Las alteraciones en distintos parámetros del *grooming* (número de episodios de *grooming*, duración total de *grooming* y tiempo medio por episodio) se han relacionado con aspectos emocionales de estrés, ansiedad y apatía^{225,226}. Estos parámetros se midieron a las 8 y a las 16 semanas, tanto en hembras como en machos. No se midieron a las 32 semanas porque esta conducta se veía muy disminuida a esa edad.

En hembras no se observaron diferencias significativas entre el grupo WT y el grupo SCA-3 ni a 8 ni a 16 semanas, tanto al medir el número de episodios que inician (**Figura 26 A**) como el tiempo total que pasan haciendo *grooming* (**Figura 26 C**) o la duración media de cada episodio (**Figura 26 E**). Por el contrario, en los machos sí que vemos cómo a 16 semanas aparecen diferencias significativas entre SCA-3 y WT en todos los parámetros estudiados. Los ratones SCA-3 macho hacen *grooming* durante menos tiempo que los ratones WT (**Figura 26 D**), lo que algunos estudios relacionan con un mayor grado de apatía^{233–235}, e inician un mayor número de episodios (**Figura 26 B**), por lo que cada episodio de *grooming* es más corto (**Figura 26 F**), lo que se ha relacionado con mayores niveles de estrés y ansiedad^{236–238}.

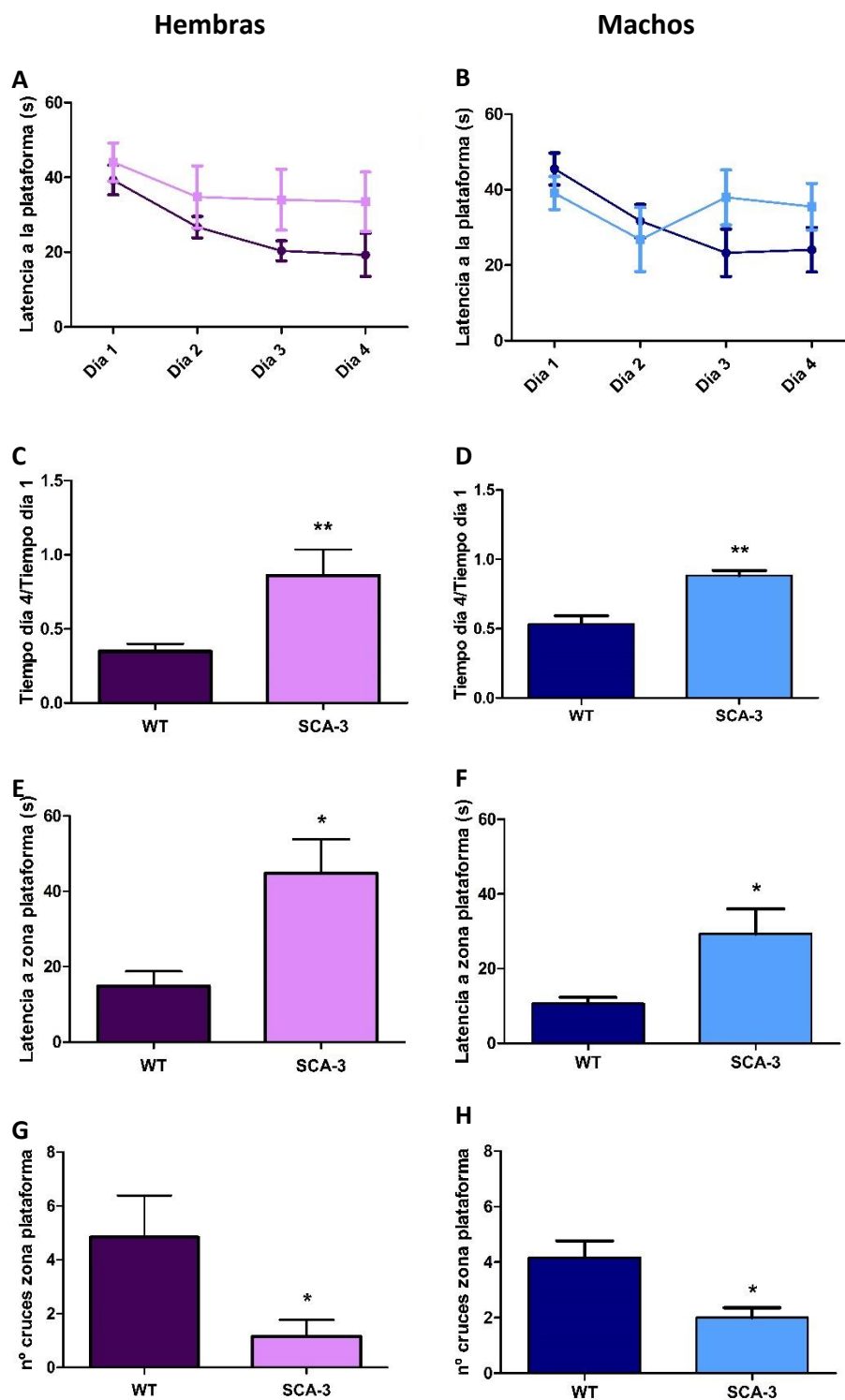


Figura 25. Estudio del aprendizaje y memoria espacial mediante la prueba del laberinto acuático de Morris. Curvas de aprendizaje de los ratones hembra (A) y de los de los ratones macho (B) de 16 semanas de edad. Relación entre el tiempo de latencia del día 4 vs día 1 de los ratones hembra (C) y los ratones macho (D). Latencia a la zona en la que se encontraba la plataforma de hembras (E) y machos (F). Número de veces que el animal cruza la zona en la que se encontraba la plataforma, tanto hembras (G) como machos (H). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue una ANOVA de dos vías seguido de un post-hoc Bonferroni o un test no paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

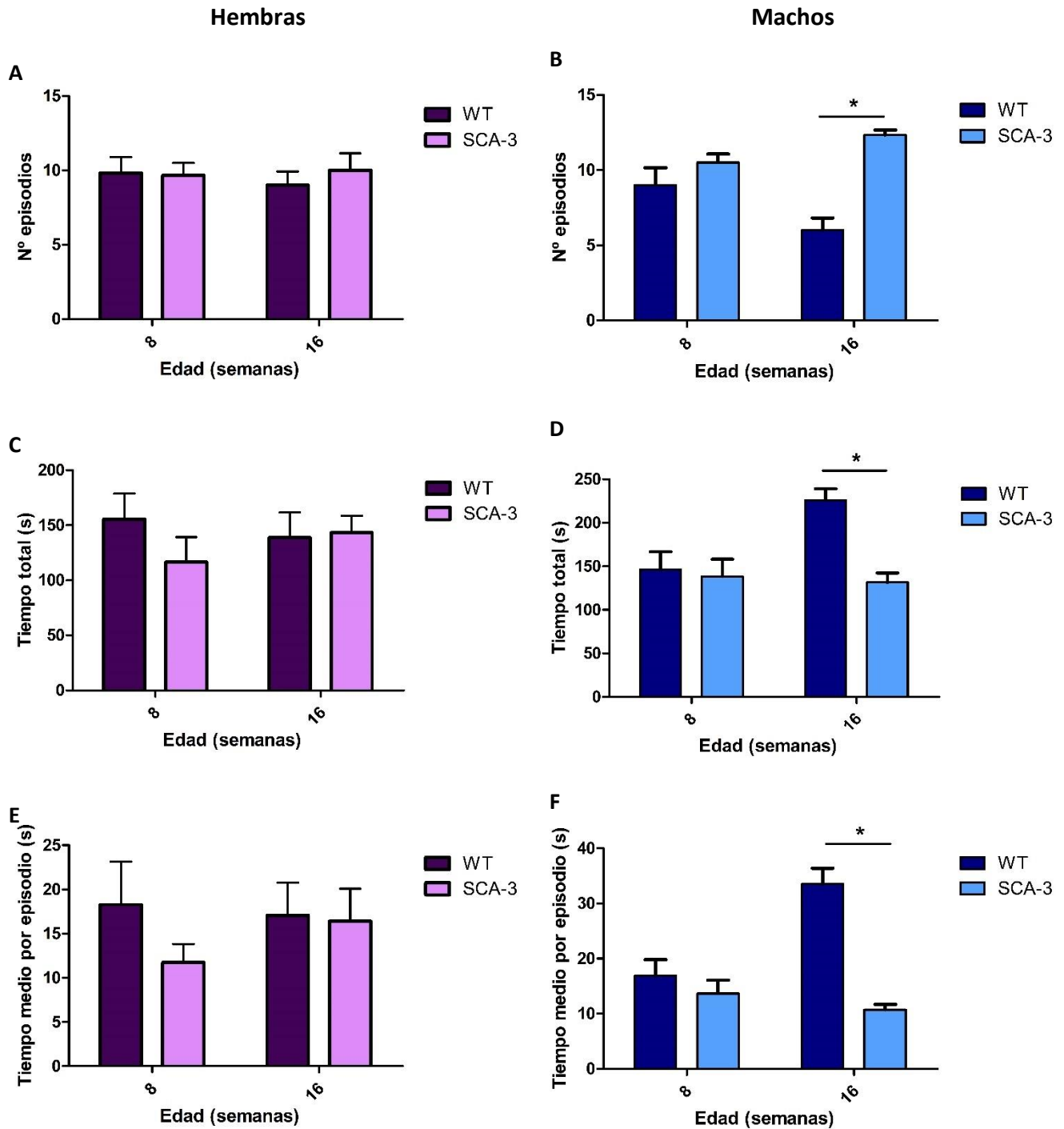


Figura 26. Estudio de parámetros emocionales mediante el análisis del *grooming*. Número de episodios de *grooming* de los ratones hembra (A) y de los ratones macho (B). Tiempo total de *grooming* de hembras (C) y machos (D). Tiempo medio por episodio de *grooming* de hembras (E) y machos (F). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (6 animales por grupo) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ vs WT).

1.2 Estudio de la expresión de elementos del SEC en un modelo murino de SCA-3

Una vez caracterizada la progresión de la enfermedad en nuestro modelo de 150 repeticiones, hemos querido estudiar los posibles cambios que se puedan dar en determinados elementos del SEC a lo largo de la enfermedad, para tratar de determinar su contribución a la patogénesis, y también para la identificación de posibles dianas para tratamientos neuroprotectores. Concretamente, nos centramos en el estudio de la enzima de degradación de cannabinoides ABHD12, que como ya hemos comentado anteriormente está implicada en la patogénesis de una enfermedad llamada PHARC¹⁷⁰, cuyo principal síntoma es la ataxia; y en un posible receptor cannabinoide, GPR55, puesto que se ha visto que puede estar implicado en los procesos de coordinación motora, aprendizaje motor, memoria procedimental y estrés y ansiedad^{143,145,146}.

1.2.1 ABHD12

Cerebelo

El cerebelo es una de las estructuras en las que existe expresión de la enzima de degradación ABHD12²³⁹. En nuestros estudios hemos observado expresión de esta enzima en núcleo dentado, en sustancia blanca, y en la corteza cerebelosa, especialmente en las capas granular y molecular (**Figura 27**).

En el núcleo dentado pudimos comprobar cómo en la primera etapa de la enfermedad la expresión de ABHD12 es menor en los animales transgénicos respecto a los animales WT, tanto en el caso de los machos como en el caso de las hembras. Sin embargo, a partir de las 16 semanas no hay diferencias en la expresión entre los animales SCA-3 y sus controles, aunque se observa una tendencia a disminuir en las hembras SCA-3 que no resulta estadísticamente significativa (**Figura 28**).

En la sustancia blanca del cerebelo encontramos un aumento en la expresión de esta enzima en los machos SCA-3 de 8 semanas de edad respecto a sus controles. No aparecen alteraciones de la expresión de ABHD12 en el resto de las edades estudiadas ni en las hembras (**Figura 29**).

En la corteza cerebelosa, el marcaje de la enzima ABHD12 se observó principalmente en la capa granular (**Figura 30**) y en la capa molecular (**Figura 31**), donde no se vieron diferencias

significativas entre los animales WT y los animales SCA-3, ni en machos ni en hembras, a ninguna de las edades estudiadas.

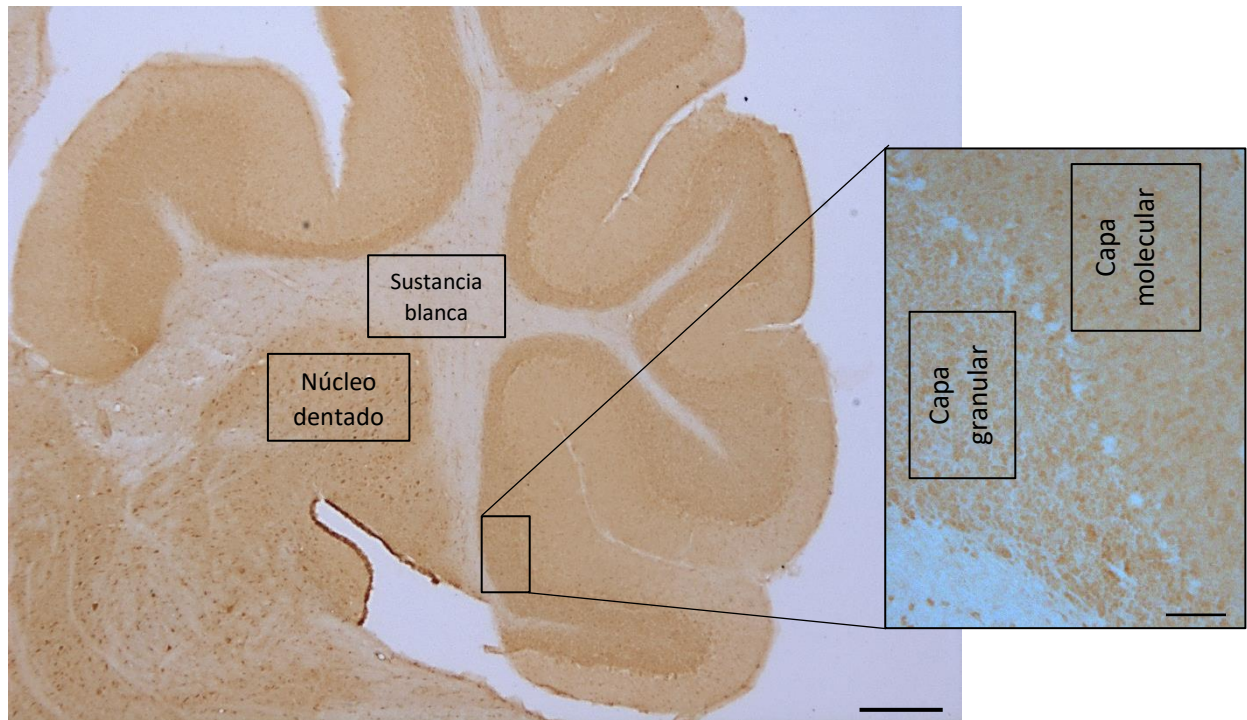


Figura 27. Inmunohistoquímica de ABHD12 en cerebelo en la que se muestran las distintas regiones estudiadas: sustancia blanca del cerebelo, núcleo dentado, capa granular y capa molecular, utilizando como referencia el *Allen Brain Atlas*. Escala de la barra: 200µm; barra en detalle: 100µm.

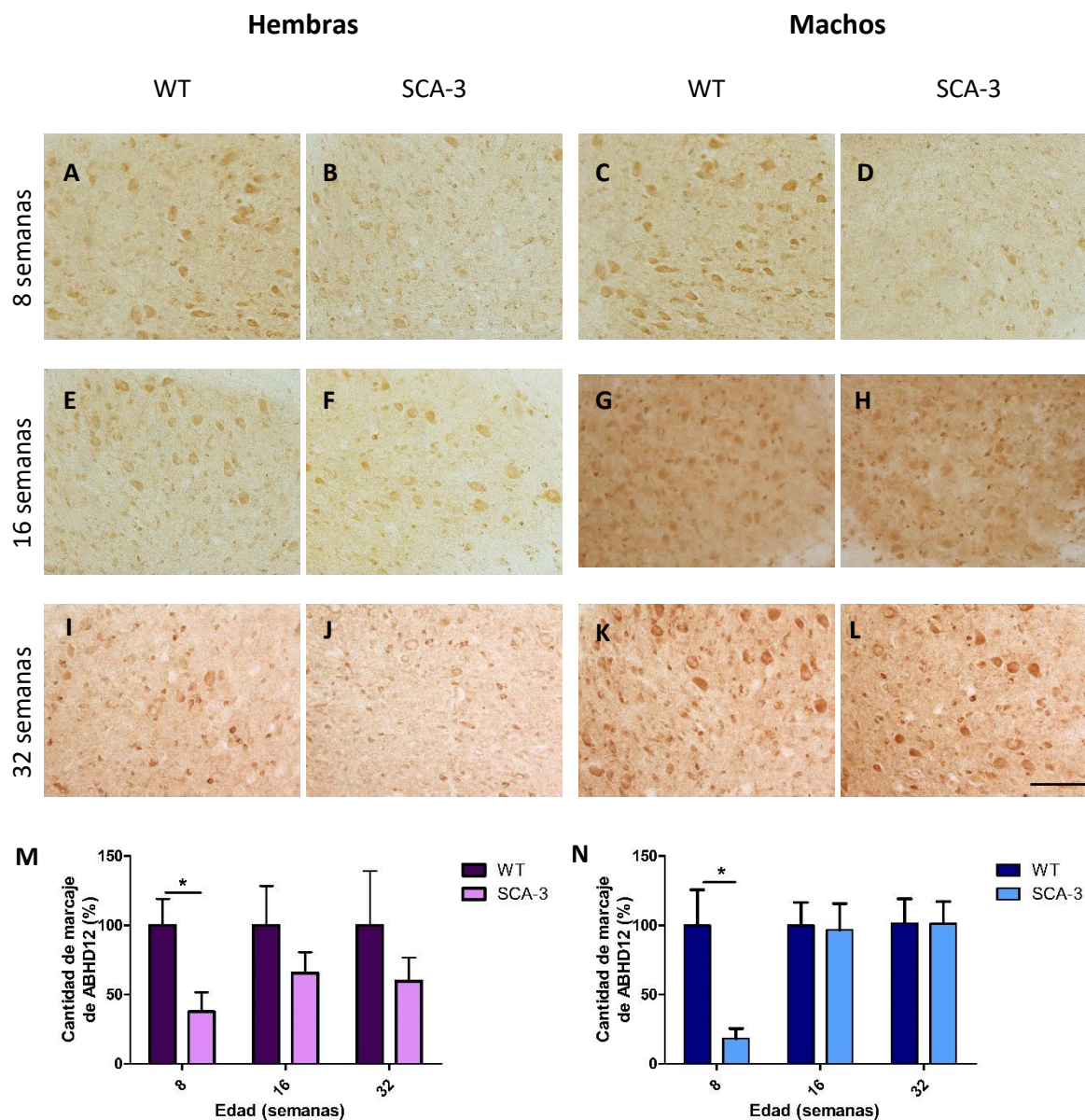
Núcleo dentado

Figura 28. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en el núcleo dentado del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (*p<0,05 vs WT). Escala de la barra: 50 μ m.

Sustancia blanca del cerebelo

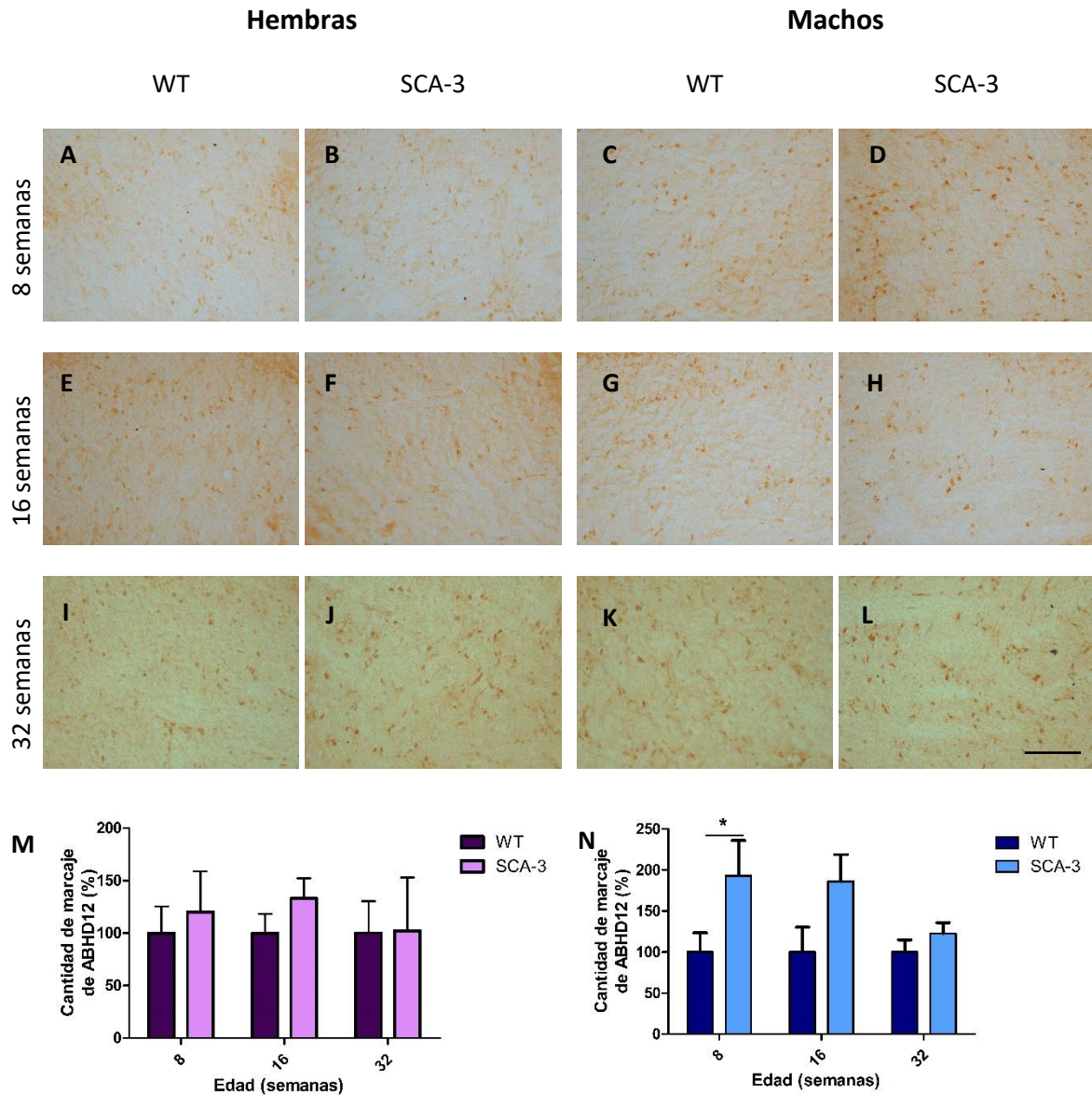


Figura 29. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la sustancia blanca del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (*p<0,05 vs WT). Escala de la barra: 50 μ m.

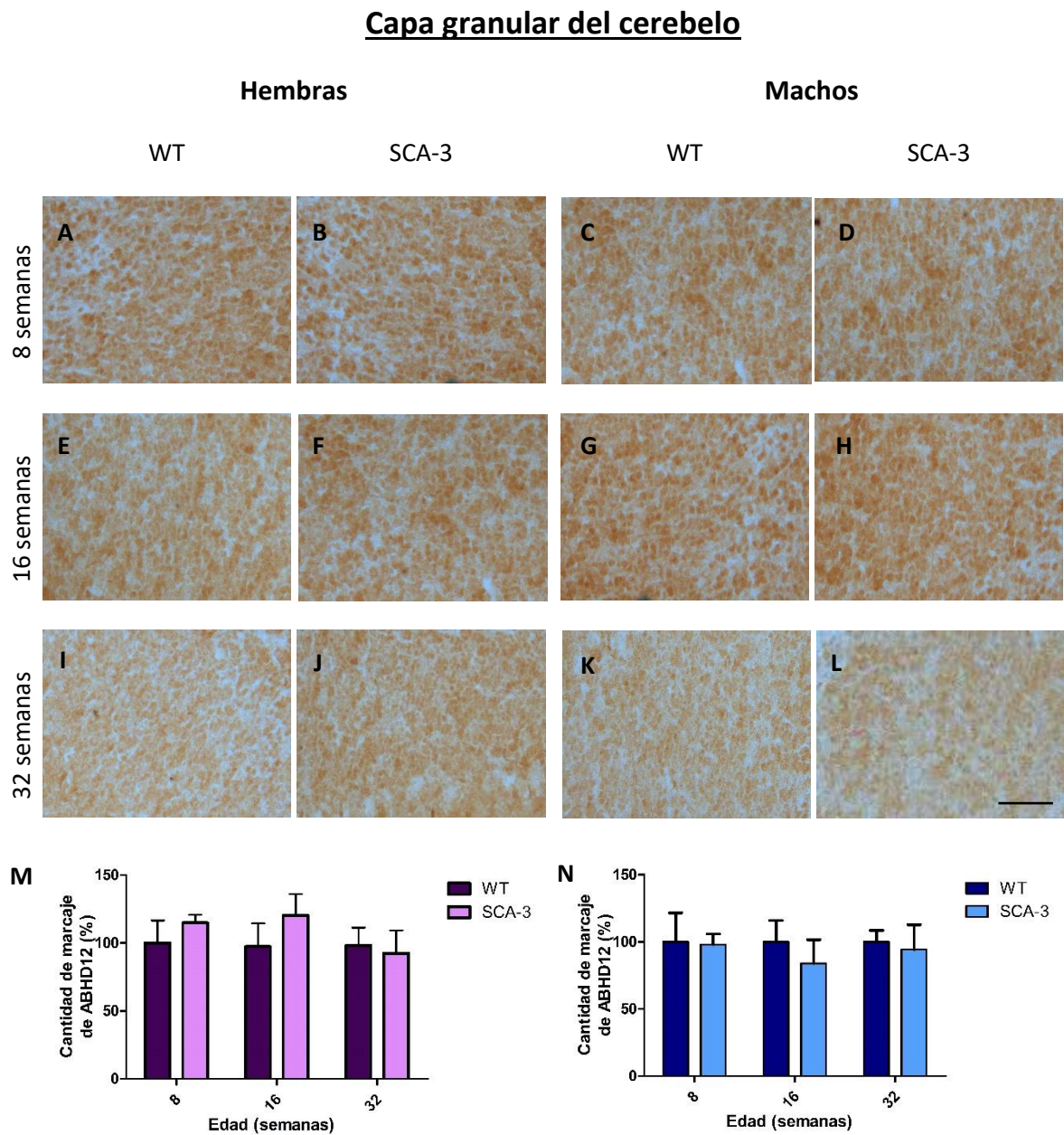


Figura 30. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la capa granular del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m.

Capa molecular del cerebello

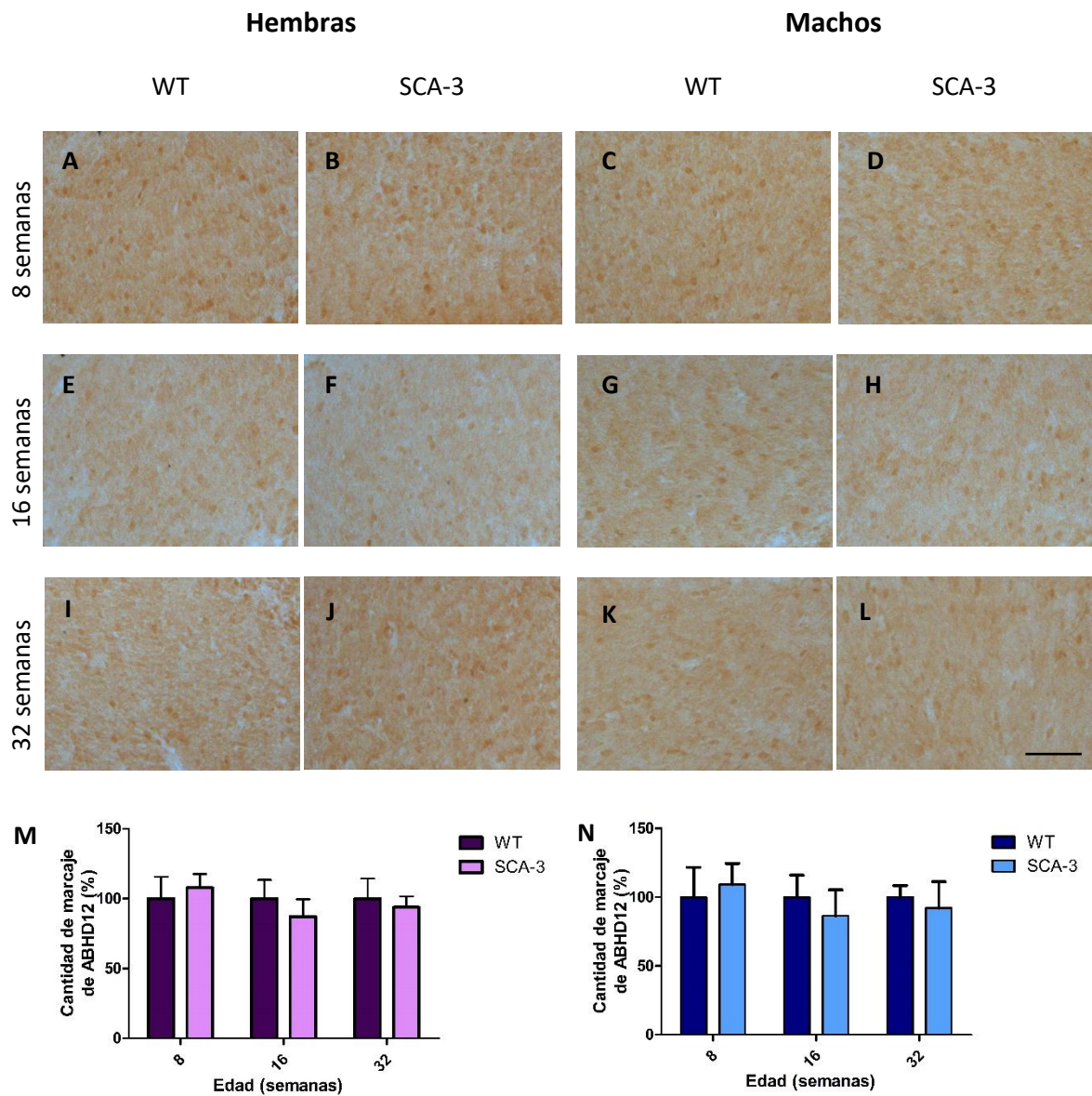


Figura 31. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la capa molecular del cerebello en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

Tronco encefálico

El tronco encefálico es otra de las estructuras del sistema nervioso central en las que se ha encontrado expresión de ABHD12¹⁵. En este estudio hemos querido centrar el análisis de la expresión de esta enzima en el núcleo pontino (**Figura 32**), puesto que como se ha comentado en el apartado de introducción es una de las áreas que más afectadas se encuentran en la SCA-3.

En las hembras SCA-3 se observa una menor expresión de la enzima ABHD12 en comparación con sus controles en etapas tempranas e intermedias de la enfermedad. Sin embargo, a las 32 semanas no se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la enzima entre las hembras SCA-3 y las hembras WT, aunque se observa una cierta tendencia. En el caso de los machos, se ve una disminución en la expresión de esta enzima en los animales SCA-3 respecto a sus controles a las 8 semanas de edad. A 16 y a 32 semanas de edad no aparecen diferencias significativas, pero también se aprecia esa tendencia a una menor expresión de ABHD12 en los animales SCA-3 respecto a los WT (**Figura 33**).

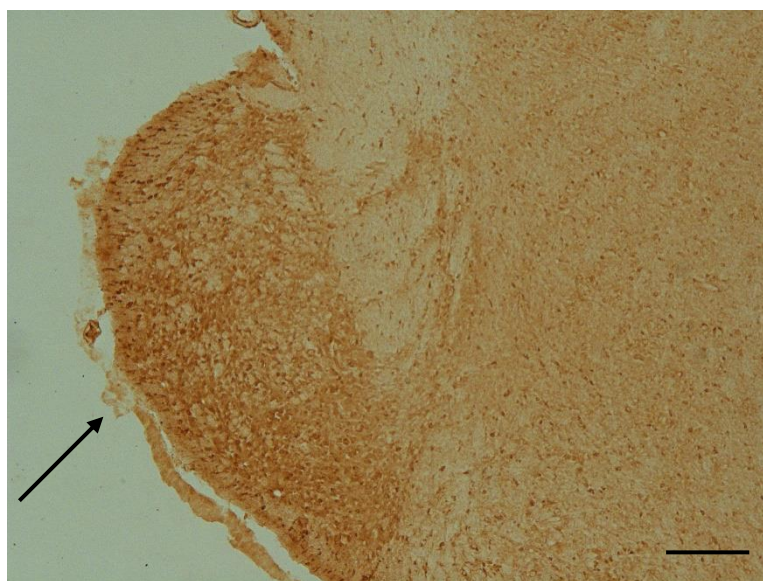


Figura 32. Inmunohistoquímica de ABHD12 del núcleo pontino del tronco encefálico, utilizando como referencia el *Allen Brain Atlas*. Escala de la barra: 200µm

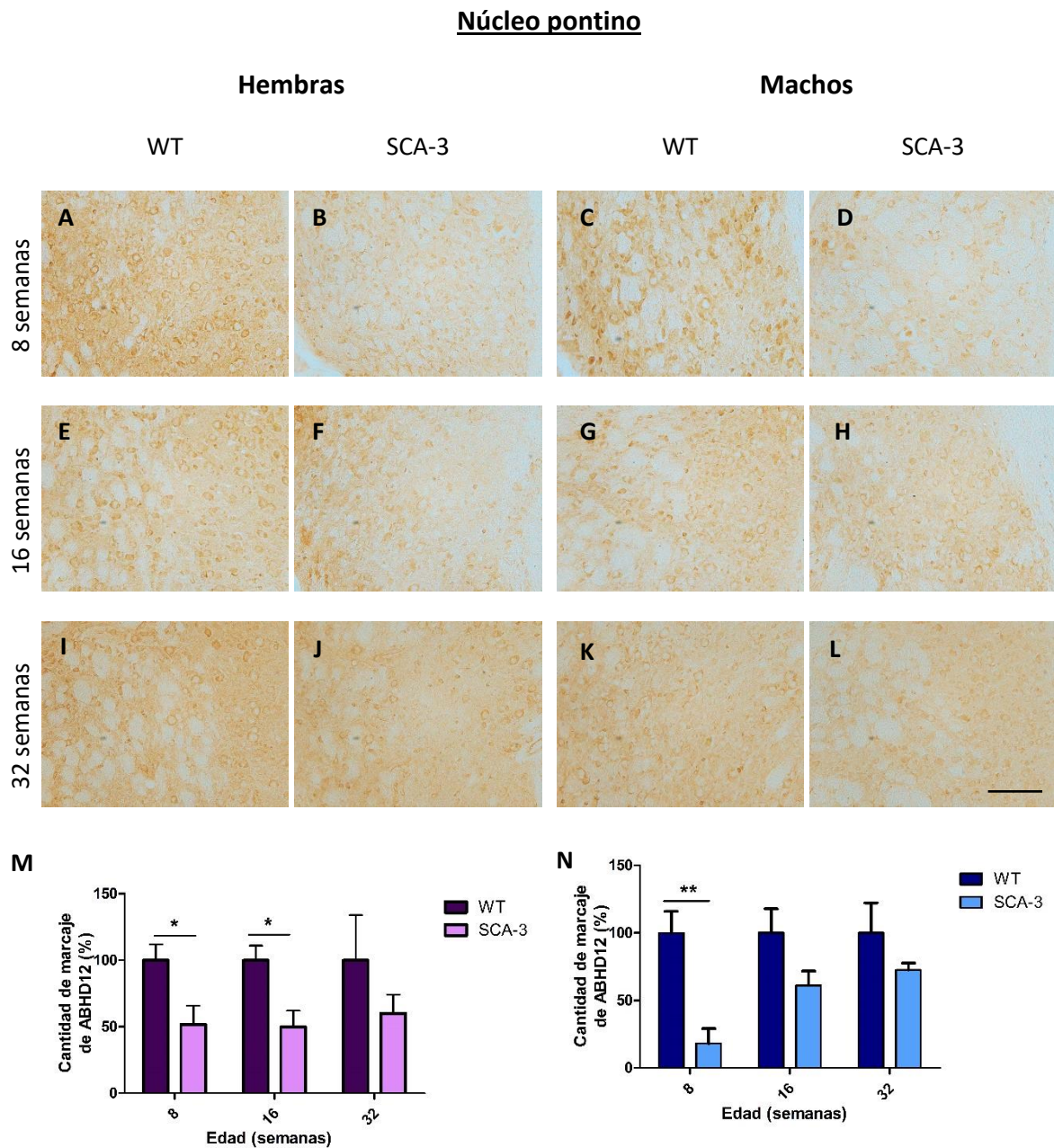


Figura 33. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en el núcleo pontino del tronco encefálico en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (*p<0,05 vs WT; **p<0,01). Escala de la barra: 50 μ m.

Formación hipocampal

En la formación hipocampal encontramos marcaje de ABHD12 en la capa piramidal de las regiones CA1, CA2 y CA3, y en la capa polimórfica del giro dentado (**Figura 34**). En la capa piramidal de la región CA1 (**Figura 35**) se observó un aumento en la expresión de ABHD12 en los machos SCA-3 de 16 semanas de edad respecto a sus controles, siendo este el único grupo en el que se encontraron diferencias significativas en este área. En el caso de las regiones CA2 (**Figura 36**), y CA3 (**Figura 37**), así como en el giro dentado (**Figura 38**), no se encontraron cambios en la expresión de esta enzima entre los animales macho SCA-3 y sus controles en ninguna de las edades escogidas para el estudio. En el caso de las hembras, no se observaron alteraciones en la expresión de ABHD12 entre TG y WT en la formación hipocampal a ninguna de las edades estudiadas.

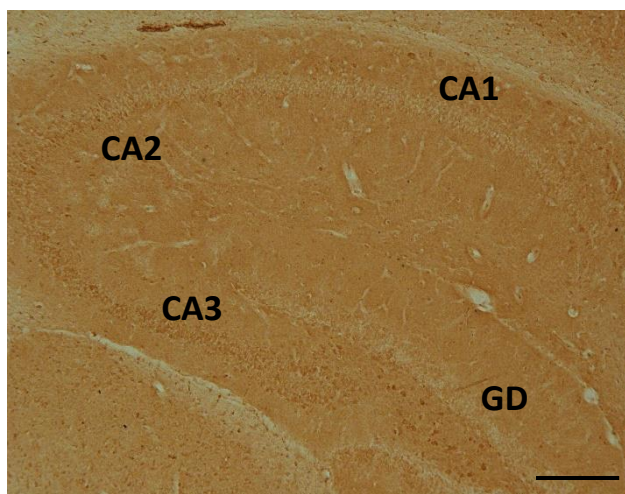


Figura 34. Inmunohistoquímica de ABHD12 en la formación hipocampal en la que se muestran las distintas regiones estudiadas: CA1, CA2 y CA3, y giro dentado (GD), utilizando como referencia el *Allen Brain Atlas*. Escala de la barra: 200µm.

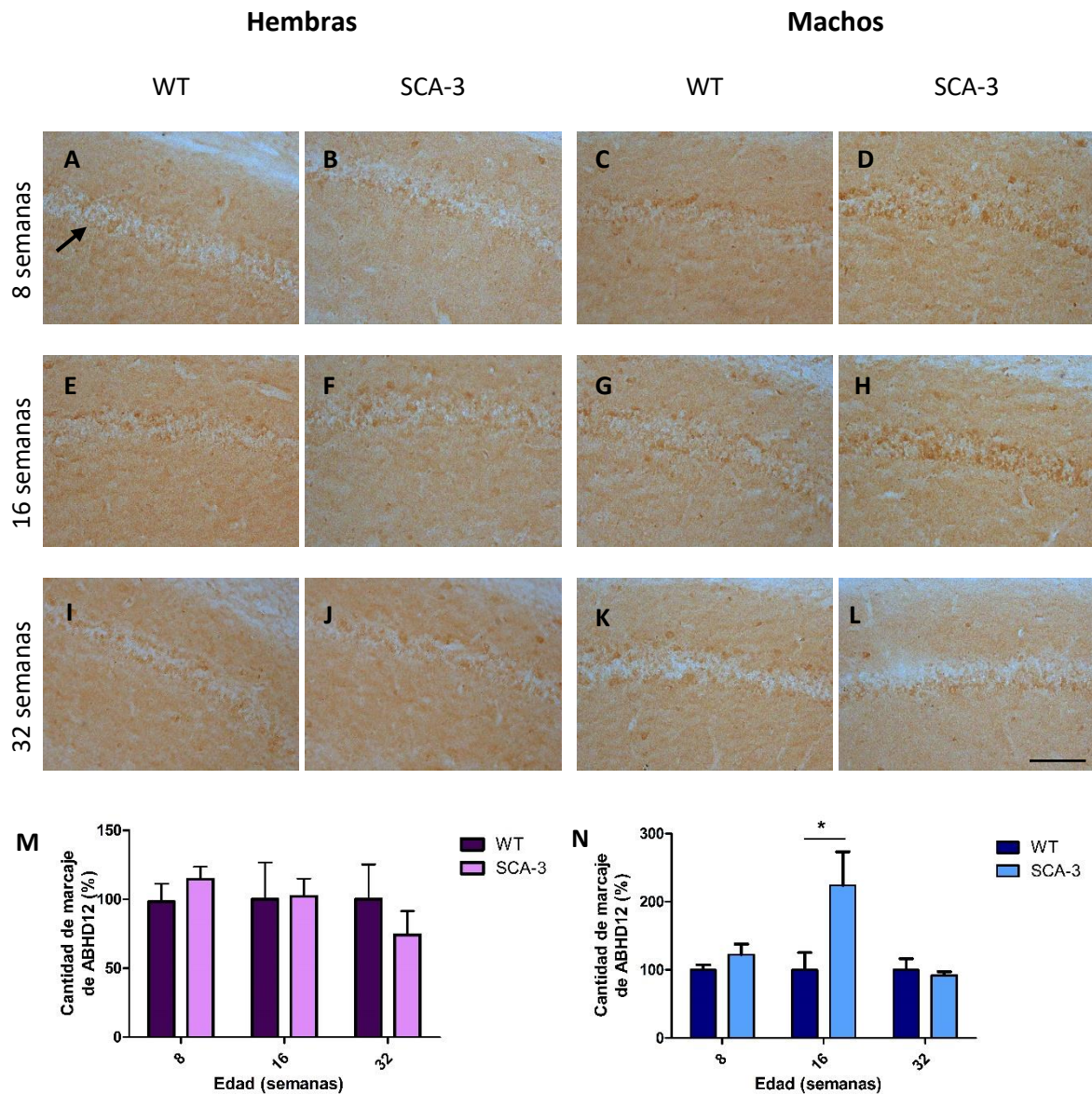
CA1

Figura 35. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$ vs WT). Escala de la barra: 50 μ m.

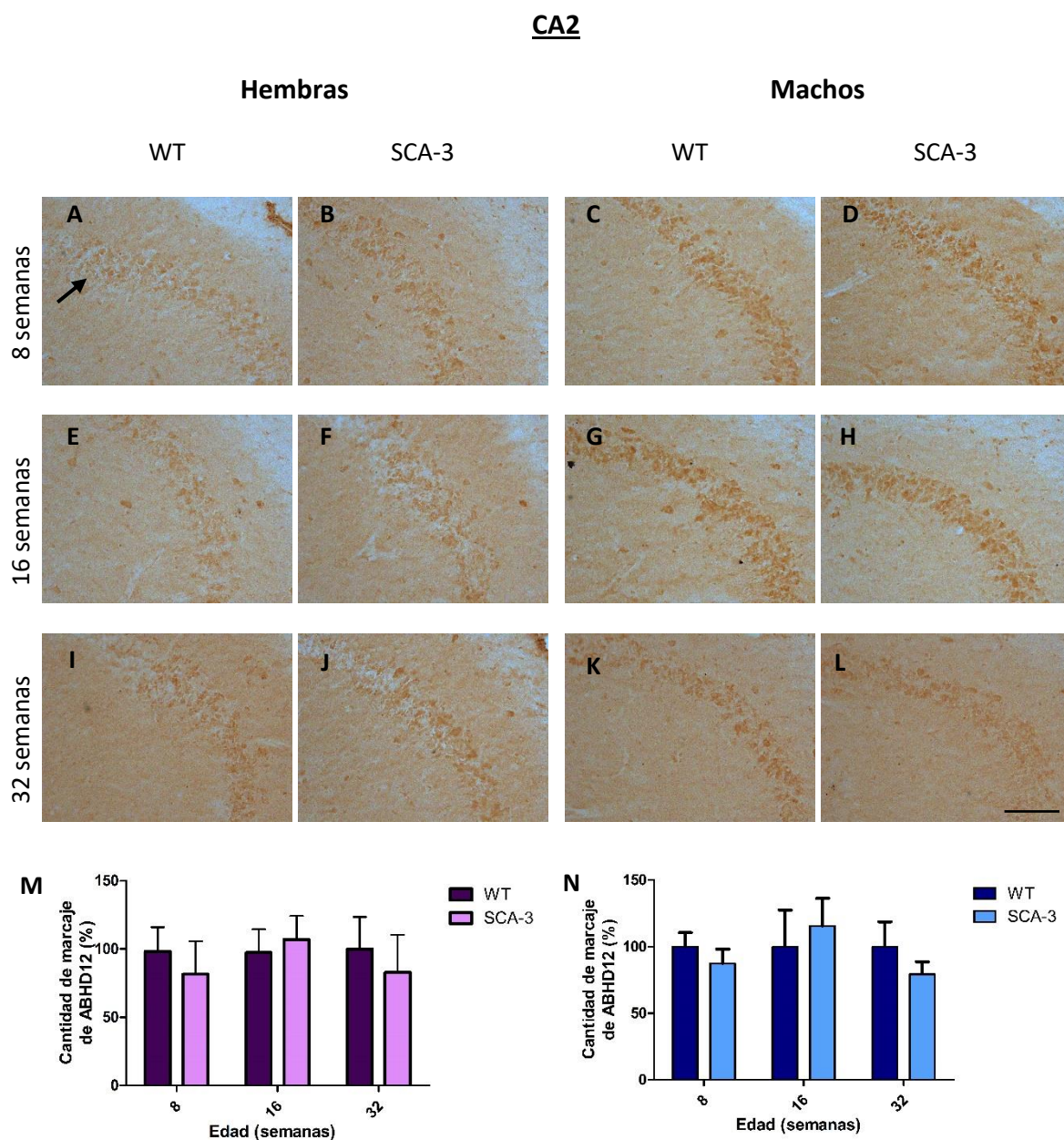


Figura 36. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la capa piramidal de la región CA2 del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m.

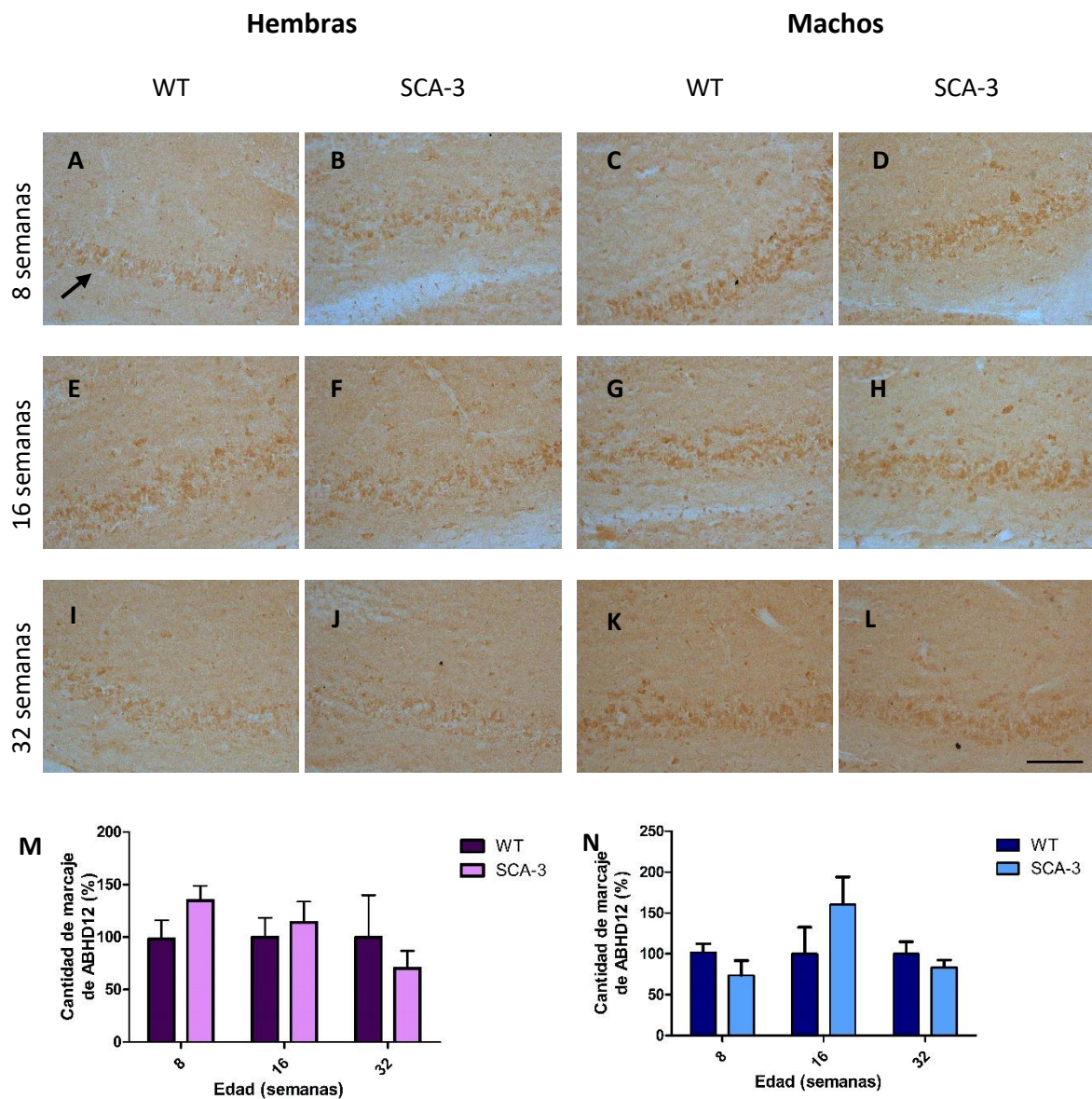
CA3

Figura 37. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la capa piramidal de la región CA3 del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m.

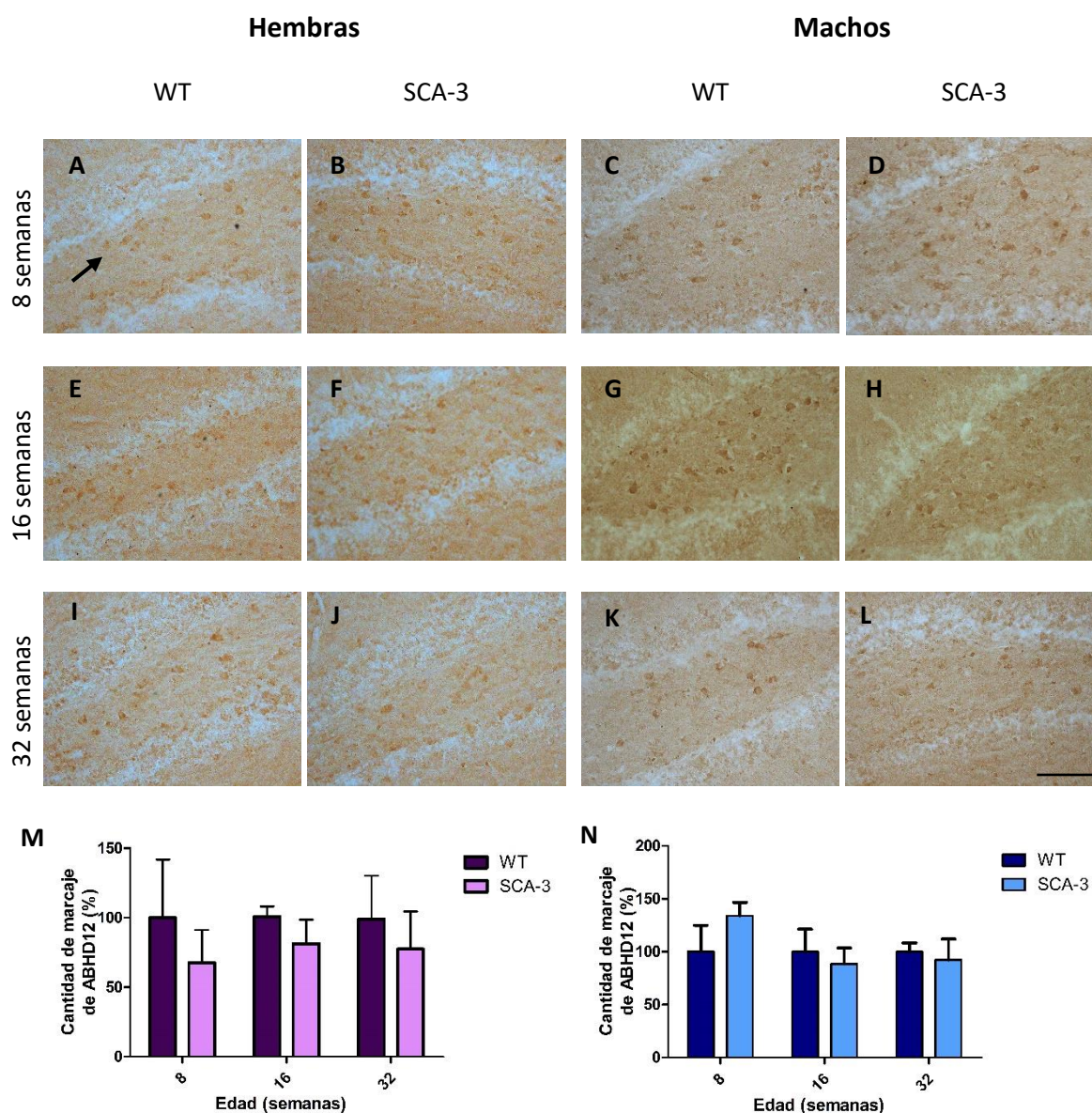
Giro dentado

Figura 38. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en la capa polimórfica del giro dentado de la formación hipocampal en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m.

Estriado

Otra de las regiones donde se ha encontrado una afectación en la SCA-3 es el estriado. En esta área no se encontraron diferencias significativas en la expresión de ABHD12 entre SCA-3 y controles ni en machos ni en hembras, a ninguna de las edades estudiadas (**Figura 39**).

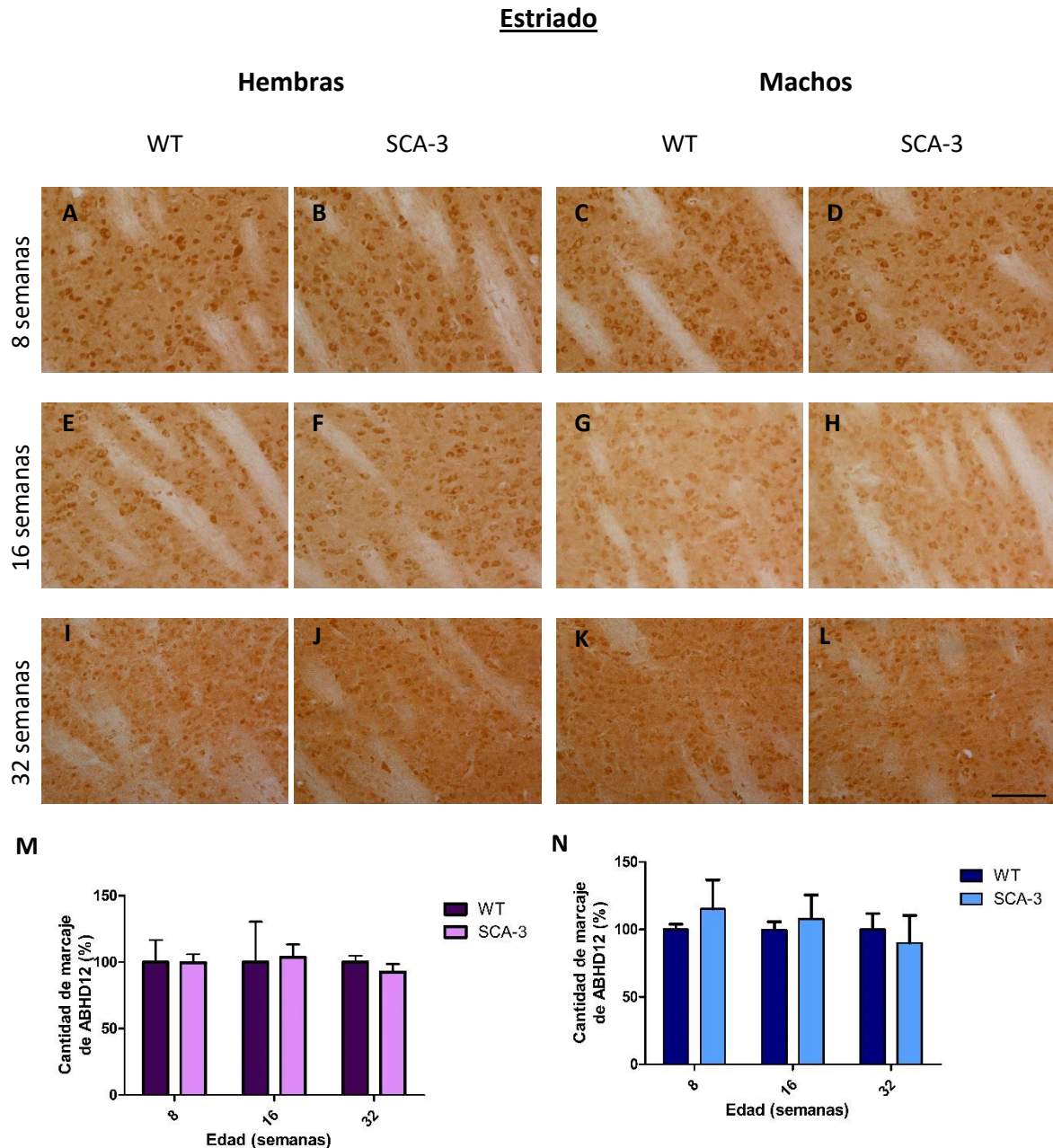


Figura 39. Inmunohistoquímica para la enzima ABHD12 en el cuerpo estriado hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

Análisis de la expresión génica de ABHD12

Una vez analizada la expresión proteica de la enzima ABHD12, quisimos estudiar si las alteraciones observadas en el modelo murino de SCA-3 podían provenir de errores en la expresión génica. Para ello, se cuantificó el ARNm. En el caso de los machos se cuantificó la expresión de ARNm de ABHD12 en tronco encefálico a las 8 semanas y en hipocampo a las 16 semanas. En el caso de las hembras, en cerebelo a las 8 semanas y en tronco encefálico tanto a las 8 como a las 16 semanas de edad. Al estudiar la expresión génica no vimos ningún cambio en la expresión de ARNm entre los animales control y los animales SCA-3, en ninguna de las áreas estudiadas para ninguno de los dos sexos (**Figura 40**)

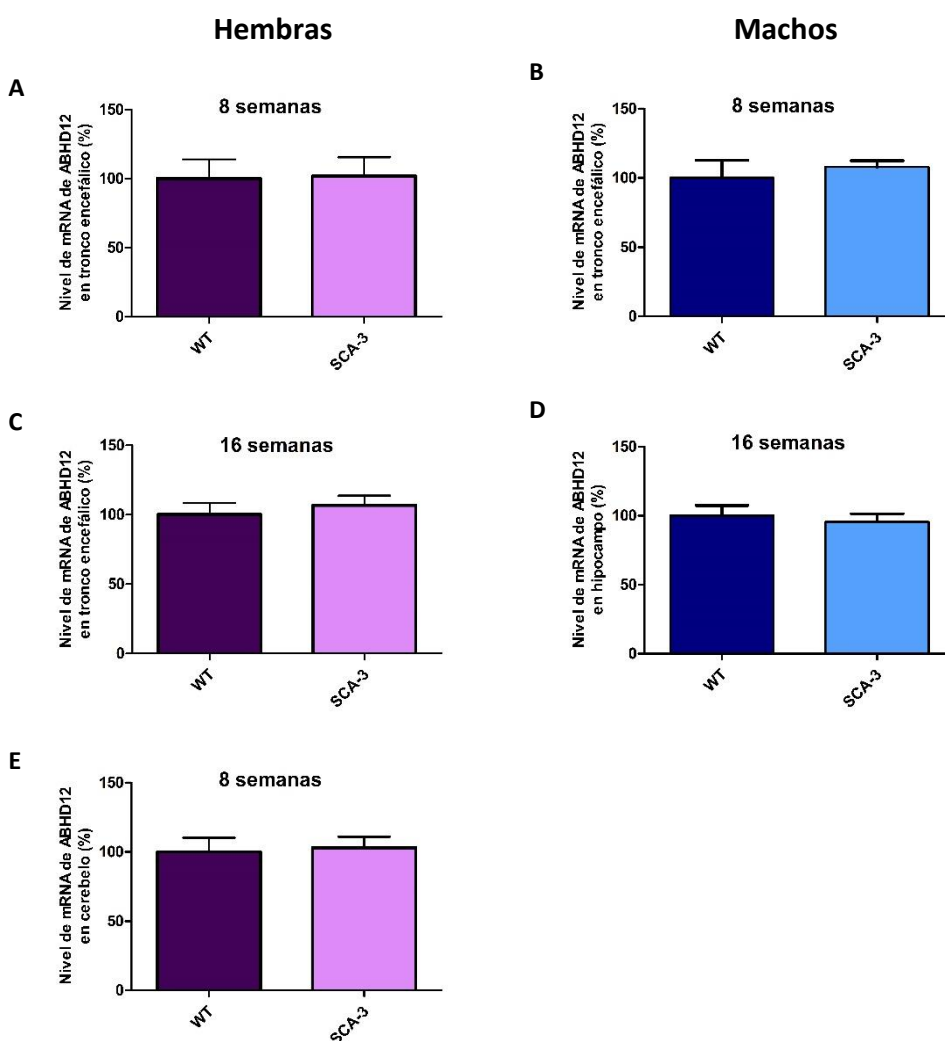


Figura 40. Análisis de la expresión de ARNm para la enzima ABHD12 en hembras (A, C, E) y machos (B, D) en áreas en las que se encontró la expresión proteica alterada, normalizado respecto al grupo control. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney

1.2.2 GPR55

Cerebelo

GPR55 se encuentra ampliamente expresado en distintas regiones encefálicas implicadas en el movimiento y que están afectadas en la SCA-3, entre ellas el cerebelo¹⁴³ (**Figura 41**). Se encontró expresión de este receptor en el núcleo dentado (**Figura 42**), en la sustancia blanca (**Figura 43**), y en la corteza cerebelosa, tanto en la capa granular (**Figura 44**) como en la capa molecular (**Figura 45**) y en las neuronas de Purkinje (**Figura 46**), sin que se observasen diferencias entre los animales WT y los animales SCA-3 a ninguna de las edades estudiadas, ni en hembras ni en machos. Tampoco se observaron cambios ni en el número de células de Purkinje que expresan el receptor GPR55, ni en la cantidad de expresión de este receptor en las mismas, tanto en hembras como en machos, en las diferentes edades estudiadas.

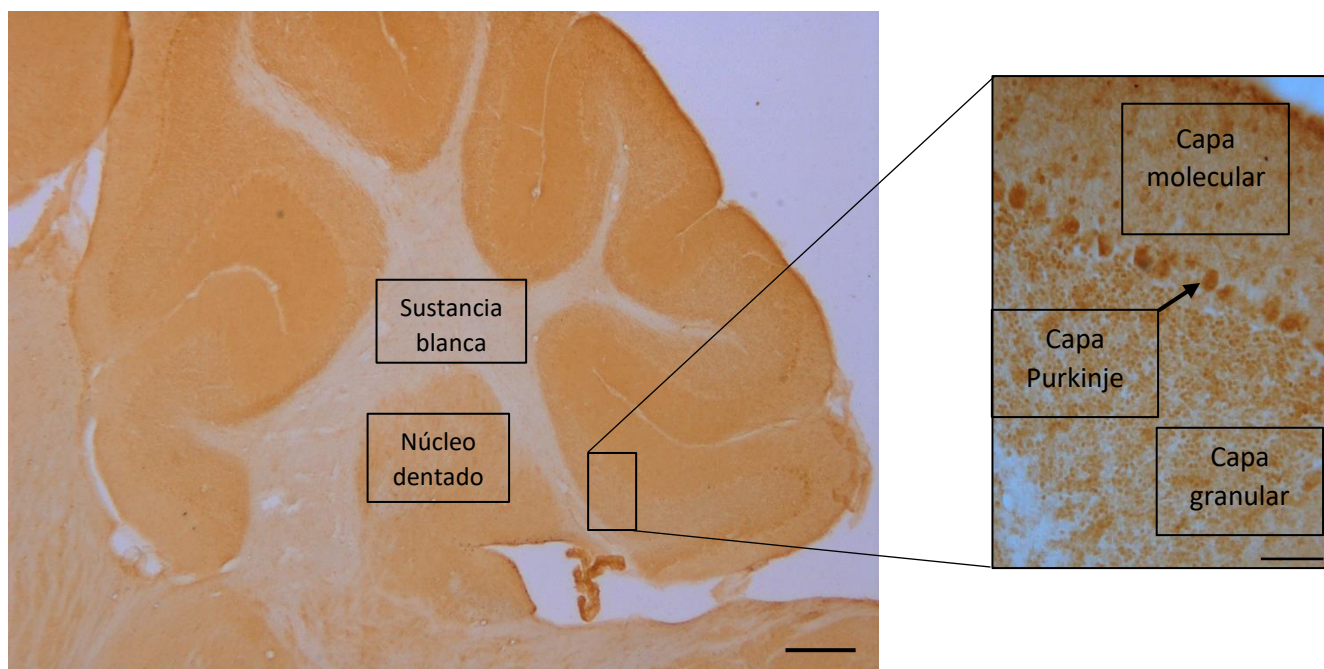


Figura 41. Inmunohistoquímica de GPR55 en cerebelo en la que se muestran las distintas regiones estudiadas: sustancia blanca del cerebelo, núcleo dentado, capa granular, capa de células de Purkinje y capa molecular, utilizando como referencia el *Allen Brain Atlas*. Escala de la barra: 200µm; barra en detalle: 100µm.

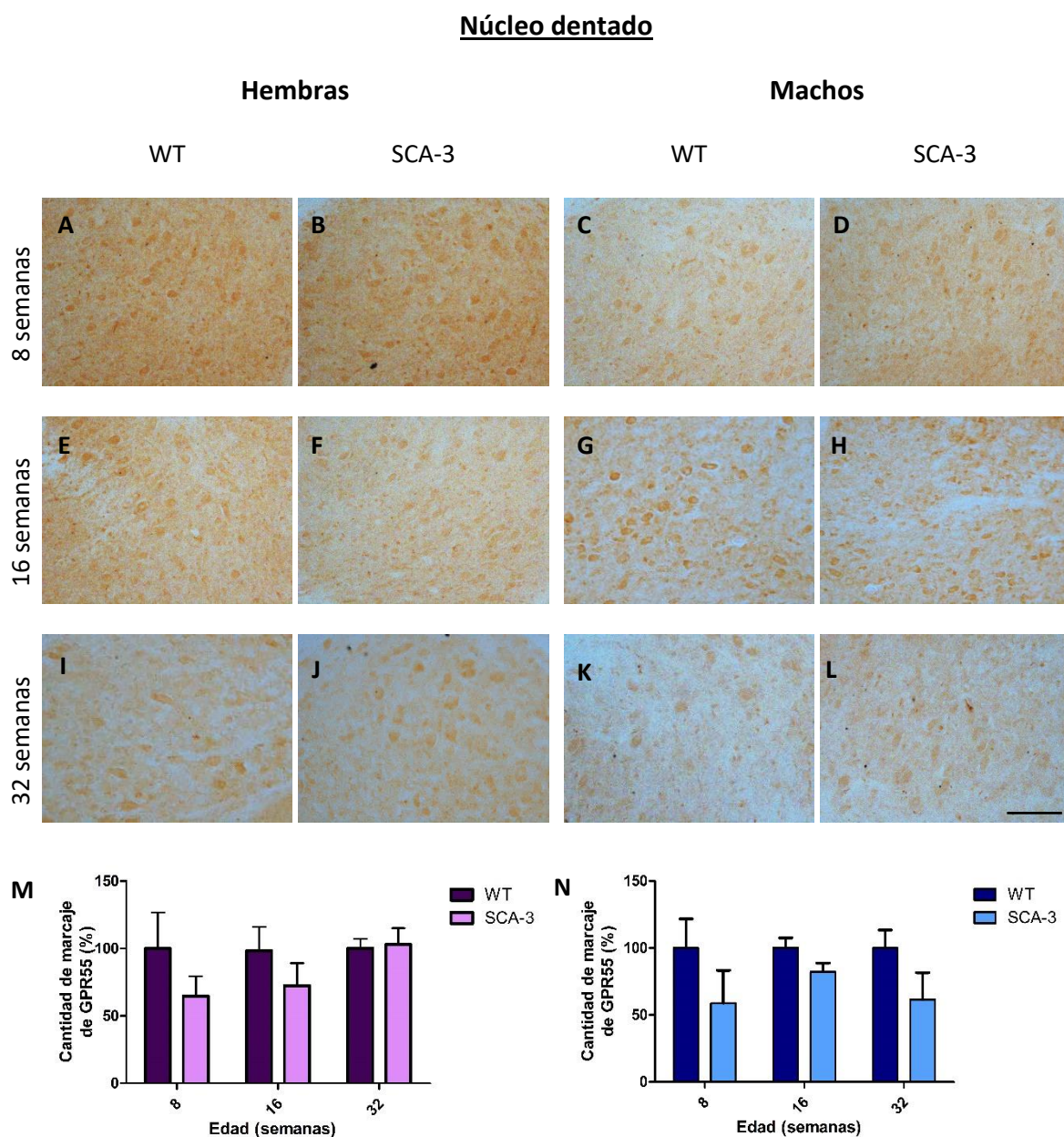


Figura 42. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en el núcleo dentado del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

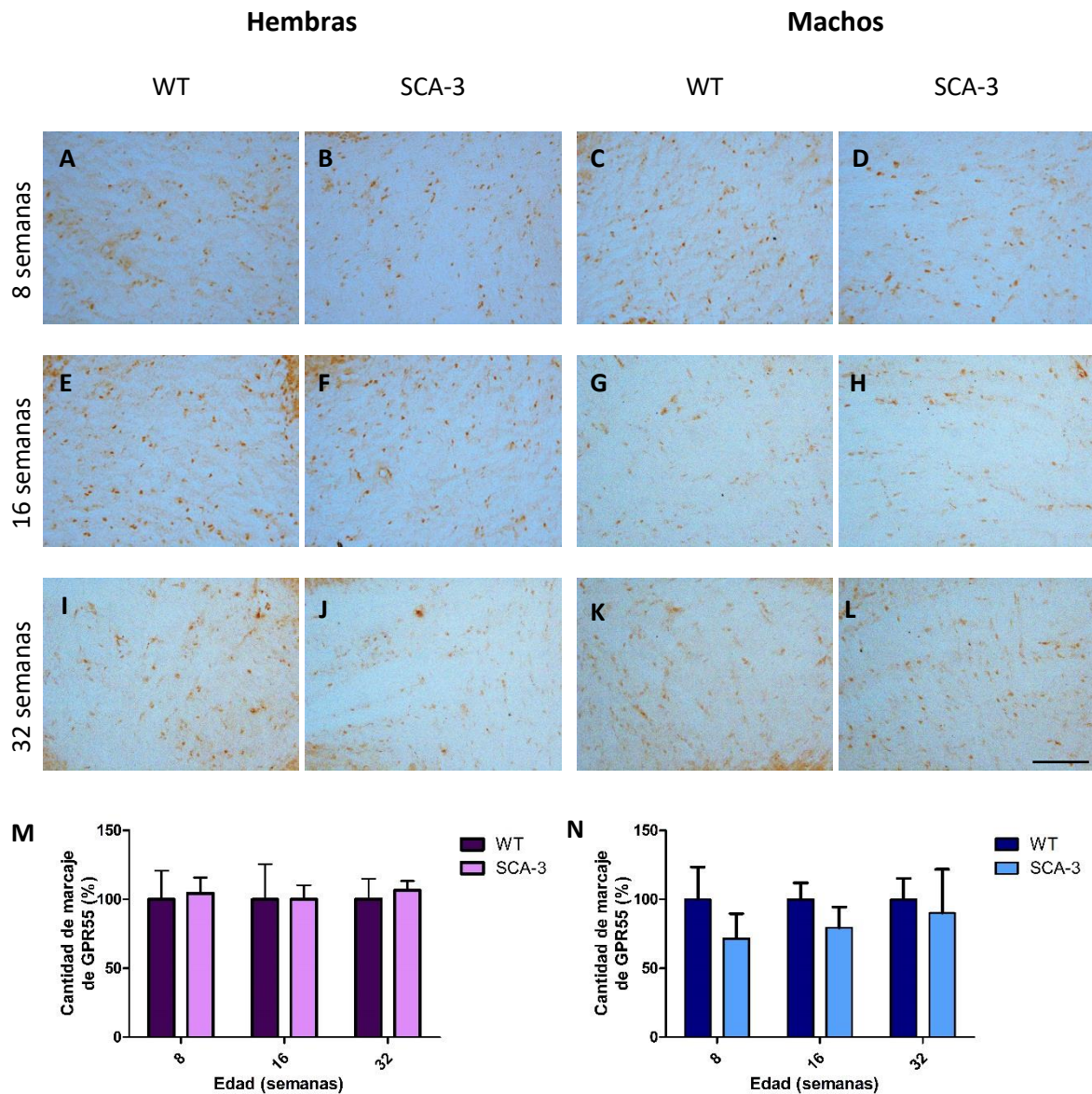
Sustancia blanca del cerebelo

Figura 43. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la sustancia blanca del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM ($n=6$) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

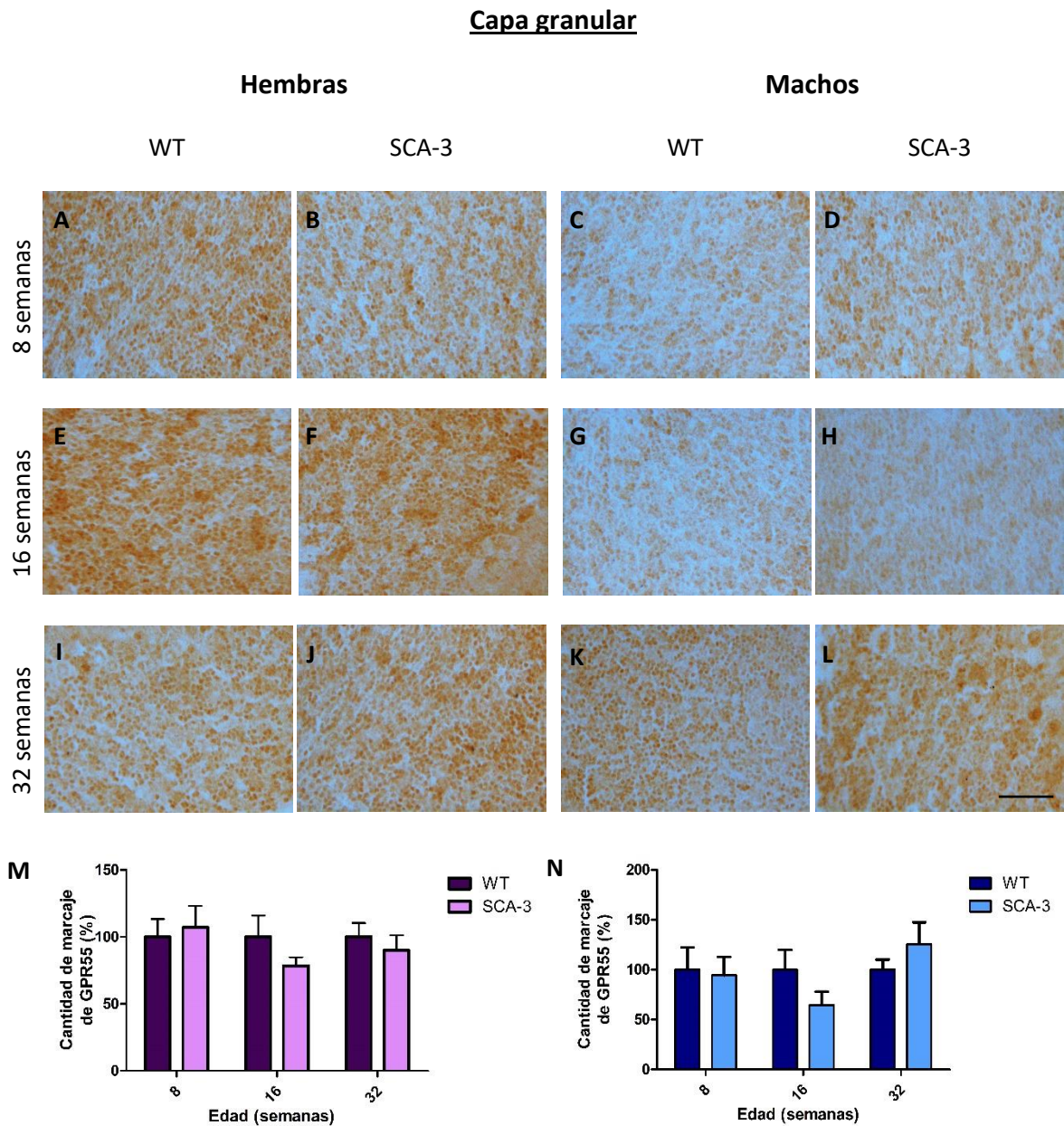


Figura 44. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa granular del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

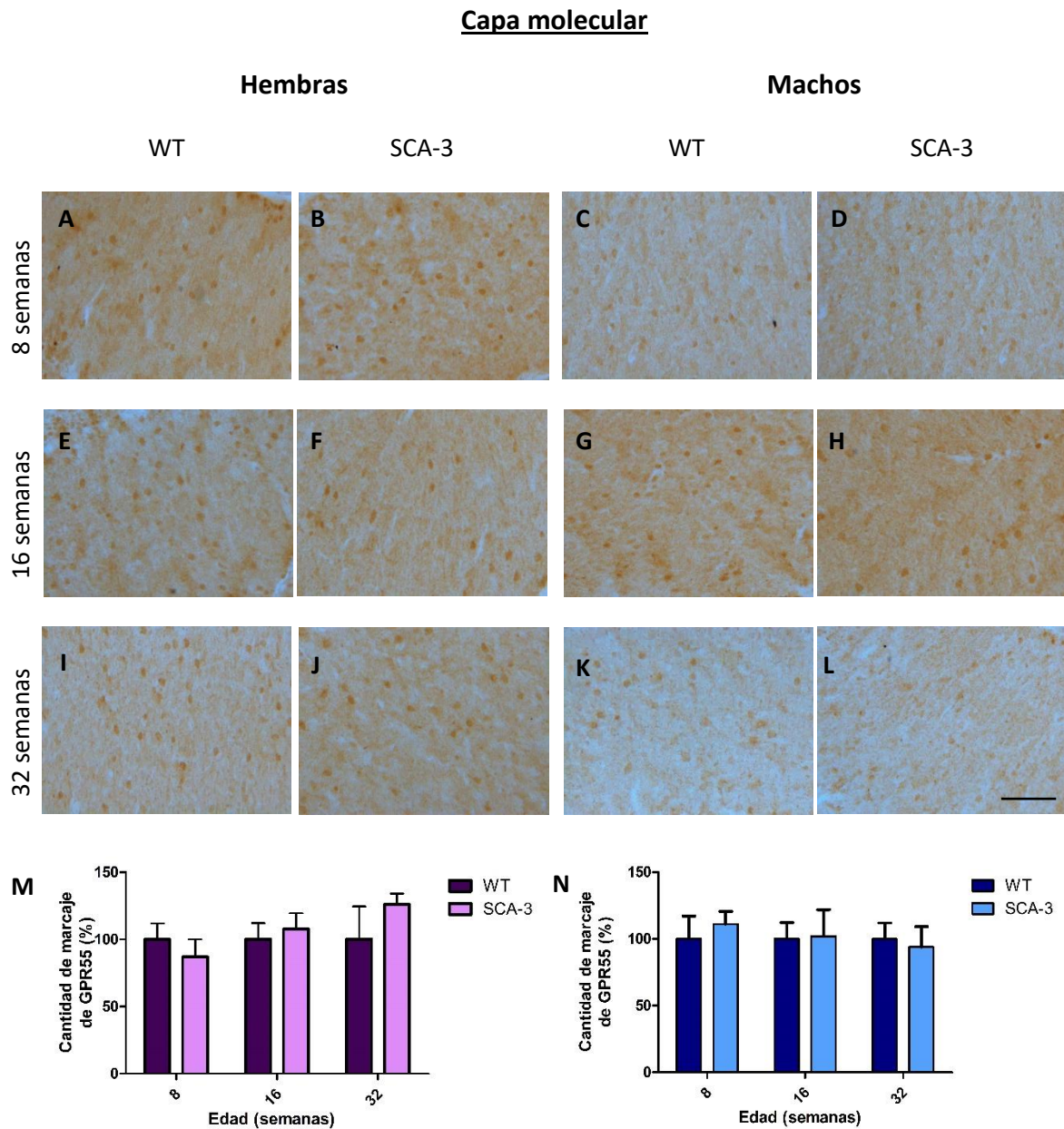


Figura 45. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa molecular del cerebelo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

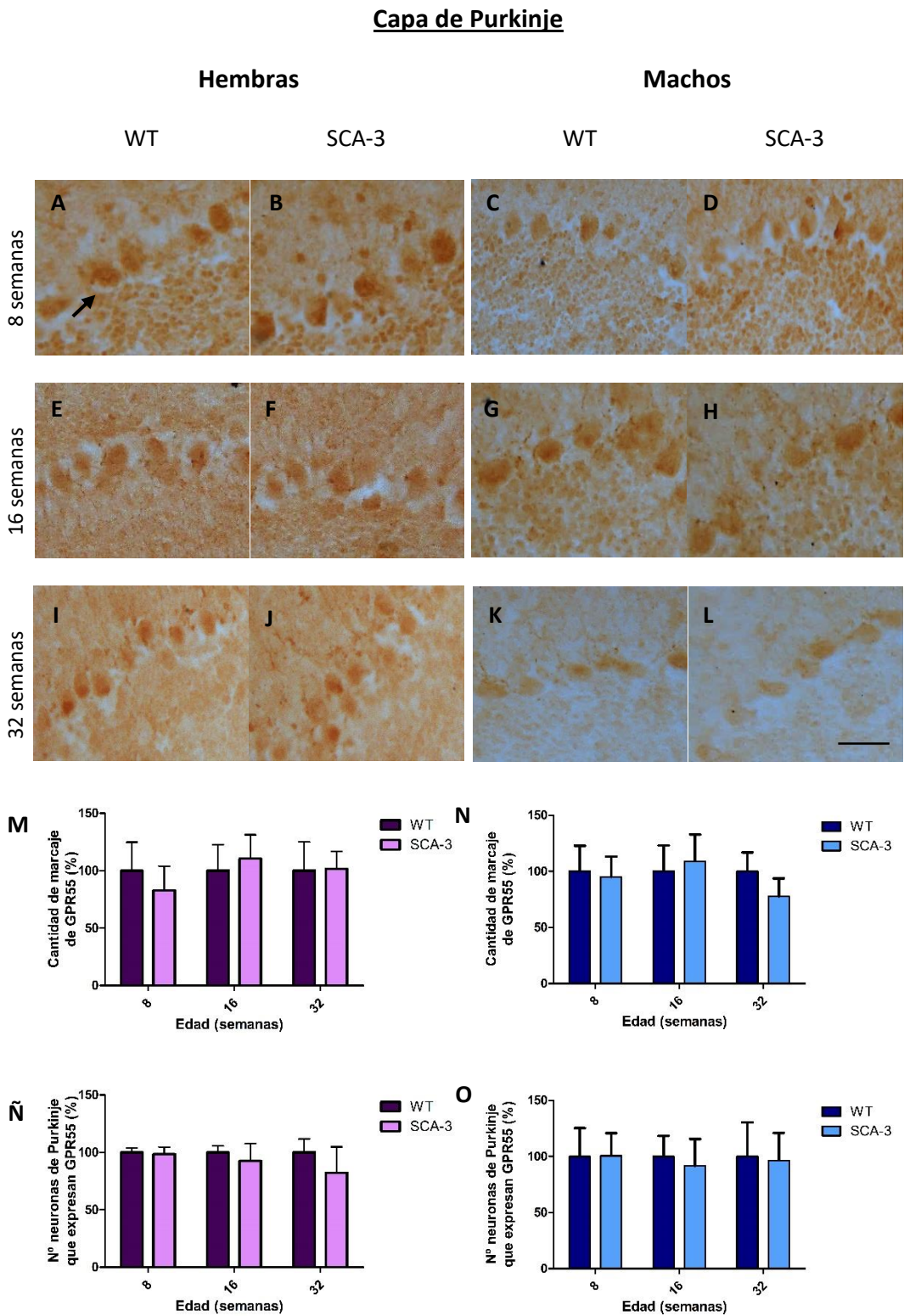


Figura 46. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa de las neuronas de Purkinje en el cerebelo hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N); y número de células marcadas en hembras (Ñ) y machos (O), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50µm

Tronco encefálico

Al igual que al analizar la expresión de ABHD12, al estudiar la expresión de GPR55 en el tronco encefálico nos centramos en el núcleo pontino, que, como ya se ha comentado anteriormente, es una de las áreas más típicamente afectadas en la SCA-3¹⁵ (**Figura 47**). En esta área no se encontraron diferencias en la expresión del receptor GPR55 entre los animales SCA-3 y los animales control, ni en machos ni en hembras, a ninguna de las edades estudiadas (**Figura 48**), aunque parece apreciarse una tendencia no significativa a una disminución de su expresión en los animales SCA-3 en ambos sexos.

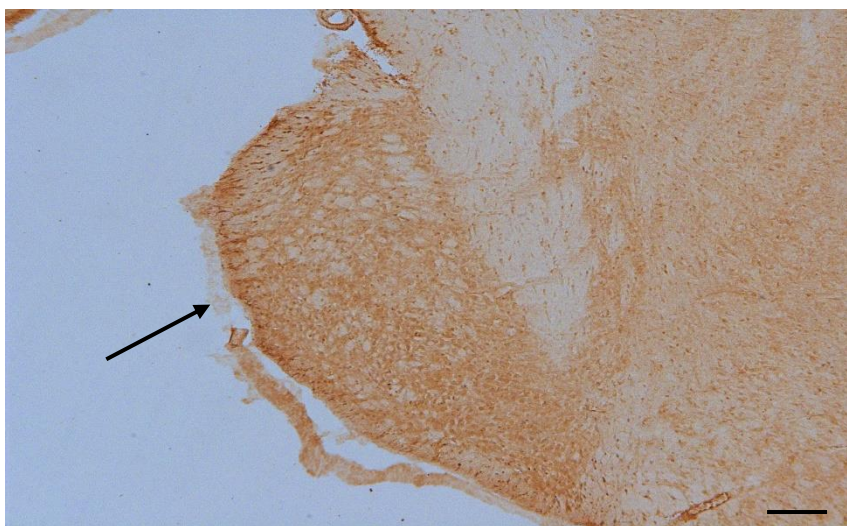


Figura 47. Inmunohistoquímica de GPR55 del núcleo pontino del tronco encefálico, utilizando como referencia el *Allen Brain Atlas*. Escala de la barra: 200µm.

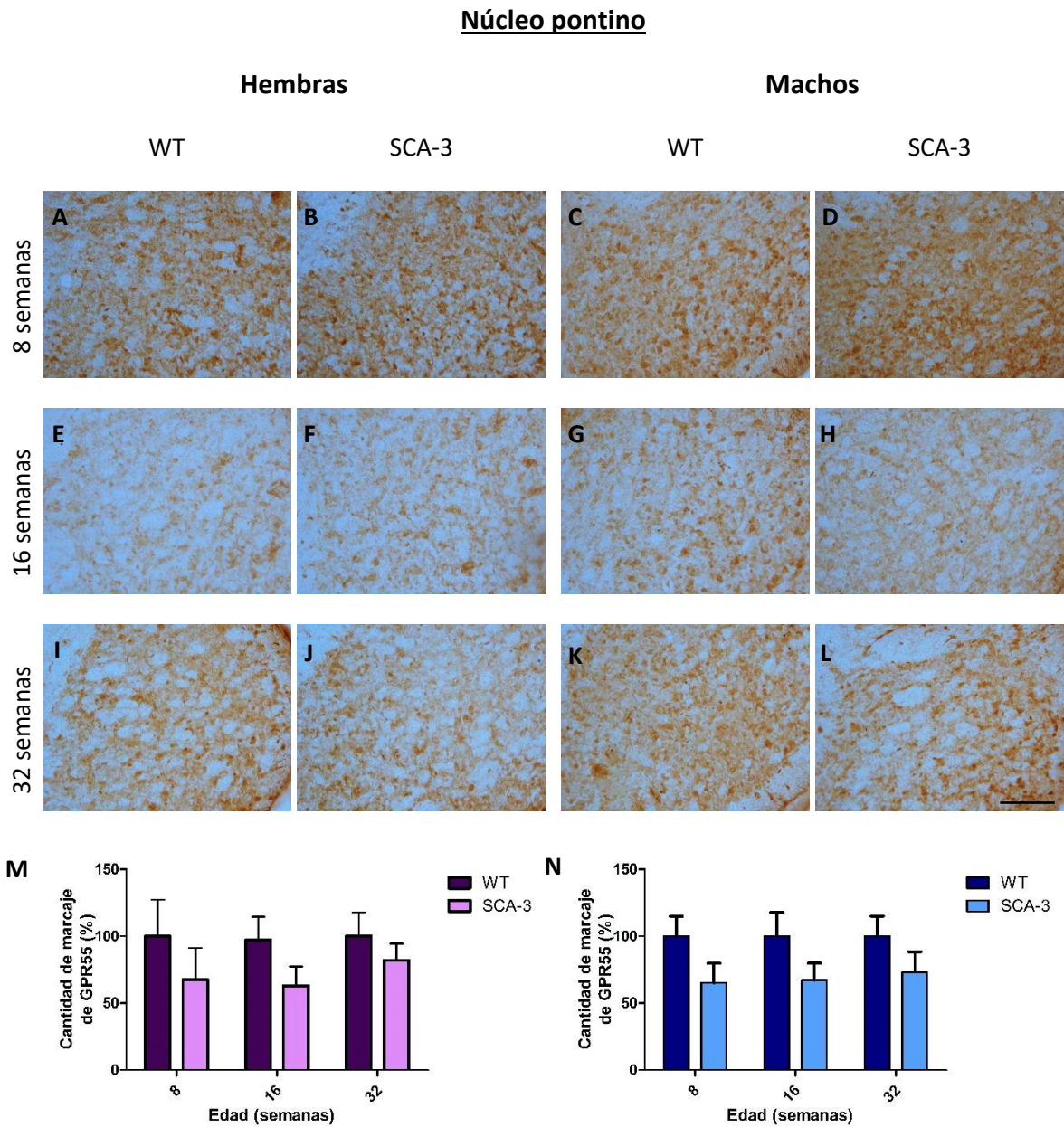


Figura 48. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en el núcleo pontino del tronco encefálico en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

Formación hipocampal

Otra de las áreas en las que se ha visto expresión de GPR55 es en la región hipocampal (**Figura 49**), especialmente en la capa piramidal de las regiones CA1 (**Figura 50**), CA2 (**Figura 51**), y CA3 (**Figura 52**), además de en la capa granular del giro dentado (**Figura 53**). Sin embargo, no aparecen diferencias significativas en ninguna de las áreas ni edades estudiadas, tanto en el caso de las hembras como de los machos, entre los animales SCA-3 y sus controles.

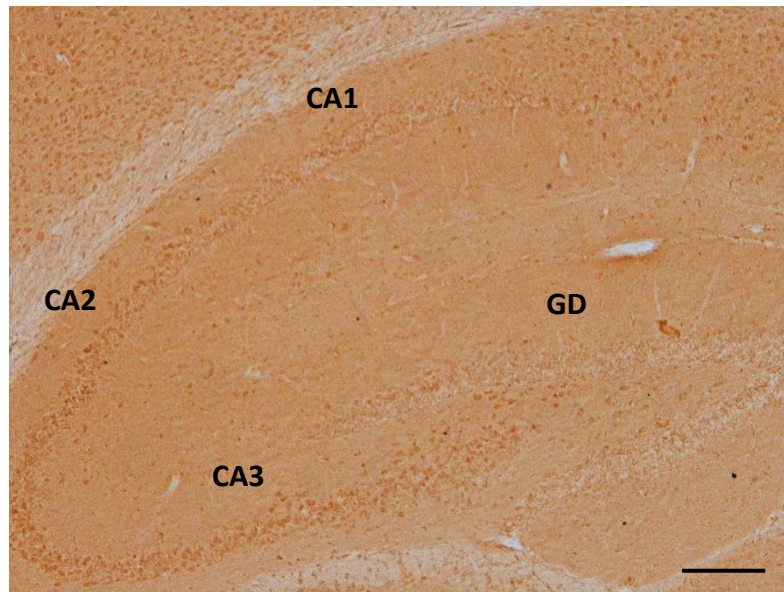


Figura 49. Inmunohistoquímica de GPR55 en la formación hipocampal en la que se muestran las distintas regiones estudiadas: las regiones CA1, CA2 y CA3, y el giro dentado (GD), utilizando como referencia el *Allen Brain Atlas*. Escala de la barra: 200µm

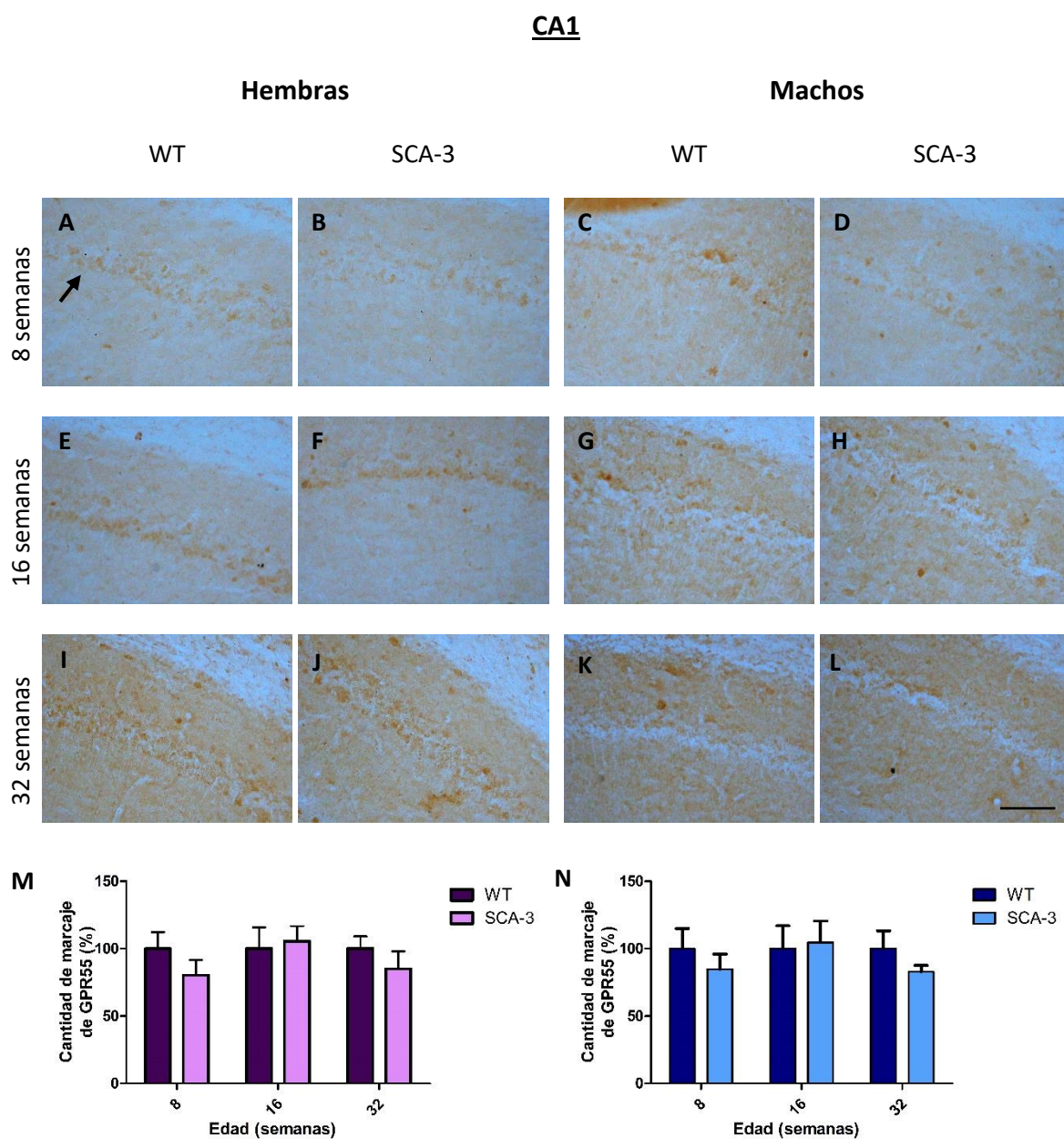


Figura 50. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa piramidal de la región CA1 del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

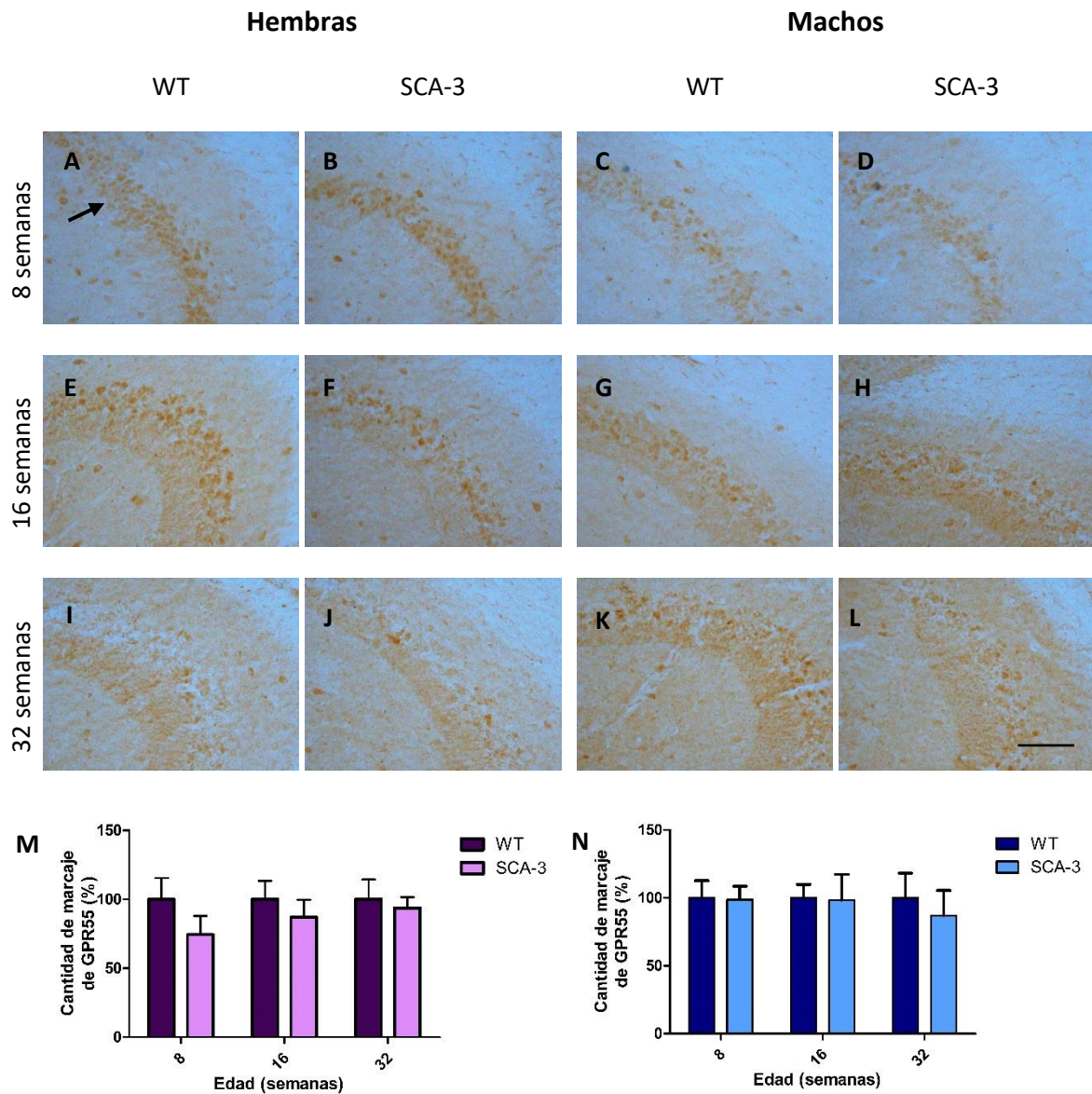
CA2

Figura 51. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa piramidal de la región CA2 del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

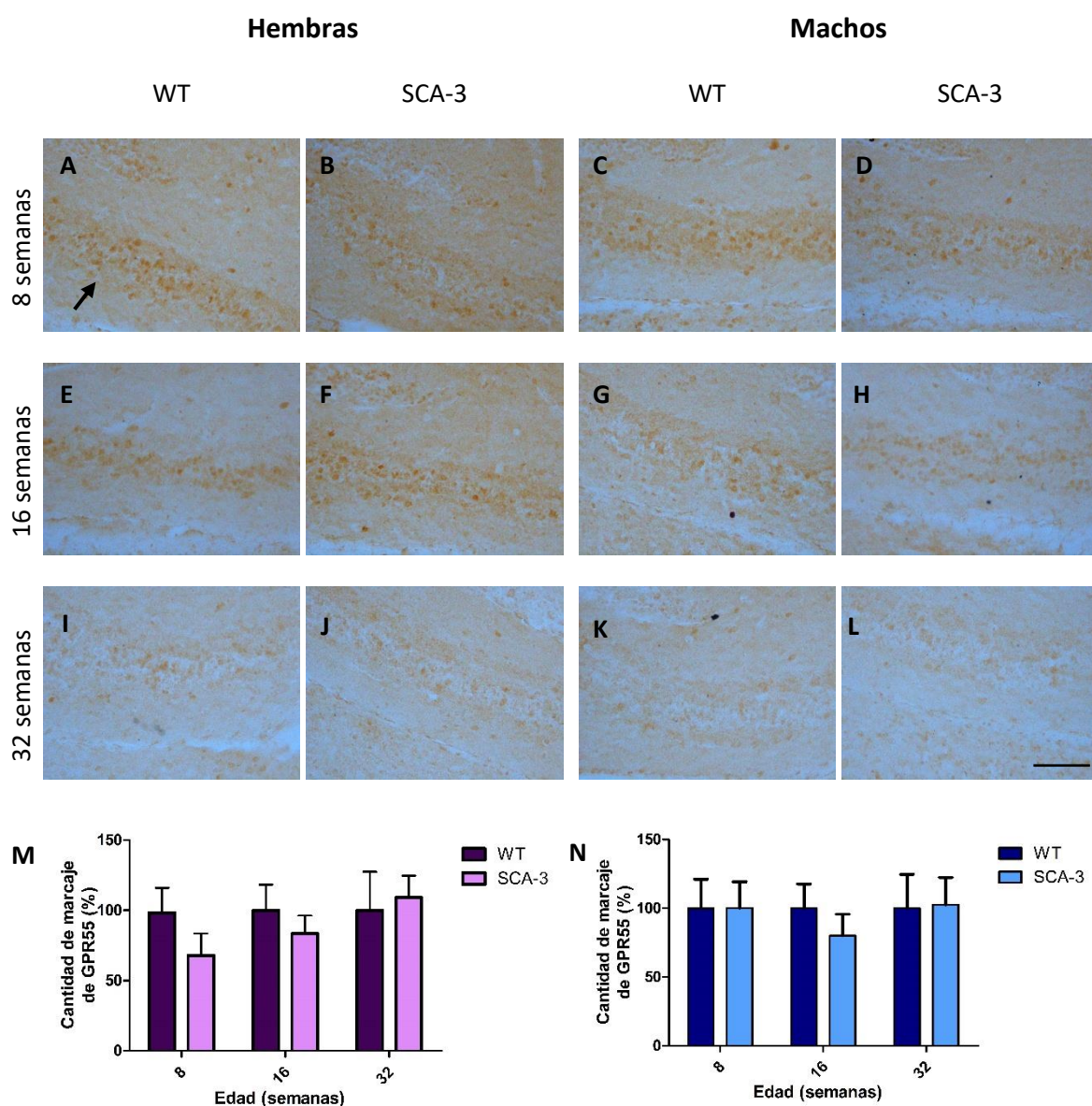
CA3

Figura 52. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa piramidal de la región CA3 del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50µm

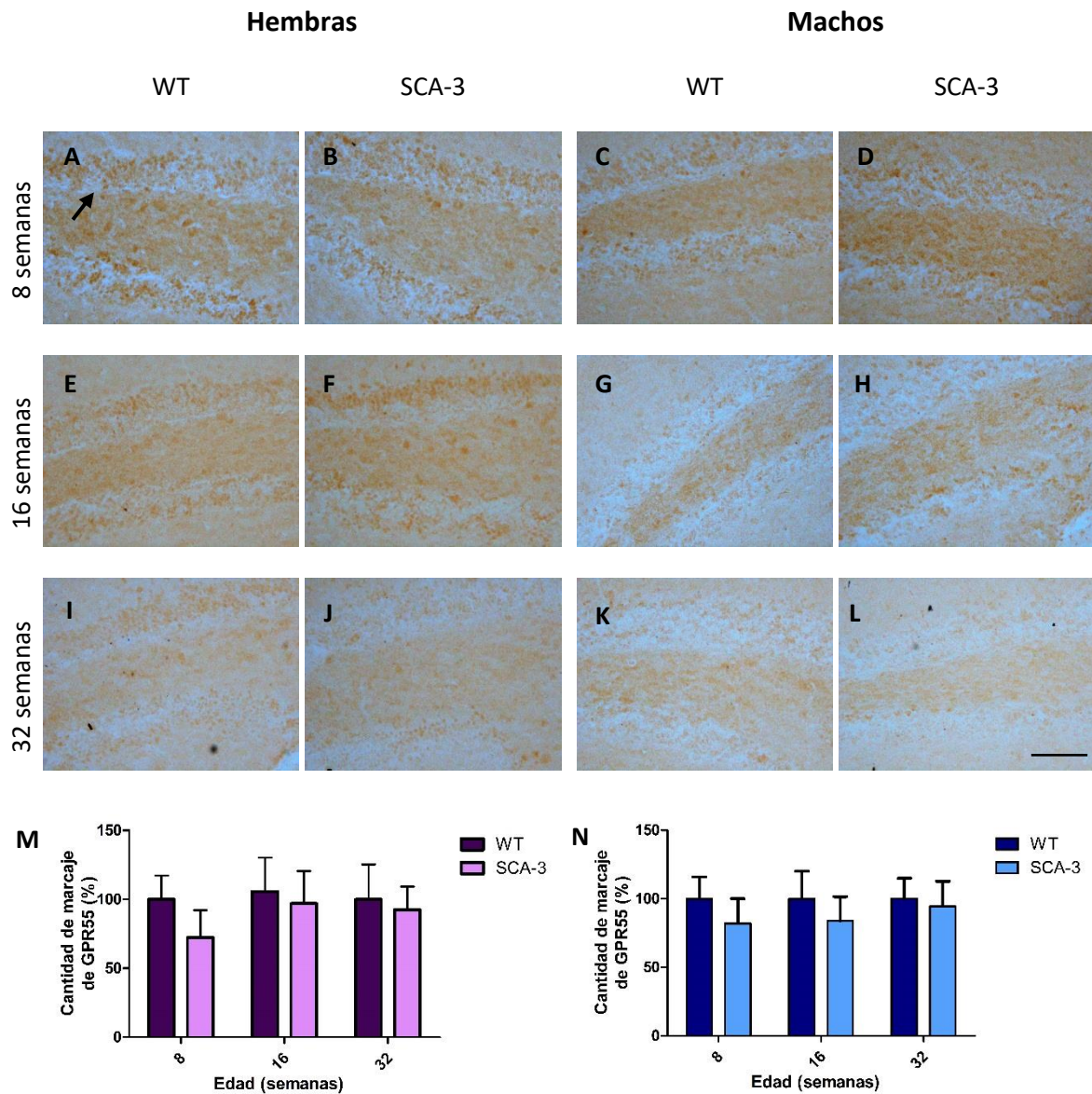
Giro dentado

Figura 53. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en la capa granular del giro dentado del hipocampo en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

Estriado

En el cuerpo estriado, área afectada en la SCA-3¹⁵, también se observó expresión del receptor GPR55. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los animales SCA-3 y sus controles a ninguna de las edades estudiadas, ni en machos ni en hembras (**Figura 54**)

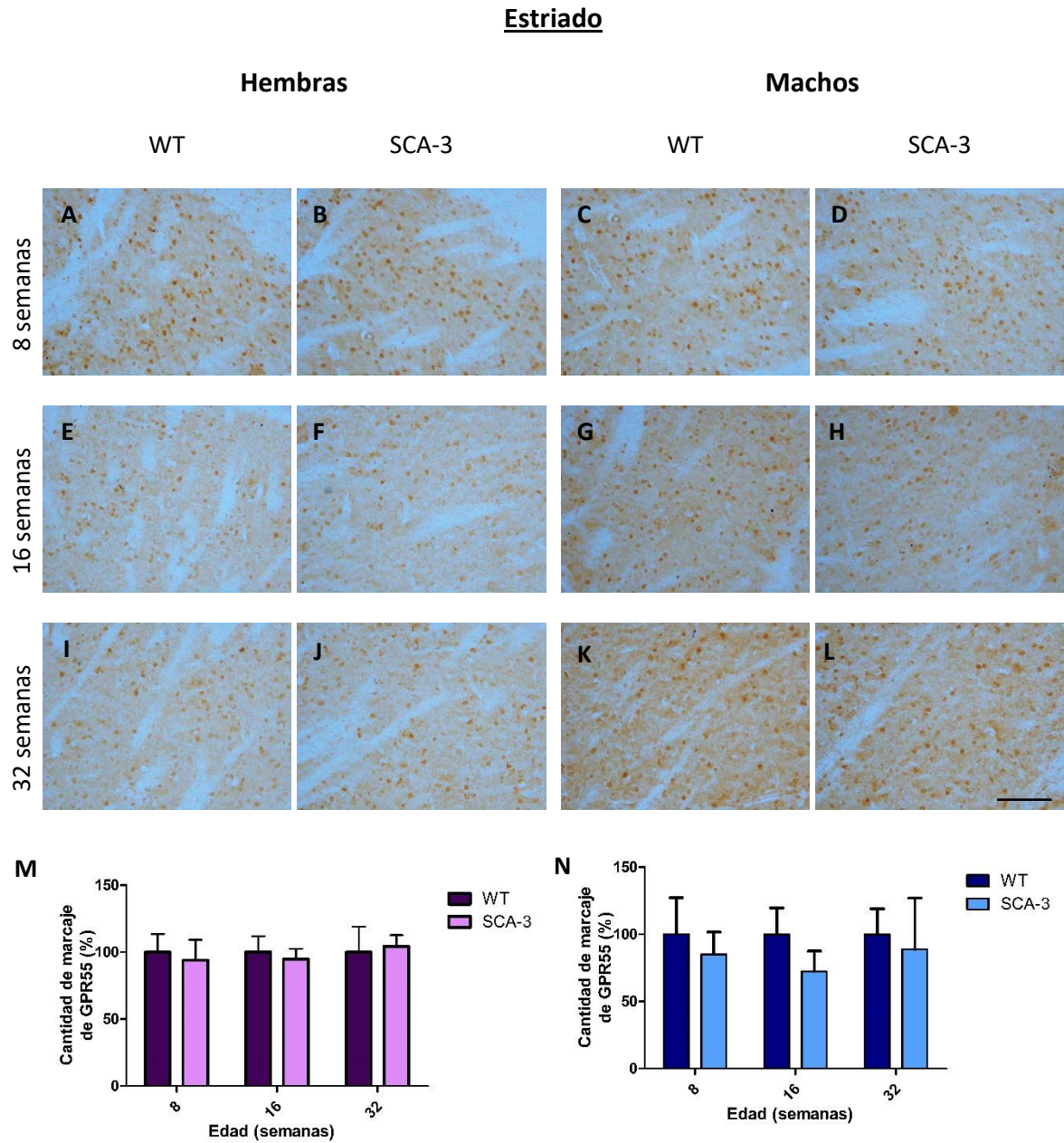


Figura 54. Inmunohistoquímica para el receptor GPR55 en el cuerpo estriado en hembras (A, B, E, F, I, J) y machos (C, D, G, H, K, L) a 8 (A-D), 16 (E-H) y 32 semanas (I-L). Cantidad de marcaje en cada edad en hembras (M) y en machos (N), normalizado respecto al grupo WT. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM (n=6) y el análisis estadístico utilizado fue el test no paramétrico de Mann-Whitney. Escala de la barra: 50 μ m

2 Diseño experimental 2. Estudio del papel del receptor CB₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto la posibilidad de que el receptor CB₂ esté implicado en los mecanismos compensatorios que se ponen en marcha ante el daño neuronal, y en concreto, que la activación de este receptor produzca una disminución en la producción de factores neurotóxicos y proinflamatorios^{210,211}. En estudios previos en nuestro laboratorio realizados en muestras de cerebelo *postmortem* de pacientes diagnosticados con algún tipo de ataxia se observó un aumento en la expresión del receptor CB₂²⁰³, y aunque en un modelo utilizado anteriormente de SCA-3 con un menor número de repeticiones no se observaron cambios en los marcadores de neuroinflamación ni en los niveles de expresión del CB₂, en estudios paralelos a esta Tesis Doctoral realizados en nuestro modelo murino actual hemos observado microgliosis y astrogliosis (datos no publicados). Por ello, hemos querido estudiar en nuestro actual modelo el posible papel que pueda tener este receptor en etapas tempranas de la enfermedad evaluando su efecto sobre la sintomatología. Para ello, se generaron dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3. En estos animales se llevaron a cabo distintas pruebas neuroconductuales para determinar sus características fenotípicas a las 8 semanas de edad, cuando comienzan a manifestarse los primeros síntomas de la patología. Al igual que en los anteriores diseños experimentales, los estudios se realizaron en machos y en hembras por separado.

2.1 Estado de salud

A las 8 semanas de edad no se apreciaron diferencias a simple vista en el aspecto de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales en ninguno de los sexos, ya que las diferencias de peso son ligeras (**Figura 55**). Tal y como se describió en el diseño experimental 1, los animales SCA-3 muestran un menor peso corporal que los controles en ambos sexos. Los animales dobles mutantes presentan también una disminución estadísticamente significativa de la ganancia de peso con respecto de los WT y de los KO-CB₂, en ambos sexos. Sin embargo, esta disminución de peso de los dobles mutantes no es significativamente diferente cuando se compara con el peso de los animales SCA-3 en los grupos de ambos sexos. En los animales KO-CB₂ se observa un descenso estadísticamente significativo en la ganancia de peso con respecto a los WT en el caso de los machos, descenso que es similar al de los otros dos grupos

experimentales. Este efecto no se observa en el caso de las hembras KO-CB₂, ya que el peso de éstas no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto del grupo WT.

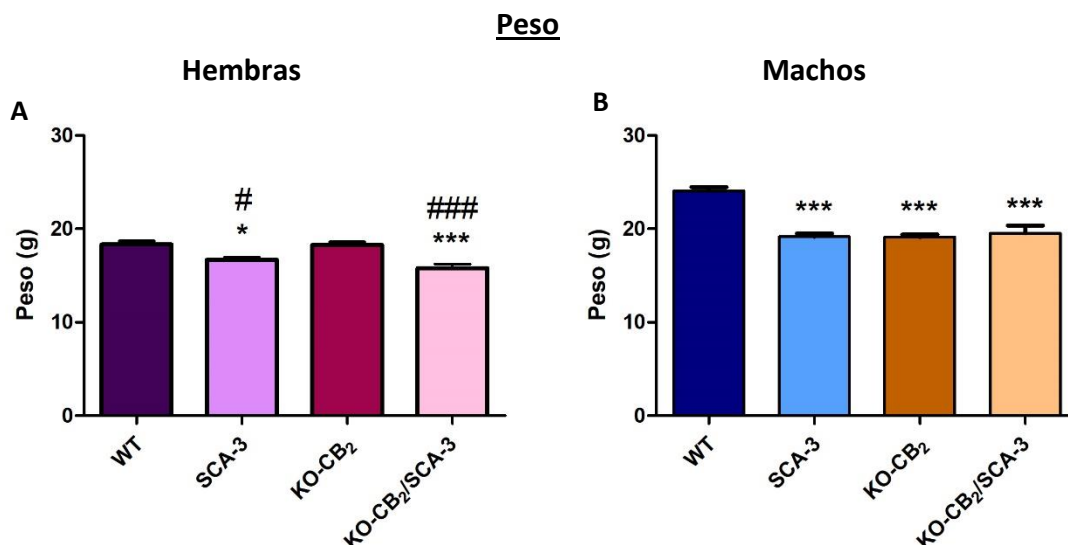


Figura 55. Estudio del efecto de la supresión del receptor CB₂ en el peso en (A) hembras (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 6 KO-CB₂/SCA-3) y en (B) machos (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 4 KO-CB₂/SCA-3). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, y el análisis estadístico utilizado fue el ANOVA de una vía seguida de un post-test Bonferroni de comparaciones múltiples (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs WT; # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ vs KO-CB₂).

Por otra parte, como ya se describió en el modelo experimental 1, en los animales SCA-3 de 8 semanas de edad no aparecen diferencias significativas en el grado de distonía, medida por la prueba de *claspings*, con respecto de los animales WT en ninguno de los sexos. Sin embargo, la eliminación de la expresión del receptor CB₂ en los dobles mutantes de ambos sexos produce una aparición de distonía en la SCA-3 en esta fase sintomática temprana de la enfermedad. Se puede también observar un efecto diferente en machos y hembras, ya que sólo los machos KO-CB₂/SCA-3 presentan síntomas de distonía mientras que el resto de los grupos de este sexo no muestran el reflejo de *claspings*. En el caso de las hembras, los animales KO-CB₂/SCA-3 presentan distonía significativa frente a los grupos WT y KO-CB₂, diferencia que no aparece cuando se compara con el grupo de las hembras SCA-3, ya que éstas muestran signos muy leves de distonía, aunque no resultan significativos al compararlos con sus WT y KO-CB₂ (Figura 56).

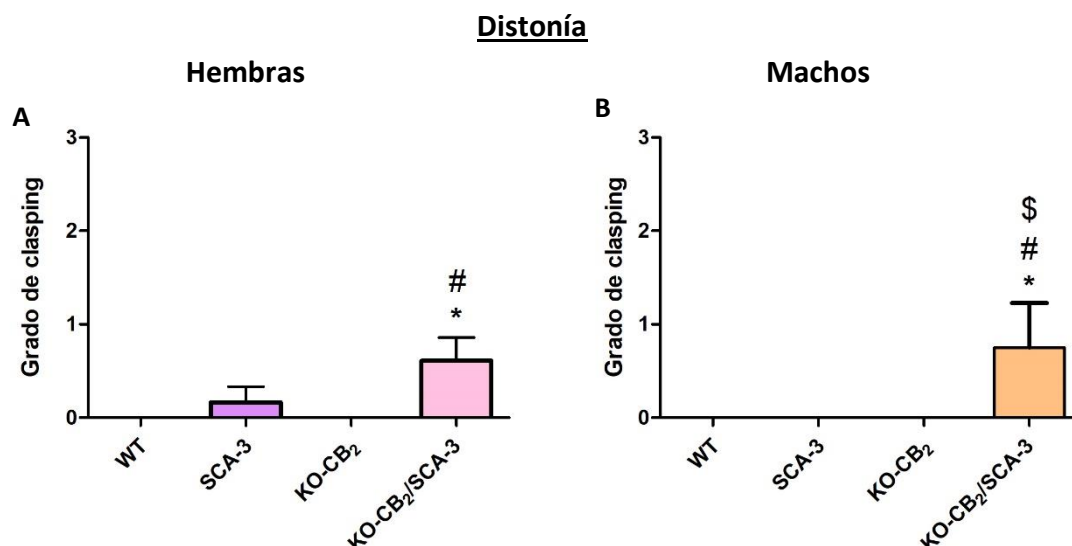


Figura 56. Estudio del efecto de la supresión del receptor CB₂ en el grado de distonía en (A) hembras (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 6 KO-CB₂/SCA-3) y en (B) machos (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 4 KO-CB₂/SCA-3). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, y el análisis estadístico utilizado fue el ANOVA de una vía seguida de un post-test Bonferroni de comparaciones múltiples (* $p < 0,05$ vs WT; # $p < 0,05$ vs KO-CB₂; \$ $p < 0,05$ vs SCA-3).

2.2 Evaluación neuroconductual

Se quiso estudiar si al suprimir la expresión del receptor CB₂ se producía algún cambio en la sintomatología de la SCA-3 a etapas tempranas de la enfermedad. Para ello, se llevaron a cabo distintas evaluaciones neuroconductuales a las 8 semanas de edad que nos permitiesen conocer mejor el papel de este receptor en el desarrollo de la patología de esta enfermedad.

Fuerza muscular

La latencia de caída medida en la prueba de *Hanging Wire* muestra que los animales SCA-3 y los dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3 presentaban una menor fuerza muscular que sus controles tanto en hembras como en machos. Sin embargo, la supresión de la expresión del receptor CB₂ no produjo ningún efecto sobre la fuerza muscular en el desarrollo de la enfermedad a las 8 semanas de edad, puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales SCA-3 y los animales KO-CB₂/SCA-3 en ninguno de los sexos (Figura 57).

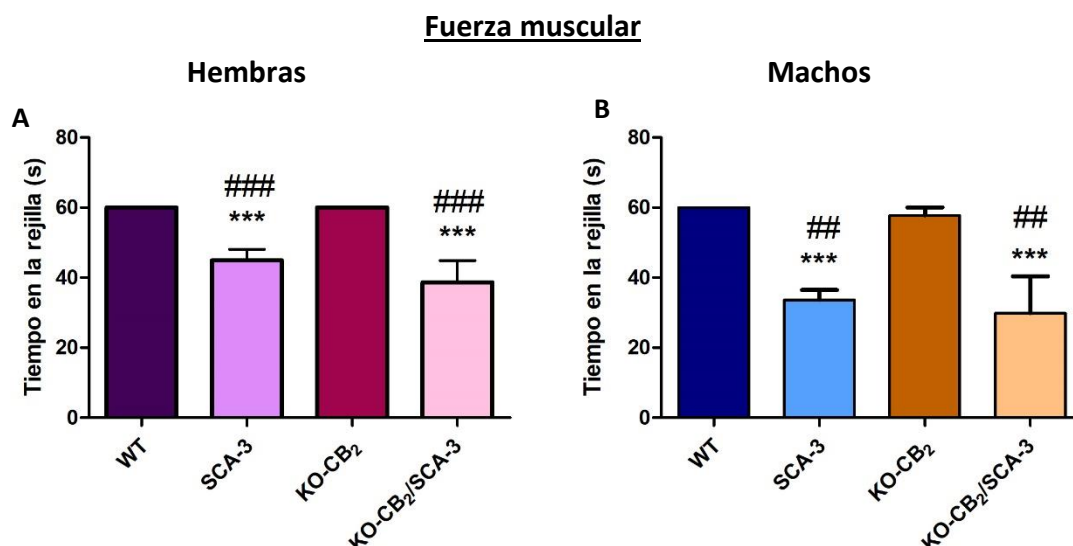


Figura 57. Estudio del efecto de la supresión del receptor CB₂ en la fuerza muscular en (A) hembras (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 6 KO-CB₂/SCA-3) y en (B) machos (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 4 KO-CB₂/SCA-3). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, y el análisis estadístico utilizado fue el ANOVA de una vía seguida de un post-test Bonferroni de comparaciones múltiples (**p<0,001 vs WT; ##p<0,01, ###p<0,001 vs KO-CB₂).

Coordinación motora

La eliminación del receptor CB₂ no produce un efecto sobre la coordinación motora a las 8 semanas de edad, medida mediante el tiempo de permanencia en el rotarod. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el desempeño de esta prueba entre los distintos grupos experimentales, tanto en hembras como en machos (**Figura 58**).

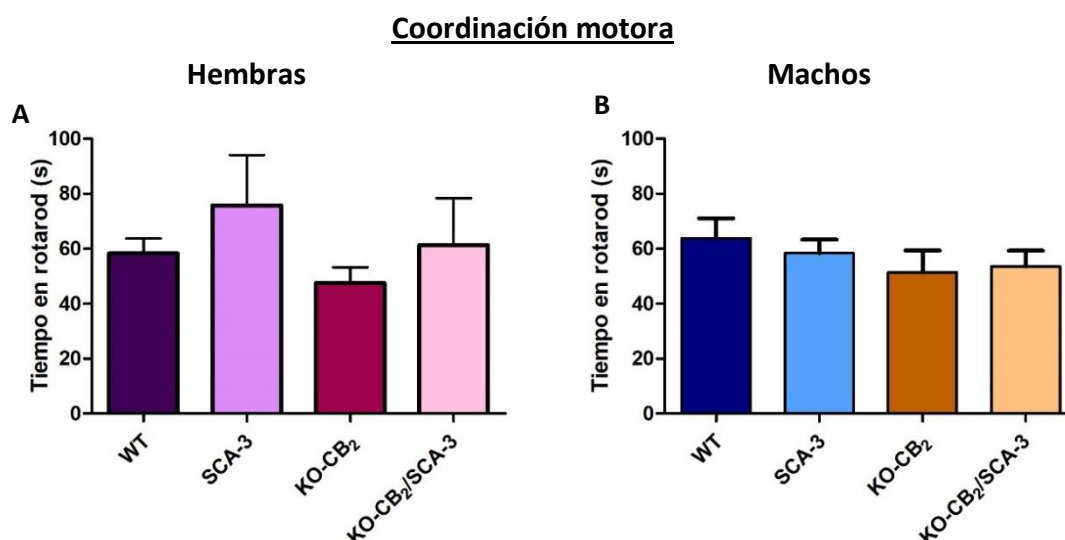


Figura 58. Estudio del efecto de la supresión del receptor CB₂ en la coordinación motora en (A) hembras (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 6 KO-CB₂/SCA-3) y en (B) machos (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 4 KO-CB₂/SCA-3). Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, y el análisis estadístico utilizado fue el ANOVA de una vía seguida de un post-test Bonferroni de comparaciones múltiples.

Aprendizaje motor

En el estudio llevado a cabo para la caracterización del modelo murino de SCA-3 utilizado en esta tesis habíamos visto que a las 8 semanas de edad sólo los ratones macho transgénicos presentan trastornos de aprendizaje motor, no observándose estos déficits en el grupo de las hembras SCA-3, que parecen mantener su capacidad de aprendizaje. La ausencia de receptor CB₂ en las hembras dobles mutantes parece afectar a la capacidad de aprendizaje, ya que en la evolución de la curva correspondiente (**Figura 59 A**) no se produce una mejora significativa en el tiempo que consiguen permanecer en el *rotarod* con el paso de los días. Esto se pone de manifiesto cuando se analiza la relación entre el tiempo que las hembras permanecen sobre el *rotarod* el cuarto día de la prueba respecto al primero (**Figura 59 C**). Podemos observar en este caso en las hembras que sólo el grupo KO-CB₂/SCA-3 presenta signos estadísticamente significativos de dificultades en el aprendizaje motor con respecto a las hembras WT. En el caso de los machos, ya se describió que la enfermedad SCA-3 producía déficits significativos en la tarea de aprendizaje motor a las 8 semanas de edad. En la curva de aprendizaje de los machos (**Figura 59 B**) se observa como los animales SCA-3 no mejoran progresivamente a lo largo de los días su tiempo de permanencia en el *rotarod*. Los machos dobles mutantes presentan un patrón de la curva de aprendizaje un tanto anómalo con respecto de la evolución de los machos WT y KO-CB₂, ya que el primer día de la prueba parecen aguantar más tiempo en el *rotarod* de forma estadísticamente significativa con respecto de los WT, aunque hay que considerar que el comportamiento en este primer día de los dobles mutantes es un tanto heterogéneo como muestra la desviación estadística. Si nos fijamos en el resto de los días no se aprecia un aumento progresivo del tiempo de permanencia en el *rotarod*, lo que muestra que los dobles mutantes tienen, al igual que los machos SCA-3 problemas de aprendizaje motor (**Figura 59 D**). Así pues, sólo en el caso de las hembras la ausencia del receptor CB₂ causaría una aparición más temprana de los déficits en aprendizaje motor observados en el caso de las hembras SCA-3 a partir de las 16 semanas, tal y como hemos visto en los resultados del diseño experimental 1.

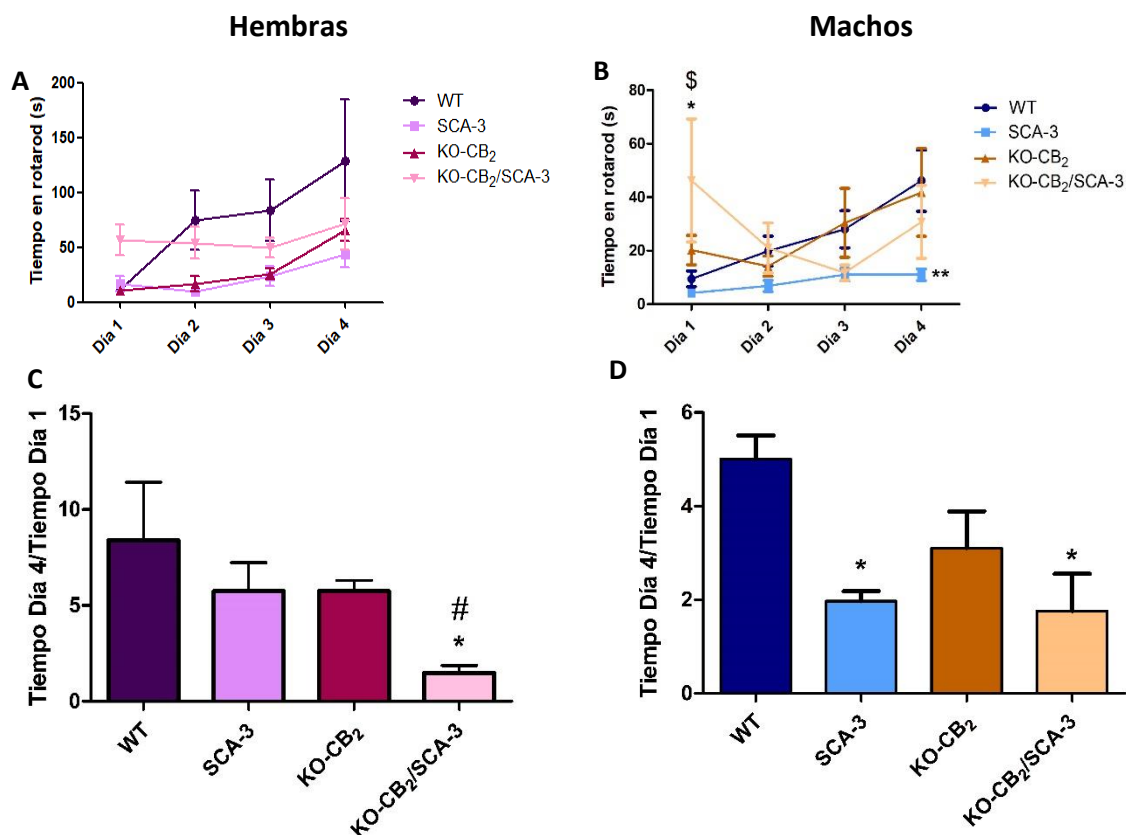
Aprendizaje motor

Figura 59. Estudio del efecto de la supresión del receptor CB₂ en el aprendizaje motor en hembras y en machos. Curva de aprendizaje en (A) hembras (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 6 KO-CB₂/SCA-3) y en (B) machos (6 WT, 6 SCA-3, 6 KO-CB₂, 4 KO-CB₂/SCA-3), y relación entre el tiempo de latencia del día 4 vs día 1 de los ratones (C) hembra y (D) macho. Los datos se expresan como media $\pm$ SEM, y los análisis estadísticos utilizados fueron un ANOVA de una vía o un ANOVA de medidas repetidas seguidos de un post-test Bonferroni de comparaciones múltiples (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs WT; # $p < 0,05$ vs KO-CB₂; \$ $p < 0,05$ vs SCA-3).

DISCUSIÓN

1 Discusión parcial diseño experimental 1. Búsqueda de nuevas potenciales dianas terapéuticas en el SEC en un modelo murino de SCA-3.

El objetivo principal de este diseño experimental ha sido investigar elementos del SEC que pudiesen estar desregulados a lo largo de la enfermedad en un modelo murino SCA-3 de 150 repeticiones. Como paso previo al análisis de los elementos del SEC, hemos llevado a cabo el estudio de la progresión de la sintomatología en este modelo murino, evaluando parámetros neuroconductuales tanto en hembras como en machos, ya que hay evidencias de que existe un dimorfismo sexual en distintas enfermedades neurodegenerativas^{208,209}. Aunque en el caso de la SCA-3, en líneas generales no se han descrito diferencias en ciertos aspectos de la enfermedad (severidad de los síntomas atáxicos, calidad de vida percibida, sintomatología depresiva^{10,229,230}, o en el número de repeticiones entre hombres y mujeres²³¹), sí que se ha observado que el número de signos no atáxicos progresa de manera más rápida en mujeres que en hombres²²⁹.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la SCA-3 se caracteriza principalmente por síntomas motores, como la ataxia. Sin embargo, también se han descrito alteraciones en funciones cognitivas y emocionales en los pacientes que sufren estas enfermedades²⁴⁰. Por ello, hemos incluido en la caracterización del modelo murino de SCA-3 pruebas que permiten evaluar algunas de estas funciones cognitivas y emocionales en estos animales.

1.1 Evaluación del progreso de la enfermedad en un modelo murino de SCA-3

Nuestros datos han demostrado que estos animales no solo desarrollan de forma progresiva los síntomas motores típicos de la SCA-3 ya descritos previamente^{207,213}, sino también síntomas cognitivos y síntomas relacionados con el estado de ánimo similares a los observados en humanos^{84,86,87,241}. Estas alteraciones se observan tanto en machos como en hembras.

A las 8 semanas de edad, los animales transgénicos de ambos sexos presentan una disminución del peso corporal y una pérdida de fuerza en las extremidades (medida mediante la prueba de *hanging wire*) estadísticamente significativos con respecto a los correspondientes controles. A esta edad también aparecen los primeros déficits cognitivos en los animales macho SCA-3, en particular del aprendizaje motor (medido mediante *rotarod* de aprendizaje), y que se

ve reflejado en una disminución del tiempo de permanencia en el *rotarod*, así como en el ratio entre el tiempo de permanencia en el cilindro el último día de la prueba y el primero.

A las 16 semanas de edad ya son evidentes los primeros cambios en el aspecto de los animales SCA-3, y estos empiezan a mostrar distonía (reflejo de *clasp*) y déficits en la coordinación motora (disminución del tiempo de permanencia en el *rotarod*). También comienzan a aparecer alteraciones en el control motor jerárquico (manifestado en un incremento de transiciones incorrectas en el acicalamiento estereotipado en ambos sexos y un incremento en el ratio del número de transiciones por episodio de acicalamiento en el caso de los machos). Además, observamos otros déficits cognitivos como alteraciones en aprendizaje y memoria espacial (incremento en el ratio del tiempo de encuentro de la plataforma del último día respecto al primero, un incremento del tiempo en llegar a la zona de la plataforma y una disminución del número de cruces en la zona de la plataforma) en ambos sexos, así como en el aprendizaje motor en el caso de las hembras (medido mediante *rotarod* de aprendizaje). A esta edad también comienzan a observarse variaciones en el grado de ansiedad en el caso de los machos, evidenciado por un incremento del número de episodios de acicalamiento, así como por una disminución del tiempo total y del tiempo medio por episodio.

A las 32 semanas de edad se ha producido un empeoramiento general de la sintomatología que imposibilita, entre otras, la evaluación del control motor jerárquico y del grado de ansiedad debido a una disminución del acicalamiento de manera drástica y por la aparición de posturas anómalas con la presencia de cifosis.

Este estudio de la evolución de los síntomas de la enfermedad en nuestro modelo nos ha permitido diferenciar tres etapas en la progresión de la enfermedad (**Figura 60**): (i) una primera etapa sintomática temprana, hasta las 8 semanas de edad, en la que se empiezan a apreciar una disminución del peso, de la fuerza muscular, y, en machos, del aprendizaje motor; (ii) una segunda etapa sintomática intermedia, desde las 8 hasta las 16 semanas de edad, en la que además de lo anterior también aparece afectación de la coordinación motora, signos de distonía, alteraciones en el control motor jerárquico, y disminución en la capacidad de aprendizaje y memoria espacial, además de alteraciones en el aprendizaje motor en hembras y en el grado de ansiedad en machos; y (iii) una tercera etapa sintomática tardía, desde las 16 hasta las 32 semanas de edad, en la que se produce un agravamiento progresivo de la sintomatología en general.

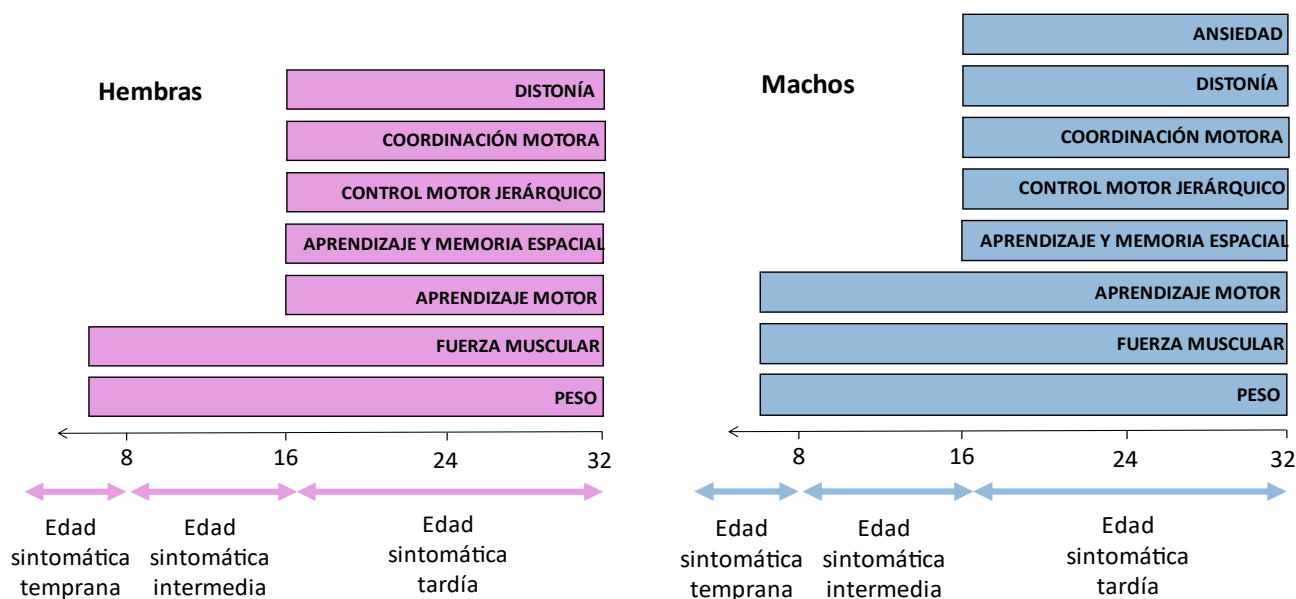


Figura 60. Esquema representativo de las principales alteraciones que aparecen durante el desarrollo de la enfermedad en el modelo de SCA-3, tanto en hembras como en machos. Las barras representan las edades en las que se observan diferencias significativas entre los animales SCA-3 y WT en cada uno de los parámetros estudiados.

Como cabía esperar, el mayor número de repeticiones de nuestro modelo parece estar relacionado con el hecho de que el deterioro neuroconductual en general aparezca a una edad más temprana y de manera más severa que en el modelo de 135 repeticiones anteriormente caracterizado en nuestro laboratorio²⁰⁵⁻²⁰⁷. Además, esto concuerda con lo observado en el caso de la SCA-3 en humanos y en otras enfermedades causadas por este tipo de mutaciones^{4,15,22}. Cabe destacar que en los modelos murinos para la SCA-3 o no se han evaluado funciones cognitivas y/o relacionados con el estado de ánimo^{205,206,213}, o sólo se han descrito algunas de ellas²⁰⁷, a pesar de estar ampliamente descritas en humanos^{84,86}. En esta Tesis Doctoral hemos podido demostrar déficits en el control motor jerárquico, en el aprendizaje motor, y en el aprendizaje y memoria espacial en ambos sexos.

Uno de nuestros principales hallazgos en el modelo murino de SCA-3 es la existencia de alteraciones en el control motor jerárquico, tal y como se ha visto en algunos estudios que puede ocurrir en el caso de los pacientes con ataxia espinocerebelosa^{242,243}. El control motor jerárquico alterado se ve reflejado en una disrupción del patrón altamente estereotipado del comportamiento de acicalamiento en roedores²²³. En concreto, hemos observado un incremento en el porcentaje de transiciones incorrectas en este patrón tanto en hembras como en machos. Estos cambios en el patrón de acicalamiento se relacionan con estructuras como el estriado y el tronco encefálico²²³, ambas afectadas en la SCA-3 tanto en humanos^{21,244} como en el modelo murino de SCA-3 de menor número de repeticiones previamente estudiado en nuestro laboratorio^{205,206}.

A esta alteración del control motor jerárquico hay que añadir un claro deterioro en el aprendizaje motor tanto en hembras como en machos con SCA-3, independiente de su habilidad para llevar a cabo pruebas motoras. Este hallazgo correlaciona con lo que ocurre en los pacientes con SCA-3 u otras ataxias espinocerebelosas^{245–247}, en los que se ha visto además, que una pérdida en el aprendizaje motor es un indicador de severidad de la enfermedad^{246,247}. El aprendizaje motor está altamente relacionado con los ganglios basales y con el cerebelo. Con respecto a los primeros, al adquirir y consolidar una nueva habilidad, los circuitos estriatales sufren una reorganización con cambios en la actividad neuronal en regiones específicas durante las distintas etapas del aprendizaje: en la etapa de adquisición de la habilidad se encuentran más implicadas las regiones asociativas o dorsomediales del estriado, mientras que en la etapa de consolidación intervienen principalmente las regiones sensoriomotoras o dorsolaterales del mismo^{248,249}. Tanto en el modelo murino de SCA-3 con 135 repeticiones^{205,206} previamente caracterizado en nuestro laboratorio como en los pacientes con SCA-3, se ha observado una atrofia generalizada del estriado^{244,250}, por lo que parece posible que puedan existir alteraciones en todas las etapas del aprendizaje. Como se ha mencionado anteriormente, la otra estructura relacionada con el aprendizaje motor es el cerebelo, donde se almacena la información de los procedimientos, codificando información tanto temporal como de velocidad. Esto resulta imprescindible para el ajuste fino del movimiento y para el aprendizaje de tareas motoras a tiempo real^{251,252}. En concreto, las células de Purkinje tienen un papel central, ya que tienen una función integrativa en el control de la coordinación motora y del aprendizaje^{251,252}. Aunque la SCA-3 es un subtipo de SCA que presenta poca afectación en las neuronas de Purkinje^{29,30}, se ha descrito una cierta pérdida de las mismas, especialmente en la corteza del vermis del cerebelo³¹.

Además de todo lo anterior, nuestros resultados avalan que el aprendizaje y la memoria espacial se ven deteriorados en nuestro modelo de SCA-3, en línea con los déficits encontrados en pacientes con distintos tipos de SCAs^{84,86,253,254} y en otro modelo de SCA-3^{220,255}. La principal estructura implicada en aprendizaje y memoria espacial es el hipocampo^{256,257}, que, aunque no es una de las áreas característicamente afectadas en la SCA-3, se ha visto que en pacientes con esta enfermedad es una región que se puede encontrar atrofiada^{250,258}. En nuestro modelo, en estudios paralelos a la presente Tesis Doctoral se ha observado un aumento del número de células de microglía en la región CA1 del hipocampo de los ratones macho SCA-3 respecto a los WT (datos no publicados), lo que parece indicar que existen mecanismos de neuroinflamación. En otros modelos murinos se ha visto que la neuroinflamación favorece la aparición de déficits cognitivos, y que la inhibición de la activación de la microglía puede tener efectos beneficiosos sobre la memoria espacial^{259–261}. Otras estructuras que también se encuentran implicadas en los

procesos de aprendizaje y memoria espacial son el cuerpo estriado, que se relaciona con la adquisición y consolidación de dichos procesos^{256,262}; y el cerebelo, que se cree que puede estar implicado en la consolidación de procesos y en la localización de objetos en el espacio^{263,264}. Ambas estructuras, como ya se ha explicado anteriormente, se encuentran afectadas en pacientes diagnosticados de SCA-3^{21,244} y en ellas se encontraron alteraciones en el modelo de ratón utilizado previamente en nuestro laboratorio^{205,206}.

1.2 Dimorfismo sexual en un modelo murino de SCA-3

Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha estudiado en profundidad la posible influencia del sexo en la SCA-3. En líneas generales podríamos considerar que, en nuestro modelo, salvo en el caso del aprendizaje motor y de la sintomatología relacionada con las emociones, no existen diferencias en la secuencia de aparición de la mayor parte de los síntomas entre los dos géneros. Sin embargo, sí hemos observado otros tipos de diferencias entre machos y hembras en la supervivencia, algunos parámetros de bienestar y en ciertas conductas. Una de estas diferencias destacables sería en relación a la supervivencia ya que, aunque en los animales SCA-3 de ambos sexos se produce una mortalidad más temprana que en los controles, existe un descenso más abrupto y más temprano de la supervivencia en el caso de los machos. Esto concuerda con lo que se ha observado en humanos diagnosticados de SCA-3²⁶⁵, donde no se han encontrado diferencias significativas en la supervivencia entre hombres y mujeres pero se ha visto que las mujeres tienen más probabilidad de llegar a estadios avanzados de la enfermedad que los hombres²⁶⁶.

La pérdida de peso a lo largo de la enfermedad de los ratones SCA-3 con respecto de los controles en nuestro modelo también es un parámetro en el que observamos diferencias entre los dos géneros. Al comparar este parámetro en ambos sexos, nuestros resultados reflejan una menor ganancia de peso en el sexo masculino frente al femenino en relación a sus respectivos controles, como ya ha sido observado en un modelo de SCA-3 con un menor número de repeticiones²⁰⁷.

También parece haber diferencias en función del sexo en el grado de distonía medido por el reflejo de *clasp*, que es otro de los síntomas que presentan los ratones con SCA-3. Nuestros resultados muestran que el grado de distonía es mayor en el caso de los machos SCA-3 que en las hembras transgénicas. Esto concuerda con lo descrito para el modelo de menor número de repeticiones²⁰⁷ y con lo observado en distonías primarias en humanos donde este síntoma aparece de manera severa en hombres^{267,268}. En relación a la edad en la que aparece dicho

reflejo de *clasp* no hemos encontrado diferencias entre géneros, por lo que nos encontramos que esta situación podría estar en contradicción con lo descrito por algunos autores²²⁹, que incluían la distonía en el conjunto de la sintomatología no atáxica y afirmaban que su aparición es más temprana en el caso de las mujeres. Sin embargo, cabe destacar que este estudio se refiere a la aparición temprana del conjunto de la sintomatología no atáxica (distonía, temblor postural, neuropatía periférica y síndrome de las piernas inquietas) sin especificar la aportación específica de cada uno de ellos.

Otro aspecto a considerar es que los ratones transgénicos macho presentan una diferencia más acusada en la fuerza muscular respecto a sus controles que en el caso de las hembras, como ya ha sido descrito para un modelo menos severo de la progresión de la enfermedad²⁰⁷.

En relación al aprendizaje motor nos encontramos con una situación muy particular en cuanto que los animales control, sobre todo a las 16 semanas de edad, presentan un patrón de aprendizaje sexualmente dimórfico. Mientras que las hembras parecen alcanzar niveles más elevados de permanencia en el *rotarod*, llegando a un techo de aprendizaje tras una serie de repeticiones de la prueba, en el caso de los machos el tiempo de permanencia es menor pero en cada entrenamiento se incrementa ese valor, situación que ya ha sido descrita en el caso de los C57BL/6J²⁶⁹. Por otra parte, los machos SCA-3 ya presentan déficits en el aprendizaje motor respecto a sus controles en etapas tempranas de la enfermedad, evidenciado por el hecho de que no son capaces de aprender a permanecer sobre el *rotarod*, mientras que las hembras SCA-3 no presentan estas alteraciones hasta las 16 semanas de edad.

Por otra parte, queremos destacar que, a la vista de nuestros resultados, podría parecer que el control motor jerárquico estudiado mediante el análisis de la microestructura del *grooming*²²³ podría ser otra característica diferencial entre ambos géneros. Sin embargo, la única medida etológica de la actividad de acicalamiento relacionada con la secuencia del *grooming* diferente entre machos y hembras es el número de transiciones por episodio. Dicha medida se obtiene dividiendo el número total de transiciones por el número de episodios de *grooming*. Este último parámetro se utiliza para evaluar la respuesta a diferentes situaciones de estrés^{222,224} y se encuentra incrementado en machos a las 16 semanas respecto a sus controles. Esta diferencia podría estar influenciada por el grado de ansiedad, como ya se ha demostrado en otros estudios en los que se ha visto que la microestructura del comportamiento de acicalamiento es particularmente sensible a los diferentes fármacos ansiolíticos/ansiogénicos²²². Esta influencia del estado de ánimo podría también explicar los incrementos observados, en el

caso de los machos SCA-3, en el tiempo de latencia a la plataforma en los días 3 y 4 de la prueba del *Water Maze* a las 16 semanas. De hecho, la sintomatología depresiva se ha relacionado ya anteriormente con déficits en la memoria y con dificultades en el aprendizaje²⁷⁰.

Respecto a las alteraciones en el grado de ansiedad de los animales SCA-3, hemos podido evidenciar un efecto de género tanto en la secuencia de aparición de este síntoma como en aspectos cualitativos. Los cambios en el estado de ánimo en la SCA-3 han sido ampliamente descritos^{19,77,84–87}. Sin embargo, en relación a esta sintomatología encontramos bastante controversia, desde estudios que describen que es en hombres donde aparece una mayor prevalencia de estos síntomas²⁷¹, lo que estaría en consonancia con nuestros resultados, hasta algún estudio que refiere una influencia del sexo opuesta a lo encontrado en nuestro modelo²⁷². Sin embargo, en este último estudio incluyen también en la muestra a las parejas de los pacientes, que no están genéticamente relacionados. Nuestros resultados concuerdan más con el hecho de que la severidad de la enfermedad está directamente relacionada con la aparición de sintomatología depresiva y con el estrés^{273,274}, que parece ser mayor en el caso de los machos frente a las hembras en nuestro modelo.

1.3 Estudio de la expresión de nuevos elementos del SEC en un modelo murino de SCA-3

Los estudios llevados a cabo en el apartado anterior proporcionan evidencias suficientes para establecer que los ratones transgénicos CMVMJD150 desarrollan un fenotipo equiparable en muchos aspectos al observado en los pacientes afectados por la SCA-3, incluyendo aspectos hasta ahora no estudiados o estudiados de manera puntual. Este modelo presenta una progresión más rápida de la enfermedad que modelos con un menor número de repeticiones^{205,206}, sugiriendo que este modelo animal puede ser un buen modelo para el estudio de la progresión de la enfermedad en sus formas más severas.

Este estudio sería la continuación de lo ya observado en el modelo de menor número de repeticiones, en el que se estudió la expresión de distintos elementos clásicos del SEC: los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y las enzimas implicadas en el metabolismo de endocannabinoides (las enzimas de degradación FAAH y MAGL y las enzimas de síntesis NAPE-PLD y DAGL), además de los niveles de los ligandos endocannabinoides como la AEA y otras dos aciletanolaminas relacionadas, la PEA y la OEA, el 2-AG y su análogo estructural el 2-OG. En este caso hemos querido estudiar en la SCA-3 el estado de otros dos elementos del sistema endocannabinoide como son la enzima de degradación ABHD12 y el receptor GPR55.

En relación a la enzima ABHD12, hemos encontrado que se expresa en los animales control de ambos sexos en áreas donde ya había sido descrita su expresión, como el cerebelo, tronco encefálico, hipocampo^{166,170,239} y estriado²⁷⁵. En todas estas regiones, a excepción del estriado, hemos encontrado cambios en la expresión de ABHD12 en los animales SCA-3 que dependen de la edad y del sexo, pero siempre en estados tempranos o intermedios de la enfermedad.

El cerebelo es una de las estructuras más afectadas en la SCA-3, y en él hemos encontrado alteraciones en la expresión de ABHD12. En esta estructura la expresión de ABHD12 se encuentra disminuida en el núcleo dentado en etapas tempranas de la enfermedad. El que los niveles de ABHD12 estén disminuidos podría llevar a pensar en un posible aumento del endocannabinoide 2-AG. Sin embargo, en el modelo murino de SCA-3 caracterizado en nuestro laboratorio con menor número de repeticiones no se encontraron cambios en los niveles de este endocannabinoide^{205,206}, ni en un modelo KO para ABHD12¹⁷¹. En cualquier caso, no hay que olvidar que el 2-AG no es el único sustrato de la ABHD12, y que el déficit en la expresión de la misma puede estar dando lugar a una desregulación en el metabolismo de otros lípidos, como las lisofosfatidilserinas^{239,276}. De hecho, se ha encontrado un incremento de las lisofosfatidilserinas cerebrales en ratones KO-ABHD12, incremento que se ha relacionado con una posterior activación microglial y déficits motores (descoordinación y debilidad muscular)¹⁷¹. Esto mismo podría estar ocurriendo en el núcleo pontino, que es otra de las estructuras más afectadas en la SCA-3, donde también observamos una disminución en la expresión de ABHD12 a 8 semanas tanto en machos como en hembras SCA-3 y que se mantiene a las 16 semanas en el caso de las hembras transgénicas. La activación microglial descrita por otros autores, podría explicar precisamente el hecho de que la afectación en la coordinación motora y en el control motor jerárquico, que son funciones relacionadas con esas áreas, aparezcan en etapas posteriores en los animales transgénicos. La existencia de esa actividad microglial vendría avalada por la ligera activación de la microglía observada en estudios previos en nuestro laboratorio precisamente en estas áreas y no en otras como el estriado^{205,206} en el modelo de menor número de repeticiones.

Mientras que en las estructuras anteriores la expresión de la enzima ABHD12 se encuentra reducida en los animales SCA-3 ambos sexos con respecto a sus controles, resulta interesante que sólo en el caso de los machos SCA-3 se observa un incremento de la expresión de ABHD12 en dos estructuras: la sustancia blanca del cerebelo y la región CA1 del hipocampo. La sobreexpresión de esta enzima en la sustancia blanca podría localizarse en microglía¹⁶⁹ y oligodendrocitos²⁷⁷. La enzima ABHD12 en esta región podría encontrarse en microglía¹⁶⁹ ya que

en el cerebelo de pacientes de diferentes SCAs la expresión de Iba-1 demuestra un incremento en las células de microglía en la sustancia blanca que rodea al núcleo dentado²⁰⁴. La ABHD12 está también expresada en oligodendrocitos²⁷⁷, por lo que es posible que este incremento en la expresión de ABHD12 ocurra en este tipo celular. En estas células tanto los niveles de 2-AG como la propia enzima ABHD12 se han relacionado con la maduración de los mismos²⁷⁸. Así, este incremento de la expresión de ABHD12, podría estar reduciendo la señalización del 2-AG a través de vías paracrin/autocrinas e interferir en la maduración de los oligodendrocitos²⁷⁸ y explicar alteraciones que se observan en estas células en sustancia blanca incluso en estadios asintomáticos de la SCA-3^{279,280}. Alteraciones en los oligodendrocitos se han observado en otras poliglutaminopatías, como la enfermedad de Huntington, donde se ha visto que la mielina degenera con atrofia de la sustancia blanca. Esto va acompañado de cambios en el número y tasa de recambio de los oligodendrocitos y, alteraciones en la expresión de proteínas características de la mielina²⁸¹. Hay evidencias de que estos defectos en los oligodendrocitos y mielinización se deben a la huntingtina mutada²⁸². En la SCA-3 también se han observado cambios transcripcionales en los oligodendrocitos debido a la ataxina-3 mutada, y con la consecuente afectación de la sustancia blanca²⁸⁰. Esta disfunción de los oligodendrocitos podría promover la disfunción y degeneración de las neuronas²⁸⁰, en concreto las del núcleo dentado, cómo ya se observó en el modelo de menor número de repeticiones²⁰⁵. Tradicionalmente se ha asumido que esta afectación de la sustancia blanca es una consecuencia de la pérdida neuronal progresiva que se manifiesta en etapas avanzadas de la enfermedad. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que este proceso podría aparecer en estadios tempranos^{282,283}. Por último, el incremento de la expresión de la enzima ABHD12 en la región CA1 del hipocampo podría generar una disminución en la señalización 2-AG mediada por el receptor CB₁ en las neuronas o en la señalización 2-AG mediada por el receptor CB₂ en las células gliales¹⁶⁹ en un área rica en 2-AG²⁸⁴ como es esta región, y relacionarse con afectaciones en la memoria observadas en pacientes con SCA-3^{84,86}.

Respecto al otro elemento del SEC estudiado, las áreas en las que se ha encontrado expresión del receptor GPR55 coinciden con lo descrito en la literatura. Así, hemos podido evidenciar la expresión de este receptor en cerebelo, estriado e hipocampo^{136,145} tanto en hembras como en machos en animales control y SCA-3. Sin embargo, aunque parecía un buen candidato para su estudio en la SCA-3, no hemos encontrado alteraciones en su expresión en ninguna de las etapas de la enfermedad, ni en machos ni en hembras.

2 Discusión parcial diseño experimental 2. Estudio del papel del receptor CB₂ en el desarrollo del fenotipo patológico de la SCA-3 mediante la generación de ratones dobles mutantes

El receptor CB₂ ha sido propuesto como una prometedora diana farmacológica para el tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas²¹¹ debido a su demostrada capacidad para mediar en diferentes mecanismos neuroprotectores y a que no está implicado en los efectos psicoactivos de los cannabinoides^{121,210,285}. El objetivo de este diseño ha sido estudiar el papel del receptor CB₂ en la progresión del fenotipo conductual característico de la SCA-3 a una edad sintomática temprana (8 semanas de edad), en la que los animales SCA-3 todavía no manifiestan todas las alteraciones neuroconductuales, tal y como se ha descrito en el diseño experimental 1. El estudio de la implicación del receptor CB₂ podría tener interés para buscar posibles tratamientos que frenen la progresión de la SCA-3 antes de que se produzcan las primeras manifestaciones fenotípicas graves de la enfermedad. Para ello se generaron dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3 y se comparó el fenotipo de éstos con los ratones SCA-3 que no tienen silenciada la expresión del receptor CB₂.

Al analizar el estado de salud de los animales se observó que la ausencia del receptor CB₂ no produce ningún efecto significativo sobre la disminución del peso corporal que, como se describió en el diseño experimental 1, afecta a los ratones SCA-3 de ambos sexos. En el caso de los ratones macho, la disminución de peso corporal se produce de manera uniforme en todos los grupos experimentales en comparación con los WT, viéndose afectados también los animales KO-CB₂, cosa que no se observa en las hembras KO-CB₂. La no influencia en el peso en el caso de animales KO-CB₂ hembras ya ha sido descrita anteriormente²⁸⁶. Por otra parte, en el caso de estudios realizados en ratones macho KO-CB₂, la ausencia de este receptor produce una serie de efectos en el metabolismo que afectan a su ganancia de peso de diferente manera, según dieta y edad estudiada²⁸⁷⁻²⁸⁹.

Otro parámetro referente al estado de salud es el grado de distonía medido por el reflejo de *clasp*ing, que, como vimos en la caracterización de nuestro modelo de SCA-3, no se observa en los animales transgénicos a esta edad sintomática temprana. Sin embargo, la ausencia de receptor CB₂ podría adelantar la aparición de este síntoma en ambos sexos ya que sólo los dobles mutantes KO-CB₂/SCA-3 muestran de forma significativa el reflejo de *clasp*ing. Este reflejo aparece en los roedores que tienen lesiones en estructuras relacionadas con el control motor como cerebelo, ganglios basales y córtex cerebral²⁹⁰. En modelos animales de SCA-3, las

estructuras más implicadas en este signo, que denota daño neurológico, son el cerebelo y el estriado^{290,291}. Parece ser que los circuitos que median esta función son los circuitos cerebelo-cortico-reticular y cortico-estriado-pálido-reticular, en los que juegan un papel fundamental la neurotransmisión monoaminérgica, siendo los principales neurotransmisores implicados la noradrenalina y la serotonina²⁹⁰. Así, se ha descrito que la ausencia de transmisión serotoninérgica está directamente relacionada con la aparición de *claspings*²⁹², y que en los ratones SCA-3 tratados con un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina se produce un alivio de esta sintomatología²⁹³. Por otro lado, se ha descrito que la activación selectiva del receptor CB₂ produce una regulación positiva del receptor serotoninérgico 5HT_{2A}²⁹³, por lo que la ausencia de este receptor podría acelerar la aparición de las alteraciones neurológicas en los dobles mutantes.

La fuerza muscular es uno de los parámetros motores que se ve afectado en los animales transgénicos SCA-3 desde las primeras etapas de la enfermedad. Así los animales SCA-3 de ambos sexos presentan un debilitamiento muscular significativo respecto de los controles. Sin embargo, la ausencia de receptor CB₂ en los dobles mutantes no parece agravar esta sintomatología con respecto de los animales SCA-3 a esta edad en ninguno de los sexos. Sin embargo, en otras enfermedades neurodegenerativas el receptor CB₂ parece tener un efecto neuroprotector con respecto a esta sintomatología. Así, en modelos animales de Parkinson²⁹⁴ la administración de agonistas del receptor CB₂ produce una mejoría en la pérdida de la fuerza muscular. Este efecto también se describió en modelos animales de enfermedad de Huntington²⁹⁵, y los autores del estudio comprobaron que el efecto era mediado exclusivamente por el receptor CB₂ presente en las células periféricas del sistema inmune.

La ausencia de receptor CB₂ tampoco parece tener efecto sobre la coordinación motora a las 8 semanas de edad en ninguno de los sexos. Esta alteración motora aparece en nuestro modelo de SCA-3 a partir de las 16 semanas, donde se produce un agravamiento general de la enfermedad. Por tanto, la ausencia del receptor CB₂ no parece acelerar la progresión de esta sintomatología motora. Esto concuerda con lo observado en estudios previos, anteriormente citados, llevados a cabo en modelos de otras enfermedades neurodegenerativas como Parkinson²⁹⁴ y Huntington²⁹⁵, donde tampoco se observaron cambios mediados por el receptor CB₂ en la prueba de *rotarod* de coordinación. Sin embargo, también hay cierta controversia ya que otros estudios con modelos de enfermedad de Huntington, la administración de agonistas para el receptor CB₂ mejoró la coordinación motora de los animales enfermos y en los dobles mutantes con la enfermedad de Huntington el bloqueo de la expresión del receptor CB₂ produjo un empeoramiento esta función motora²⁹⁶. En la ELA también se han descrito resultados

diferentes, ya que la inactivación farmacológica del receptor CB₂ en un modelo de ratón de esta enfermedad no producía un empeoramiento de la coordinación motora en los ratones enfermos, y, sin embargo, en dobles mutantes de este modelo KO-CB₂ sí que observaban un empeoramiento en los resultados de la prueba de rotarod²⁹⁷.

Como hemos visto en la caracterización de la enfermedad, a las 8 semanas de edad los ratones SCA-3 muestran alteraciones de funciones cognitivas como deterioro en el aprendizaje motor en el caso de los machos. Sin embargo, la ausencia de receptor CB₂ en los machos dobles mutantes no parece agravar el deterioro del aprendizaje motor que se produce por la SCA-3 a esta edad, tal y como muestran los resultados de los dobles mutantes obtenidos en la realización de la prueba de *rotarod* de aprendizaje. Sin embargo, en el caso de las hembras, la ausencia del receptor CB₂ parece adelantar la edad de aparición de este trastorno cognitivo que, como se ha descrito en la caracterización de nuestro modelo, aparece en una fase sintomática intermedia, a partir de las 16 semanas de edad. Así pues, en las hembras el receptor CB₂ sí que podría estar ejerciendo un efecto neuroprotector en las estructuras que median en el aprendizaje motor, como cerebelo y estriado. Este dimorfismo sexual podría deberse a una diferente expresión del receptor CB₂ en machos y hembras. Cabe destacar que los receptores CB₁²⁹⁸ y CB₂²⁹⁹ presentan un patrón de expresión y/o funcional sexualmente dimórfico. Así, se ha descrito en ratas que los niveles basales del receptor CB₂ son mayores en hembras que en machos desde edades tempranas de su desarrollo y que también hay cambios diferentes en este receptor en función del sexo en situaciones patológicas como hipoxia isquémica²⁹⁹ o estrés²⁹⁸, lo cual podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de explicar características sexualmente dimórficas que se encuentran en algunas neuropatologías. A la vista de todo esto, no podríamos descartar que, si los niveles de expresión del receptor CB₂ son mayores en las hembras en edades tempranas, la supresión de este receptor tuviera una mayor repercusión para la SCA-3 en el caso de las hembras, como el que observamos en los dobles mutantes para el caso concreto del aprendizaje motor.

Por todo ello, el receptor CB₂ parece tener un efecto protector sólo en alguno de los síntomas que se manifiestan en nuestro modelo de SCA-3. Los parámetros neuroconductuales donde se ha observado este efecto del receptor CB₂ son la distonía y el aprendizaje motor, y, en este último, sólo en el caso de las hembras. Precisamente, estos parámetros no se encuentran entre los signos patológicos que aparecen afectados en la etapa sintomática temprana de la enfermedad (8 semanas de edad) en nuestro modelo murino de SCA-3, y el hecho de que aparezcan afectados sólo en los dobles mutantes de esta edad, hace sospechar que el receptor CB₂ puede ejercer un efecto neuroprotector en las estructuras que median estas conductas, de

forma que la ausencia de este receptor en los animales SCA-3 puede acelerar la aparición de esta sintomatología a una edad más temprana. En este caso, el receptor CB₂ podría suponer una diana terapéutica prometedora para intentar frenar o retrasar la progresión de esta enfermedad, como se ha demostrado ya para otras enfermedades neurodegenerativas^{294–297}.

Se ha descrito expresión del receptor CB₂ en neuronas de estructuras cerebrales que resultan afectadas por la SCA-3 como cerebelo, ganglios basales y tronco cerebral^{120,300–302}, donde probablemente contribuya a su correcto funcionamiento. Determinados procesos neuropatológicos podrían inducir una sobreexpresión del receptor CB₂ en algunas de estas poblaciones de neuronas. Así, en muestras obtenidas *postmortem* de cerebelos de pacientes diagnosticados de diferentes SCAs se encontró un elevado incremento muy significativo de la expresión del receptor CB₂, en comparación con muestras de controles, en las neuronas de Purkinje y en neuronas del núcleo dentado del cerebelo²⁰³. Este incremento se ha interpretado como un mecanismo compensatorio neuroprotector, por lo que el bloqueo de la expresión del receptor CB₂ en los ratones KO-CB₂/SCA-3 en estas estructuras podría agravar el deterioro y sintomatología de esta enfermedad, al impedir dicho mecanismo neuroprotector. De hecho, en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se ha observado un aumento de la expresión del receptor CB₂^{303,304} que se ha interpretado como mecanismo compensatorio para reducir el daño neuronal, ya que la activación de dicho receptor promueve una serie de mecanismos neuroprotectores.

Por otra parte, se ha descrito que en personas portadoras de la mutación responsable de la SCA-3, pero que todavía se encuentran en fase asintomática, se produce una elevación de la eotaxina, que es una citoquina que puede ser producida por los astrocitos³⁰⁵, lo que sugiere que la respuesta de estas células podría estar mediando en la aparición y progresión de los síntomas de esta enfermedad. Esta activación además se relaciona con un aumento de la gliosis en las regiones del SNC afectadas por la enfermedad. El receptor CB₂ precisamente se expresa principalmente en células de microglía y su activación en estas células podría reducir el daño neurodegenerativo y tener un efecto neuroprotector que podría retrasar o frenar la aparición de la sintomatología.

Los estudios en nuestro modelo con los dobles mutantes son aún muy preliminares y se necesita ampliar el estudio de los efectos de la ausencia de receptor CB₂ a etapas más avanzadas de la enfermedad, con el fin de valorar si la manipulación farmacológica del receptor CB₂ pudiese ser una estrategia prometedora para intentar retrasar o frenar otros síntomas de la enfermedad.

3 Discusión General.

Las ataxias espinocerebelosas son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas de carácter hereditario. La SCA-3 o enfermedad de Machado-Joseph es la forma más prevalente de SCA. La SCA-3 es un trastorno poliQ causado por un exceso de repeticiones CAG que conduce a la expansión de un tracto de poliglutamina en la ataxina-3. Esta proteína tiene una función importante en diversos procesos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis celular y por ello su mutación afecta a la supervivencia celular. A pesar de la expresión ubicua de esta proteína, se ha visto que hay ciertas poblaciones neuronales que son más vulnerables a los efectos de la mutación, localizadas principalmente en el cerebelo (núcleo dentado), en el tronco encefálico (núcleo pontino) y en los ganglios basales (estriado)^{29,32,44,244}. La sintomatología de la SCA-3, ha sido considerada clásicamente de índole motora, e incluye pérdida progresiva de la coordinación motora y anomalías de la marcha, atrofia muscular, espasticidad, hiperreflexia, rigidez y distonía^{8,15,230,306}. Sin embargo, en la actualidad se sabe que existen, además, alteraciones cognitivas como disfunción ejecutiva y emocional^{25,85}. Como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas, para la SCA-3 no existen tratamientos eficaces que frenen el progreso de la enfermedad ni que alivien sus síntomas^{306,307}. Por este motivo, existe una importante necesidad de buscar nuevas terapias dirigidas a frenar o, al menos, a enlentecer la progresión de la enfermedad. Los cannabinoides, a través de la modulación del sistema cannabinoide endógeno, podrían servir en el tratamiento de estas enfermedades en base a sus propiedades neuroprotectoras, ya que se ha descrito que son capaces de reducir procesos citotóxicos como la excitotoxicidad, el daño oxidativo o la inflamación, y de regular la supervivencia neuronal^{101,304}. Además, los cannabinoides resultarían interesantes en las SCAs por su capacidad de regular la transmisión sináptica de los circuitos neuronales implicados en estas enfermedades y que permitirían por ejemplo reducir sintomatología como la descoordinación motora^{106,107}.

Como paso inicial para un posible tratamiento para la SCA-3 basado en cannabinoides es necesario identificar el tipo de alteraciones que se producen en los diferentes elementos del SEC (receptores, ligandos endógenos y enzimas que participan en su metabolismo) a lo largo de las diferentes etapas de la progresión de la enfermedad. Esta Tesis Doctoral se apoya en los datos obtenidos en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio en tejidos *postmortem* de pacientes de SCA y en un modelo de SCA-3 con 135 repeticiones^{203–206}. Estos estudios fueron los primeros que describieron en las SCAs, y en concreto en la SCA-3, una desregulación de los

elementos clásicos del SEC como los receptores CB₁, CB₂, las enzimas de degradación FAAH y MAGL y algunos ligandos endógenos como AEA y OEA. Por tanto, el objetivo de esta Tesis ha sido profundizar más en el estudio del posible potencial terapéutico del SEC en la SCA-3 buscando, por un lado, nuevas dianas farmacológicas entre los elementos que forman parte de este sistema neuromodulador y, por otro, estudiando la posibilidad de utilizar el receptor CB₂ como diana terapéutica en esta enfermedad. Además, siguiendo las normativas que ya existen en algunos Institutos Nacionales de Salud (NIH, del inglés *National Institutes of Health*), hemos considerado el sexo como una variable que puede afectar tanto a la progresión como a la eficacia del tratamiento de la SCA-3, máxime en nuestro caso, ya que existen evidencias de un dimorfismo sexual en el desarrollo y progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas, así como en el propio SEC^{208,209,229,299}.

El modelo de SCA-3 utilizado en esta Tesis es un modelo murino de 150 repeticiones, y, como era esperable, desarrolla la enfermedad con una progresión más rápida y severa que el modelo anterior de 135 repeticiones utilizado previamente en nuestro laboratorio para caracterizar, por primera vez, las alteraciones de los elementos clásicos del SEC en esta enfermedad neurodegenerativa. Además, en este modelo hemos podido constatar que, además de los síntomas típicos de esta enfermedad relacionados con el deterioro de funciones motoras (coordinación, fuerza muscular, distonía) los ratones SCA-3 también muestran un deterioro progresivo de funciones cognitivas y/o emocionales (aprendizaje motor, control motor jerárquico, aprendizaje y memoria espacial y ansiedad). Como ya se ha comentado anteriormente, en los pacientes con SCA-3 cada vez se está estudiando en mayor profundidad, además de su sintomatología motora, el deterioro de funciones cognitivas y/o emocionales^{72,240}, por lo que este modelo murino puede resultar de utilidad para estudiar los mecanismos patológicos de esta enfermedad y avanzar así en la búsqueda de posibles tratamientos que puedan aliviar los síntomas de los pacientes e incluso frenar el progreso de la enfermedad.

En esta Tesis hemos analizado la expresión de dos elementos nuevos relacionados con la actividad del SEC, el receptor GPR55 y la enzima de degradación ABHD12, en el modelo murino de 150 repeticiones. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que, de los dos elementos analizados, únicamente se han encontrado cambios en la expresión de la enzima ABHD12 a lo largo del desarrollo de la SCA-3. Además, al igual que se describió en estudios anteriores, las alteraciones encontradas en esta enzima dependen claramente del contexto celular, ya que los cambios son diferentes en función de las estructuras investigadas. Así, nos encontramos que existen cambios en la expresión de la ABHD12 en dos estructuras típicamente afectadas en la SCA-3 como son el cerebelo y tronco cerebral, cuya degeneración está

relacionada con gran parte de la sintomatología de la SCA-3. En el cerebelo, las alteraciones de esta enzima se han observado en zonas de sustancia gris (núcleo dentado) y de sustancia blanca. Dado que está descrito que esta enzima se expresa fundamentalmente en microglía y que, además, en los ratones SCA-3 de 135 repeticiones se encontró una ligera activación de la microglía en núcleo dentado y núcleo pontino, podríamos considerar que los cambios observados en esta enzima podrían estar relacionados con procesos de neuroinflamación que estarían mediados, como se ha explicado en el diseño experimental 1, por la alteración de los niveles de lisofosfatidilserina. Sin embargo, cabe destacar que en las regiones de sustancia blanca la localización de la enzima ABHD12 podría estar tanto en las células de microglía¹⁶⁹ como en oligodendrocitos²⁷⁷. Por ello, en la sustancia blanca las alteraciones de la expresión de esta enzima podrían estar mediando tanto procesos de neuroinflamación como de mielinización.

A la vista de que en nuestro modelo de SCA-3 se han puesto de manifiesto alteraciones de la memoria espacial, analizamos la expresión de la enzima ABHD12 en áreas de la formación hipocampal. Así encontramos cambios en la expresión de esta enzima en la región CA1. Dado que no se han estudiado otros elementos del SEC en esta estructura en esta patología, sería conveniente analizar si existen cambios en otros elementos.

Los cambios en ABHD12 se han observado fundamentalmente en la etapa temprana e intermedia de la enfermedad. Esto podría sugerir que estas alteraciones estarían relacionadas con eventos tempranos en el desarrollo de la enfermedad.

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se ha observado un aumento de la expresión del receptor CB₂^{303,304} como mecanismo compensatorio para reducir el daño neuronal, ya que la activación de dicho receptor promueve una serie de mecanismos neuroprotectores. Una situación similar podría estar ocurriendo en nuestro caso, ya que la ausencia del receptor CB₂ en los dobles mutantes provoca que la aparición de algunos de los síntomas se adelante (disonía en ambos sexos y déficits del aprendizaje motor en el caso de las hembras), probablemente debido a la eliminación de la protección ejercida por el receptor CB₂. En concreto, la ausencia de este receptor puede conllevar una mayor toxicidad glial en etapas tempranas.

Los resultados obtenidos en los dos diseños experimentales de esta Tesis sugieren la existencia de procesos neuroinflamatorios en las etapas tempranas de la SCA-3. Los datos obtenidos en el diseño experimental de los dobles mutantes abren la posibilidad de que, en la SCA-3, al igual que se ha visto para otras enfermedades neurodegenerativas^{210,211}, el receptor

CB₂ pueda ser considerado una diana farmacológica prometedora. Además de no tener efectos psicotrópicos, la activación del receptor CB₂ puede ser mejor estrategia terapéutica que otras dianas del SEC, ya que reproduciría la respuesta endógena asociada a la elevación de la expresión de este receptor cannabinoide en procesos neurodegenerativos.

Tal y como se recomienda desde los NIH, nuestros resultados avalan la idea de estudiar qué ocurre en la SCA-3 en ambos sexos para poder llegar a aplicar una farmacología eficaz. Así, hemos podido constatar diferencias en la progresión de la enfermedad, en la expresión de elementos del SEC y en las consecuencias de la manipulación de elementos del SEC. En general, hemos observado que en el sexo masculino las alteraciones aparecen en etapas más tempranas y progresan de manera más severa, mientras que en el sexo femenino estas alteraciones aparecen más tarde y/o se mantienen más constantes en el tiempo. De esta manera en machos nos hemos encontrado que aspectos cognitivos (aprendizaje motor) y emocionales aparecen antes en los ratones SCA-3 que en las hembras. También en machos nos encontramos una mayor afectación en etapas tempranas, que se evidencia en las afectaciones de la ganancia de peso, fuerza muscular, grado de distonía y alteraciones en el SEC que no aparecen en el caso de las hembras, en concreto de la expresión de ABHD12 en sustancia blanca del cerebelo y en región CA1 del hipocampo. En el caso de las hembras las alteraciones observadas implican un mantenimiento de la desregulación del SEC (ABHD12 en núcleo pontino) y una diferente respuesta a la ausencia del receptor CB₂ (adelantamiento del déficit en el aprendizaje motor). Estas diferencias parecen indicar que podría ser conveniente plantear una aproximación diferente en cuanto a las estrategias terapéuticas según el sexo.

Varios estudios coinciden en que las SCAs muestran síntomas menores varios años antes de que la patología se manifieste clínicamente^{306,308}. Además, existen evidencias de que las alteraciones a nivel cerebral comienzan a desencadenarse antes de que la sintomatología aparezca y que, como en otras enfermedades progresivas, la degeneración es prácticamente irreversible una vez que la enfermedad se manifiesta clínicamente^{15,21}. La SCA-3, al igual que ocurre en otras SCAs, es una enfermedad de origen genético, por lo que es posible su diagnóstico incluso antes de que las personas lleguen a mostrar los primeros síntomas de la enfermedad. Por ello, en esta patología sería posible realizar una intervención terapéutica temprana. Nuestros resultados avalan que el sistema endocannabinoide podría ser una prometedora estrategia terapéutica en esta enfermedad.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. Nuestros resultados muestran aspectos sexualmente dimórficos en el desarrollo de la patología (síntomatología motora, cognitiva y emocional), en la expresión de elementos no clásicos del SEC (ABHD12), y en la respuesta a la manipulación de elementos clásicos (receptor CB₂).
2. En relación al desarrollo de la SCA-3, los machos presentan una progresión más rápida en la aparición de algunos síntomas, así como una mayor severidad en las manifestaciones de parte de la sintomatología. De esta manera, en los ratones macho SCA-3 se adelanta la manifestación de déficits en aprendizaje motor y emoción. Además, en este sexo la pérdida de peso, el grado de distonía y la debilidad muscular son más evidentes que en el caso de las hembras.
3. De los elementos de señalización cannabinoide no clásicos estudiados, el GPR55 no se ve alterado en la SCA-3 en las estructuras encefálicas y a las edades estudiadas, en ninguno de los dos sexos, mientras que la enzima de degradación de cannabinoides ABHD12 si presenta alteraciones significativas en los animales SCA-3.
4. Las alteraciones en ABHD12 no muestran el mismo tipo de respuesta (disminución/ aumento) en las estructuras, etapas de la enfermedad y sexo estudiados. Esto podría deberse a los diferentes sustratos celulares en los que se puede encontrar esta enzima. Los cambios observados en ABHD12 aparecen en edades tempranas o intermedias de la SCA-3, no así en las fases más avanzadas.
5. En regiones de sustancia gris afectadas en la SCA-3 (núcleo dentado y núcleo pontino) se produce una disminución de la expresión de ABHD12 en edades tempranas en ambos sexos. Esta disminución se mantiene exclusivamente en el caso de las hembras hasta edades intermedias.
6. El aumento de la expresión de la enzima ABHD12, sólo se observa en el caso de los machos, en edades tempranas en sustancia blanca del cerebelo y en etapas intermedias en la región CA1 del hipocampo.
7. La manipulación del SEC mediante el silenciamiento del receptor CB₂ produce un adelantamiento del fenotipo neuropatológico de la SCA-3 en edades tempranas. La ausencia del receptor CB₂, por un lado, afecta a ambos sexos en relación al adelantamiento de la aparición de distonía, mientras que por otro adelanta la aparición de los déficits en el aprendizaje motor a etapas tempranas en el caso de las hembras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Klockgether, T., Mariotti, C. & Paulson, H. L. Spinocerebellar ataxia. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **5**, 1–21 (2019).
2. Seidel, K. *et al.* Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathologica* vol. 124 1–21 (2012).
3. Sullivan, R., Wai, ·, Yau, Y., Emer O’connor, · & Houlden, H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J. Neurol.* **266**, 533–544 (2019).
4. Van De Warrenburg, B. P. C. *et al.* Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: A study in a Dutch-French cohort. *Ann. Neurol.* **57**, 505–512 (2005).
5. Durr, A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Polyglutamine expansions and beyond. *The Lancet Neurology* vol. 9 885–894 (2010).
6. Diallo, A. *et al.* Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* **17**, 327–334 (2018).
7. Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T. & Riess, O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurology* vol. 3 291–304 (2004).
8. Matilla-Dueñas, A. *et al.* Consensus Paper: Pathological Mechanisms Underlying Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum* **13**, 269 (2014).
9. Matos, C., Pereira de Almeida, L. & Nóbrega, C. Polyglutamine Disorders. *J. Neurochem.* **1049**, 395–438 (2018).
10. Gan, S. R. *et al.* The impact of ethnicity on the clinical presentations of spinocerebellar ataxia type 3. *Park. Relat. Disord.* **72**, 37–43 (2020).
11. Ruano, L., Melo, C., Silva, M. C. & Coutinho, P. The Global Epidemiology of Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia: A Systematic Review of Prevalence Studies. *Neuroepidemiology* **42**, 174–183 (2014).
12. Sequeiros, J., Martins, S. & Silveira, I. Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 103 227–251 (Elsevier B.V., 2012).
13. Nakano, K. K., Dawson, D. M. & Spence, A. Machado disease: A hereditary ataxia in portuguese emigrants to massachusetts. *Neurology* **22**, 49–55 (1972).
14. Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C. & Shore, P. Autosomal dominant striatonigral degeneration: A ctinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology* **26**, 703–714 (1976).
15. Bettencourt, C. & Lima, M. Machado-Joseph disease: From first descriptions to new perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases* vol. 6 35 (2011).
16. Kawaguchi, Y. *et al.* CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat. Genet.* **8**, 221–228 (1994).
17. Masino, L. *et al.* Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: A globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett.* **549**, 21–25 (2003).
18. Durcan, T. M. & Fon, E. A. Ataxin-3 and Its E3 Partners: Implications for Machado–Joseph Disease. *Front. Neurol.* **0**, 46 (2013).
19. Dürr, A. *et al.* Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: Clinical, molecular,

- and neuropathological features. *Ann. Neurol.* **39**, 490–499 (1996).
20. Coarelli, G., Brice, A. & Durr, A. Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view. *F1000 Res.* **7**, (2018).
 21. Da Silva, J. D., Teixeira-Castro, A. & Maciel, P. From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics* vol. 16 1009–1031 (2019).
 22. Tezenas Du Montcel, S. *et al.* Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain* **137**, 2444–2455 (2014).
 23. Maciel, P. *et al.* Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur. J. Hum. Genet.* **7**, 147–56 (1999).
 24. Igarashi, S. *et al.* Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 923–932 (1996).
 25. Pedroso, J. L. *et al.* Nonmotor and extracerebellar features in Machado-Joseph disease: A review. *Mov. Disord.* **28**, 1200–1208 (2013).
 26. Li, X., Liu, H., Fischhaber, P. L. & Tang, T.-S. Toward therapeutic targets for SCA3: Insight into the role of Machado-Joseph disease protein ataxin-3 in misfolded proteins clearance. *Prog. Neurobiol.* **132**, 34–58 (2015).
 27. Sicorello, A. *et al.* The Structural Properties in Solution of the Intrinsically Mixed Folded Protein Ataxin-3. *Biophys. J.* **115**, 59–71 (2018).
 28. Fowler, H. L. Machado-Joseph-Azorean Disease: A Ten-Year Study. *Arch. Neurol.* **41**, 921–925 (1984).
 29. Taroni, F. & DiDonato, S. Pathways to motor incoordination: The inherited ataxias. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 641–655 (2004).
 30. Paulson, H. Machado-Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Handb Clin Neurol.* **103**, 437–449 (2012).
 31. Muñoz, E. *et al.* Intranuclear inclusions, neuronal loss and CAG mosaicism in two patients with Machado-Joseph disease. *J. Neurol. Sci.* **200**, 19–25 (2002).
 32. Koeppen, A. H. The neuropathology of spinocerebellar ataxia type 3/machado-joseph disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1049**, 233–241 (2018).
 33. Bichelmeier, U. *et al.* Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: In vivo evidence. *J. Neurosci.* **27**, 7418–7428 (2007).
 34. McCord, M. R. *et al.* Spinocerebellar Ataxia Type 3: A Case Report and Literature Review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **0**, 1–7 (2020).
 35. Takahashi, J. *et al.* Recruitment of Nonexpanded Polyglutamine Proteins to Intranuclear Aggregates in Neuronal Intranuclear Hyaline Inclusion Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, (2001).
 36. Yang, H. *et al.* Aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3 sequesters its specific interacting partners into inclusions: Implication in a loss-of-function pathology. *Sci. Rep.* **4**, (2014).

37. Uchihara, T. *et al.* Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias - Triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol.* **102**, 149–152 (2001).
38. Nobrega, C. *et al.* Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* **138**, 3537–3554 (2015).
39. Morfini, G., Pigino, G. & Brady, S. T. Polyglutamine expansion diseases: Failing to deliver. *Trends Mol. Med.* **11**, 64–70 (2005).
40. Klockgether, T. *et al.* Age related axonal neuropathy in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease (SCA3/MJD). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **66**, 222–224 (1999).
41. D'Abreu, A., França, M., Appenzeller, S., Lopes-Cendes, I. & Cendes, F. Axonal dysfunction in the deep white matter in Machado-Joseph disease. *J. Neuroimaging* **19**, 9–12 (2009).
42. Seidel, K. *et al.* Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol.* **120**, 449–460 (2010).
43. Seidel, K. *et al.* Cellular protein quality control and the evolution of aggregates in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **38**, 548–558 (2012).
44. Seidel, K. *et al.* Polyglutamine aggregation in Huntington's disease and spinocerebellar ataxia type 3: Similar mechanisms in aggregate formation. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **42**, 153–166 (2016).
45. Silva, A., de Almeida, A. V. & Macedo-Ribeiro, S. Polyglutamine expansion diseases: More than simple repeats. *J. Struct. Biol.* **201**, 139–154 (2018).
46. Todi, S. V. *et al.* Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *EMBO J.* **28**, 372–382 (2009).
47. Kristensen, L. V., Oppermann, F. S., Rauen, M. J., Hartmann-Petersen, R. & Thirstrup, K. Polyglutamine expansion of ataxin-3 alters its degree of ubiquitination and phosphorylation at specific sites. *Neurochem. Int.* **105**, 42–50 (2017).
48. Almeida, B. *et al.* SUMOylation of the brain-predominant Ataxin-3 isoform modulates its interaction with p97. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1852**, 1950–1959 (2015).
49. Matos, C. A., de Almeida, L. P. & Nóbrega, C. Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *J. Neurochem.* **148**, 8–28 (2019).
50. Matos, C. A., Pereira de Almeida, L. & Nobrega, C. Proteolytic Cleavage of Polyglutamine Disease-Causing Proteins: Revisiting the Toxic Fragment Hypothesis. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 753–775 (2017).
51. Haacke, A. *et al.* Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 555–568 (2006).
52. Evers, M. M. *et al.* Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: Removal of the CAG containing exon. *Neurobiol. Dis.* **58**, 49–56 (2013).
53. Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S. & Carvalho, A. L. Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog. Neurobiol.* **95**, 26–48 (2011).

54. Chou, A. H., Chen, Y. L., Hu, S. H., Chang, Y. M. & Wang, H. L. Polyglutamine-expanded ataxin-3 impairs long-term depression in Purkinje neurons of SCA3 transgenic mouse by inhibiting HAT and impairing histone acetylation. *Brain Res.* **1583**, 220–229 (2014).
55. Jung, J. & Bonini, N. CREB-binding protein modulates repeat instability in a Drosophila model for polyQ disease. *Science (80-.).* **315**, 1857–1859 (2007).
56. Riley, B. E. & Orr, H. T. Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: Assembling the puzzle. *Genes Dev.* **20**, 2183–2192 (2006).
57. Chen, X. *et al.* Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci.* **28**, 12713–12724 (2008).
58. Shakkottai, V. G. *et al.* Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurosci.* **31**, 13002–13014 (2011).
59. Yu, Y. C., Kuo, C. L., Cheng, W. L., Liu, C. S. & Hsieh, M. Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *J. Neurosci. Res.* **87**, 1884–1891 (2009).
60. Laço, M. N., Oliveira, C. R., Paulson, H. L. & Rego, A. C. Compromised mitochondrial complex II in models of Machado-Joseph disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**, 139–149 (2012).
61. Hsu, J. Y. *et al.* The truncated C-terminal fragment of mutant ATXN3 disrupts mitochondria dynamics in spinocerebellar ataxia type 3 models. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, (2017).
62. Ravikumar, B., Duden, R. & Rubinsztein, D. C. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1107–1117 (2002).
63. Cortes, C. J. & La Spada, A. R. Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Molecular and Cellular Neuroscience* vol. 66 53–61 (2015).
64. Nascimento-Ferreira, I. *et al.* Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *BRAIN. A J. Neurol.* **134**, 1400–1415 (2011).
65. Mori, F. *et al.* Autophagy-related proteins (p62, NBR1 and LC3) in intranuclear inclusions in neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* **522**, 134–138 (2012).
66. Ashkenazi, A. *et al.* Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature* **545**, 108–111 (2017).
67. Coutinho, P. & Andrade, C. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands: A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* **28**, 703–709 (1978).
68. Suite, N. D. A., Sequeiros, J. & Mckhann, G. M. Machado-joseph disease in a sicilian-american family. *J. Neurogenet.* **3**, 177–182 (1986).
69. Sakai, T. & Kawakami, H. Machado-Joseph disease: A proposal of spastic paraplegic subtype. *Neurology* **46**, 846–7 (1996).
70. Radvany, J., Camargo, C. H., Costa, Z. M., Fonseca, N. C. & Nascimento, E. D. Machado-

- Joseph disease of Azorean ancestry in Brazil: the Catarina kindred. Neurological, neuroimaging, psychiatric and neuropsychological findings in the largest known family, the 'Catarina' kindred. *Arq. Neuropsiquiatr.* **51**, 21–30 (1993).
71. Maruff, P. *et al.* Cognitive deficits in Machado-Joseph disease. *Ann. Neurol.* **40**, 421–427 (1996).
 72. Moro, A. *et al.* Nonmotor symptoms in spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum and Ataxias* **6**, (2019).
 73. Fernandez-Ruiz, J. *et al.* Olfactory dysfunction in hereditary ataxia and basal ganglia disorders. *Neuroreport* **14**, 1339–1341 (2003).
 74. Braga-Neto, P. *et al.* Clinical correlates of olfactory dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *Park. Relat. Disord.* **17**, 353–356 (2011).
 75. Moscovich, M. *et al.* Olfactory impairment in familial ataxias. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **83**, 970–974 (2012).
 76. Friedman, J. H. & Amick, M. M. Fatigue and daytime somnolence in Machado Joseph Disease (spinocerebellar ataxia type 3). *Mov. Disord.* **23**, 1323–1324 (2008).
 77. Martinez, A. R. M. *et al.* Fatigue and Its Associated Factors in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *Cerebellum* **16**, 118–121 (2017).
 78. D'Abreu, A. *et al.* Sleep symptoms and their clinical correlates in Machado-Joseph disease. *Acta Neurologica Scandinavica* vol. 119 277–280 (2009).
 79. Pedroso, J. L. *et al.* Sleep disorders in Machado-Joseph disease: Frequency, discriminative thresholds, predictive values, and correlation with ataxia-related motor and non-motor features. *Cerebellum* **10**, 291–295 (2011).
 80. D'Abreu, A., Friedman, J. & Coskun, J. Non-movement disorder heralds symptoms of Macho-Joseph disease year before ataxia. *Mov. Disord.* **20**, 739–741 (2005).
 81. Manto, M. & Molinari, M. Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders. *Springer* **1**, 499–512 (2016).
 82. Grimaldi, G. & Manto, M. Topography of cerebellar deficits in humans. *Cerebellum* **11**, 336–351 (2012).
 83. Bürk, K. *et al.* Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. *J. Neurol.* **250**, 207–211 (2003).
 84. Kawai, Y. *et al.* Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch. Neurol.* **61**, 1757–1760 (2004).
 85. Zawacki, T. M., Grace, J., Friedman, J. H. & Sudarsky, L. Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease. *Mov. Disord.* **17**, 1004–1010 (2002).
 86. Kawai, Y., Suenaga, M., Watanabe, H. & Sobue, G. Cognitive impairment in spinocerebellar degeneration. *Eur. Neurol.* **61**, 257–268 (2009).
 87. Klinker, I. *et al.* Neuropsychological features of patients with spinocerebellar ataxia (SCA) types 1, 2, 3, and 6. *Cerebellum* **9**, 433–442 (2010).
 88. Fernández-Ruiz, J., Romero, J. & Ramos, J. A. Endocannabinoids and neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, huntington's chorea, alzheimer's disease, and others. *Endocannabinoids* **12**, 233–259 (2015).

89. Fernández-Ruiz, J., Gómez-Ruiz, M., García, C., Hernández, M. & Ramos, J. A. Modeling Neurodegenerative Disorders for Developing Cannabinoid-Based Neuroprotective Therapies. *Methods Enzymol.* **593**, 175–198 (2017).
90. Ye, L., Cao, Z., Wang, W. & Zhou, N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr. Mol. Pharmacol.* **12**, 239–248 (2019).
91. Gaoni, Y. & Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647 (1964).
92. Mechoulam, R. & Shvo, Y. Hashish-I. The structure of Cannabidiol. *Tetrahedron* **19**, 2073–2078 (1963).
93. Cristino, L., Bisogno, T. & Di Marzo, V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **16**, 9–29 (2020).
94. Lambert, D. M. & Fowler, C. J. The endocannabinoid system: Drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J. Med. Chem.* **48**, 5059–5087 (2005).
95. Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S. & Howlett, A. C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.* **34**, (1988).
96. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C. & Bonner, T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564 (1990).
97. Munro, S., Thomas, K. L. & Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61–65 (1993).
98. Devane, W. A. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (80-.)*. **258**, 1946–1949 (1992).
99. Mechoulam, R. *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83–90 (1995).
100. Sugiura, T. *et al.* 2-arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 89–97 (1995).
101. Fernández-Ruiz, J., García, C., Sagredo, O., Gómez-Ruiz, M. & de Lago, E. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 387–404 (2010).
102. Ledent, C. *et al.* Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science (80-.)*. **283**, 401–404 (1999).
103. Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M. & Bonner, T. I. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5780–5785 (1999).
104. Buckley, N. E. *et al.* Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **396**, 141–149 (2000).
105. Lutz, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **66**, 123–142 (2002).
106. Howlett, A. C. & Abood, M. E. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Adv. Pharmacol.* **80**, 169–206 (2017).
107. Zou, S. & Kumar, U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling

- and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
108. van der Stelt, M. & Di Marzo, V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* **7**, 37–50 (2005).
 109. Pertwee, R. G. Endocannabinoids. *Springer* 61–82 (2015) doi:10.1007/978-3-319-20825-1.
 110. Silver, R. J. The Endocannabinoid System of Animals. *Animals* **9**, 686 (2019).
 111. Szabo, B. & Schlicker, E. Effects of Cannabinoids on Neurotransmission. *Cannabinoids* **13**, 327–365 (2005).
 112. Mackie, K. Distribution of Cannabinoid Receptors in the Central and Peripheral Nervous System. in *Cannabinoids* 299–325 (Springer-Verlag, 2005). doi:10.1007/3-540-26573-2_10.
 113. Melser, S. *et al.* Functional Analysis of Mitochondrial CB1 Cannabinoid Receptors (mtCB1) in the Brain. *Methods Enzymol.* **593**, 143–174 (2017).
 114. Djeungoue-Petga, M. & Hebert-Chatelain, E. Linking Mitochondria and Synaptic Transmission: The CB1 Receptor. *Bioessays* **39**, (2017).
 115. Zhang, H. Y. *et al.* Species differences in cannabinoid receptor 2 and receptor responses to cocaine self-administration in mice and rats. *Neuropsychopharmacology* **40**, 1037–1051 (2015).
 116. Galiègue, S. *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **232**, 54–61 (1995).
 117. Scheller, A. & Kirchhoff, F. Endocannabinoids and heterogeneity of glial cells in brain function. *Front. Integr. Neurosci.* **10**, 24 (2016).
 118. Atwood, B. K. & MacKie, K. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 467–479 (2010).
 119. Chen, D. J., Gao, M., Gao, F. F., Su, Q. X. & Wu, J. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017 383** **38**, 312–316 (2017).
 120. García, M. C., Cinquina, V., Palomo-Garo, C., Rábano, A. & Fernández-Ruiz, J. Identification of CB₂ receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **587**, 1–4 (2015).
 121. Ashton, J. C. & Glass, M. The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **5**, 73 (2007).
 122. Pacher, P., Bátkai, S. & Kunos, G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* **58**, 389–462 (2006).
 123. Morales, P. & Reggio, P. H. An Update on Non-CB 1 , Non-CB 2 Cannabinoid Related G-Protein-Coupled Receptors . *Cannabis Cannabinoid Res.* **2**, 265–273 (2017).
 124. Sawzdargo, M. *et al.* Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, Ψ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol. Brain Res.* **64**, 193–198 (1999).
 125. Baker, D., Pryce, G., Davies, W. L. & Hiley, C. R. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 1–4 (2006).

126. Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S. & Sugiura, T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362**, 928–934 (2007).
127. Ryberg, E. *et al.* The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1092–1101 (2007).
128. Lauckner, J. E. *et al.* GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2699–2704 (2008).
129. Yin, H. *et al.* Lipid G protein-coupled receptor ligand identification using β -arrestin PathHunter™ assay. *J. Biol. Chem.* **284**, 12328–12338 (2009).
130. Marichal-Cancino, B. A. *et al.* Analysis of anandamide- and lysophosphatidylinositol-induced inhibition of the vasopressor responses produced by sympathetic stimulation or noradrenaline in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* **721**, 168–177 (2013).
131. Pérez-Gómez, E. *et al.* The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas. *Oncogene* **32**, 2534–2542 (2013).
132. Whyte, L. *et al.* The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16511–16516 (2009).
133. Liu, B., Song, S., Jones, P. M. & Persaud, S. J. GPR55: From orphan to metabolic regulator? *Pharmacol. Ther.* **145**, 35–42 (2015).
134. Sanger, G. J. Endocannabinoids and the gastrointestinal tract: what are the key questions? *Br. J. Pharmacol.* **152**, 663 (2007).
135. Staton, P. *et al.* The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain* **139**, 225–236 (2008).
136. Marichal-Cancino, B. A., Fajardo-Valdez, A., Ruiz-Contreras, A. E., Mendez-Díaz, M. & Prospero-García, O. Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 771–778 (2016).
137. Kallendrusch, S. *et al.* The G protein-coupled receptor 55 ligand 1- α -lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. *Glia* **61**, 1822–1831 (2013).
138. Cherif, H. *et al.* Role of GPR55 during axon growth and target innervation. *eNeuro* **2**, (2015).
139. Guy, A. T. *et al.* Glycerophospholipid regulation of modality-specific sensory axon guidance in the spinal cord. *Science (80-.).* **349**, 974–977 (2015).
140. Leroy, C. *et al.* The 2q37-deletion syndrome: An update of the clinical spectrum including overweight, brachydactyly and behavioural features in 14 new patients. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 602–612 (2013).
141. Sylantsev, S., Jensen, T. P., Ross, R. A. & Rusakov, D. A. Cannabinoid- and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5193–5198 (2013).
142. Henstridge, C. *et al.* GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 604–614 (2010).
143. Wu, C. S. *et al.* GPR55, a G-Protein Coupled Receptor for Lysophosphatidylinositol, Plays

- a Role in Motor Coordination. *PLoS One* **8**, (2013).
144. Bjursell, M. *et al.* Deletion of Gpr55 results in subtle effects on energy metabolism, motor activity and thermal pain sensation. *PLoS One* **11**, 1–16 (2016).
 145. Marichal-Cancino, B. A., Sánchez-Fuentes, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E. & Prospéro-García, O. Blockade of GPR55 in the dorsolateral striatum impairs performance of rats in a T-maze paradigm. *Behav. Pharmacol.* **27**, 393–396 (2016).
 146. Marco, E. *et al.* Consequences of early life stress on the expression of endocannabinoid-related genes in the rat brain. *Behav. Pharmacol.* **25**, 547–556 (2014).
 147. Howlett, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews* vol. 54 161–202 (2002).
 148. Fezza, F. *et al.* Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* vol. 19 17078–17106 (2014).
 149. Zygmunt, P. M. *et al.* Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A Link between Phospholipase C and TRPV1. *PLoS One* **8**, e81618 (2013).
 150. Bisogno, T. *et al.* N-acyl-dopamines : novel synthetic CB 1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem. J* **351**, 817–824 (2000).
 151. Hanus, L. *et al.* 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 3662–3665 (2001).
 152. Porter, A. C. *et al.* Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 1020–1024 (2002).
 153. De Petrocellis, L., Cascio, M. G. & Di Marzo, V. The endocannabinoid system: A general view and latest additions. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 765–774 (2004).
 154. Wilson, R. I. & Nicoll, R. A. Neuroscience: Endocannabinoid signaling in the brain. *Science (80-.)*. **296**, 678–682 (2002).
 155. Kano, M. Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **90**, 235–250 (2014).
 156. Blankman, J. L. & Cravatt, B. F. Chemical Probes of Endocannabinoid Metabolism. (2013) doi:10.1124/pr.112.006387.
 157. Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A. & Rodríguez De Fonseca, F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 218–224 (2000).
 158. Bisogno, T. *et al.* Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* **163**, 463–468 (2003).
 159. Cravatt, B. F. *et al.* Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**, 83–87 (1996).
 160. Dinh, T. P. *et al.* Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10819–10824 (2002).
 161. Fowler, C. J. & Jacobsson, S. O. P. Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide - Targets for drug development? *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **66**, 193–200 (2002).

162. Hillard, C. J., Wilkison, D. M., Edgemond, W. S. & Campbell, W. B. Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1257**, 249–256 (1995).
163. Gulyas, A. I. *et al.* Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 441–458 (2004).
164. Tsou, K. *et al.* Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* **254**, 137–140 (1998).
165. Hillard, C. J. The Endocannabinoid Signaling System in the CNS: A Primer. *Int. Rev. Neurobiol.* **125**, 1–47 (2015).
166. Blankman, J. L., Simon, G. M. & Cravatt, B. F. A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* **14**, 1347–1356 (2007).
167. Kind, L. & Kursula, P. Structural properties and role of the endocannabinoid lipases ABHD6 and ABHD12 in lipid signalling and disease. *Amino Acids* **51**, 151–174 (2018).
168. Savinainen, J. R., Saario, S. M. & Laitinen, J. T. The serine hydrolases MAGL, ABHD6 and ABHD12 as guardians of 2-arachidonoylglycerol signalling through cannabinoid receptors. *Acta Physiol.* **204**, 267–276 (2012).
169. Navia-Paldanius, D., Savinainen, J. R. & Laitinen, J. T. Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *J. Lipid Res.* **53**, 2413–2424 (2012).
170. Fiskerstrand, T. *et al.* Mutations in ABHD12 cause the neurodegenerative disease PHARC: An inborn error of endocannabinoid metabolism. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 410–417 (2010).
171. Blankman, J. L., Long, J. Z., Trauger, S. A., Siuzdak, G. & Cravatt, B. F. ABHD12 controls brain lysophosphatidylserine pathways that are deregulated in a murine model of the neurodegenerative disease PHARC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1500–1505 (2013).
172. Chen, D. *et al.* Two Novel Mutations in ABHD12: Expansion of the Mutation Spectrum in PHARC and Assessment of their Functional Effects. *Hum. Mutat.* **34**, 1672–1678 (2014).
173. Tingaud-Sequeira, A. *et al.* Functional validation of ABHD12 mutations in the neurodegenerative disease PHARC. *Neurobiol. Dis.* **98**, 36–51 (2017).
174. Guindon, J. & Hohmann, A. G. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *British Journal of Pharmacology* vol. 153 1341–1343 (2008).
175. Zelasko, S., Arnold, W. R. & Das, A. Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **116–117**, 112–123 (2015).
176. Pertwee, R. G. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews* vol. 62 588–631 (2010).
177. Fernández-Ruiz, J., Galve-Roperh, I., Sagredo, O. & Guzmán, M. Possible therapeutic applications of cannabis in the neuropsychopharmacology field. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **36**, 217–234 (2020).

178. Sañudo-Peña, M., Romero, J., Seale, G., Fernandez-Ruiz, J. & Walker, J. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur. J. Pharmacol.* **391**, 269–274 (2000).
179. Patel, S. & Hillard, C. J. Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 629–637 (2001).
180. Ranganathan, M. & D'Souza, D. The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. *Psychopharmacology (Berl)*. **188**, 425–444 (2006).
181. Kano, M., Ohno-Shosaku, T., Hashimotodani, Y., Uchigashima, M. & Watanabe, M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiological Reviews* vol. 89 309–380 (2009).
182. Deadwyler, S. A. & Hampson, R. E. Endocannabinoids modulate encoding of sequential memory in the rat hippocampus. *Psychopharmacology (Berl)*. **198**, 577–586 (2008).
183. Hampson, R. Short-term memory is modulated by the spontaneous release of endocannabinoids: Evidence from hippocampal population codes. *Behav. Pharmacol.* **18**, 571–580 (2007).
184. Robbe, D. *et al.* Cannabinoids reveal importance of spike timing coordination in hippocampal function. *Nat. Neurosci.* **9**, 1526–1533 (2006).
185. Campolongo, P. *et al.* Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *PNAS Neurosci.* **106**, 8027–8031 (2009).
186. Marsicano, G. & Lafenêtre, P. Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **1**, 201–230 (2009).
187. Chadwick, V., Rohleder, C., Koethe, D. & Leweke, F. Cannabinoids and the endocannabinoid system in anxiety, depression, and dysregulation of emotion in humans. *Curr. Opin. Psychiatry* **33**, 20–42 (2020).
188. Moreira, F. A. & Lutz, B. The endocannabinoid system: Emotion, learning and addiction. *Addict. Biol.* **13**, 196–212 (2008).
189. Aymerich, M. S. *et al.* Cannabinoid pharmacology/therapeutics in chronic degenerative disorders affecting the central nervous system. *Biochem. Pharmacol.* **157**, 67–84 (2018).
190. Fernández-Ruiz, J. The biomedical challenge of neurodegenerative disorders: an opportunity for cannabinoid-based therapies to improve on the poor current therapeutic outcomes. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 1370–1383 (2019).
191. Velasco, G., Sánchez, C. & Guzmán, M. Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Curr. Oncol.* **23**, S23–S32 (2016).
192. Dong, X., Wang, Y. & Qin, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* 2009 304 **30**, 379–387 (2009).
193. Di Marzo, V., Stella, N. & Zimmer, A. Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 30–42 (2015).
194. Klein, T. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 400–411 (2005).
195. García-Arencibia, M. *et al.* Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res.* **1134**, 162–170 (2007).

196. Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I. & Skrzydlewska, E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants* **9**, (2019).
197. Menzies, F. M. *et al.* Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain* **133**, 93 (2010).
198. Costa, L., Amaral, C., Teixeira, N., Correia-Da-Silva, G. & Fonseca, B. M. Cannabinoid-induced autophagy: Protective or death role? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **122**, 54–63 (2016).
199. Mechoulam, R. & Shohami, E. Endocannabinoids and traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* **36**, 68–74 (2007).
200. Leker, R. R., Gai, N., Mechoulam, R. & Ovadia, H. Drug-Induced Hypothermia Reduces Ischemic Damage: Effects of the Cannabinoid World Wide Web at: Drug-Induced Hypothermia Reduces Ischemic Damage Effects of the Cannabinoid HU-210. *Stroke* **34**, 2000–2006 (2003).
201. Compagnucci, C. *et al.* Type-1 (CB1) Cannabinoid Receptor Promotes Neuronal Differentiation and Maturation of Neural Stem Cells. *PLoS One* **8**, e54271 (2013).
202. Galve-Roperh, I., Aguado, T., Palazuelos, J. & Guzmán, M. The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neurosci.* **13**, 109–114 (2007).
203. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Changes in CB1 and CB2 receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1472–1489 (2014).
204. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Endocannabinoid-hydrolysing enzymes in the post-mortem cerebellum of humans affected by hereditary autosomal dominant ataxias. *Pathobiology* **81**, 149–159 (2014).
205. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Dysregulation of the endocannabinoid signaling system in the cerebellum and brainstem in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type-3. *Neuroscience* **339**, 191–209 (2016).
206. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Altered striatal endocannabinoid signaling in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type-3. *PLoS One* **12**, 1–14 (2017).
207. Silva-Fernandes, A. *et al.* Chronic Treatment with 17-DMAG Improves Balance and Coordination in A New Mouse Model of Machado-Joseph Disease. *Neurotherapeutics* **11**, 433–449 (2014).
208. Golden, L. C. & Voskuhl, R. The importance of studying sex differences in disease: The example of multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* **95**, 633–643 (2017).
209. Young, L. J. & Pfaff, D. W. Sex differences in neurological and psychiatric disorders. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 253–254 (2014).
210. Fernández-Ruiz, J., Pazos, M. R., García-Arencibia, M., Sagredo, O. & Ramos, J. A. Role of CB2 receptors in neuroprotective effects of cannabinoids. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, S91–S96 (2008).
211. Ferrisi, R. *et al.* Medicinal Chemistry approach, pharmacology and neuroprotective benefits of CB2R modulators in neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **170**, 105–107 (2021).
212. López, A. *et al.* Cannabinoid CB 2 receptors in the mouse brain: Relevance for Alzheimer's

- disease. *J. Neuroinflammation* **15**, 1–11 (2018).
213. Gould, V. F. C. Mouse Models of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (Machado-Joseph Disease). *Neurotherapeutics* **9**, 285–296 (2012).
214. Guyenet, S. J. *et al.* A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *J. Vis. Exp.* 1–3 (2010) doi:10.3791/1787.
215. Kaplan, E. L. & Meier, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **53**, 457–481 (1958).
216. Crawley, J. N. Motor Functions. in *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice, Second Edition* 62–84 (John Wiley & Sons, Inc., 2007). doi:10.1002/9780470119051.ch4.
217. Shiotsuki, H. *et al.* A rotarod test for evaluation of motor skill learning. *J. Neurosci. Methods* **189**, 180–185 (2010).
218. Vorhees, C. V. & Williams, M. T. Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J.* **55**, 310–332 (2014).
219. Vorhees, C. V. & Williams, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* **1**, 848–858 (2006).
220. Jiang, H. B. *et al.* Arginine vasopressin relates with spatial learning and memory in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Neuropeptides* **65**, 83–89 (2017).
221. Maei, H. R., Zaslavsky, K., Teixeira, C. M. & Frankland, P. W. What is the most sensitive measure of water maze probe test performance? *Front. Integr. Neurosci.* **10**, 4 (2009).
222. Kalueff, A. V. & Tuohimaa, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **508**, 147–153 (2005).
223. Kalueff, A. V. *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 45–59 (2016).
224. Kalueff, A. V. & Tuohimaa, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res. Protoc.* **13**, 151–158 (2004).
225. Kalueff, A. V. & Tuohimaa, P. Contrasting grooming phenotypes in C57Bl/6 and 129S1/SvImJ mice. *Brain Res.* **1028**, 75–82 (2004).
226. Kalueff, A. V., Lou, Y. R., Laaksi, I. & Tuohimaa, P. Abnormal behavioral organization of grooming in mice lacking the vitamin D receptor gene. *J. Neurogenet.* **19**, 1–24 (2005).
227. Winters, R., Winters, A. & Amedee, R. G. Statistics: A brief overview. *Ochsner J.* **10**, 213–216 (2010).
228. Beery, A. & Zucker, I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **35**, 565–572 (2011).
229. Jacobi, H. *et al.* Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: A longitudinal cohort study. *Lancet Neurol.* **14**, 1101–1108 (2015).
230. Jacobi, H. *et al.* Long-term evolution of patient-reported outcome measures in spinocerebellar ataxias. *J. Neurol.* **265**, 2040–2051 (2018).
231. Gardiner, S. L. *et al.* Prevalence of carriers of intermediate and pathological polyglutamine disease-Associated alleles among large population-based cohorts. *JAMA*

- Neurol.* **76**, 650–656 (2019).
232. Kuo, P. H. *et al.* Dystonia and ataxia progression in spinocerebellar ataxias. *Park. Relat. Disord.* **45**, 75–80 (2017).
 233. Willner, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* **52**, 90–110 (2005).
 234. Yalcin, I., Belzung, C. & Surget, A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav. Brain Res.* **193**, 140–143 (2008).
 235. Butelman, E. R., McElroy, B. D., Prinszano, T. E. & Kreek, M. J. Impact of pharmacological manipulation of the κ -opioid receptor system on self-grooming and anhedonic-like behaviors in male mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **370**, 1–8 (2019).
 236. Whishaw, I. Q., Nonneman, A. J. & Kolb, B. Environmental constraints on motor abilities used in grooming, swimming, and eating by decorticate rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **95**, 792–804 (1981).
 237. Kalueff, A. V., Lou, Y. R., Laaksi, I. & Tuohimaa, P. Increased grooming behavior in mice lacking vitamin D receptors. *Physiol. Behav.* **82**, 405–409 (2004).
 238. Smolinsky, A. N., Bergner, C. L., LaPorte, J. L. & Kalueff, A. V. Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression. *Neuromethods* **42**, 21–37 (2009).
 239. Singh, S., Joshi, A. & Kamat, S. S. Mapping the Neuroanatomy of ABHD16A, ABHD12, and Lysophosphatidylserines Provides New Insights into the Pathophysiology of the Human Neurological Disorder PHARC. *Biochemistry* **59**, 2299–2311 (2020).
 240. Yap, K. H., Kessels, R. P. C., Azmin, S., van de Warrenburg, B. & Mohamed Ibrahim, N. Neurocognitive Changes in Spinocerebellar Ataxia Type 3: A Systematic Review with a Narrative Design. *Cerebellum* 1–14 (2021) doi:10.1007/s12311-021-01282-3.
 241. Lindsay, E. & Storey, E. Cognitive Changes in the Spinocerebellar Ataxias Due to Expanded Polyglutamine Tracts: A Survey of the Literature. *Brain Sci.* **7**, 1–20 (2017).
 242. Tang, Z. *et al.* Central motor conduction time in spinocerebellar ataxia: a meta-analysis. *Aging (Albany, NY)*. **12**, 25718–25729 (2020).
 243. Smeets, C. & Verbeek, D. Climbing fibers in spinocerebellar ataxia: A mechanism for the loss of motor control. *Neurobiol. Dis.* **88**, 96–106 (2016).
 244. Koeppen, A. H. The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum* **4**, 62–73 (2005).
 245. Gaalen, J. van *et al.* Abnormal eyeblink conditioning is an early marker of cerebellar dysfunction in preclinical SCA3 mutation carriers. *Exp. Brain Res.* **237**, 427 (2019).
 246. Bando, K. *et al.* Impaired Adaptive Motor Learning Is Correlated With Cerebellar Hemispheric Gray Matter Atrophy in Spinocerebellar Ataxia Patients: A Voxel-Based Morphometry Study. *Front. Neurol.* **10**, 1183 (2019).
 247. Hashimoto, Y. *et al.* Quantitative Evaluation of Human Cerebellum-Dependent Motor Learning through Prism Adaptation of Hand-Reaching Movement. *PLoS One* **10**, 119376 (2015).
 248. Yin, H. H. *et al.* Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat. Neurosci.* **12**, 333–341 (2009).

249. Ortiz-Pulido, R. *et al.* Efecto de la lesión electrolítica del estriado dorsomedial sobre la conducta sexual y actividad locomotora de la rata. *Neurología* **32**, 278–283 (2017).
250. Klaes, A. *et al.* MR imaging in Spinocerebellar ataxias: A systematic review. *Am. J. Neuroradiol.* **37**, 1405–1412 (2016).
251. Person, A. L. & Raman, I. M. Synchrony and neural coding in cerebellar circuits. *Front. Neural Circuits* **6**, 1–32 (2012).
252. Tian, W. & Chen, S. Neurotransmitters, Cell Types, and Circuit Mechanisms of Motor Skill Learning and Clinical Applications. *Front. Neurol.* **12**, 616820 (2021).
253. Ulasoglu-Yildiz, C. & Gurvit, H. Implicit contextual learning in spinocerebellar ataxia. *Neuropsychology* **34**, 511–523 (2020).
254. Vaca-Palomares, I. *et al.* Strategy use, planning, and rule acquisition deficits in spinocerebellar ataxia type 2 patients. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **21**, 214–220 (2015).
255. Yu, Y. *et al.* Nonlinear analysis of local field potentials and motor cortex EEG in spinocerebellar ataxia 3. *J. Clin. Neurosci.* **59**, 298–304 (2019).
256. D’Hooge, R. & De Deyn, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* **36**, 60–90 (2001).
257. Solari, N. & Hangya, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. *Eur. J. Neurosci.* **48**, 2199–2230 (2018).
258. Jao, C. W. *et al.* Intra- and inter-modular connectivity alterations in the brain structural network of spinocerebellar ataxia type 3. *Entropy* **21**, (2019).
259. Wadhwa, M. *et al.* Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48 h of sleep deprivation. *J. Neuroinflammation* **14**, (2017).
260. Furuya, M. *et al.* Yokukansan promotes hippocampal neurogenesis associated with the suppression of activated microglia in Gunn rat. *J. Neuroinflammation* **10**, (2013).
261. Takamura, R., Watamura, N., Nikkuni, M. & Ohshima, T. All-trans retinoic acid improved impaired proliferation of neural stem cells and suppressed microglial activation in the hippocampus in an Alzheimer’s mouse model. *J. Neurosci. Res.* **95**, 897–906 (2017).
262. Setlow, B. & McGaugh, J. L. Involvement of the posteroventral caudate-putamen in memory consolidation in the Morris water maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* **71**, 240–247 (1999).
263. Petrosini, L., Leggio, M. G. & Molinari, M. The cerebellum in the spatial problem solving: A co-star or a guest star? *Prog. Neurobiol.* **56**, 191–210 (1998).
264. Petrosini, L., Molinari, M. & Dell’Anna, M. E. Cerebellar contribution to spatial event processing: Morris water maze and T-maze. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 1882–1896 (1996).
265. Kieling, C., Prestes, P. R., Saraiva-Pereira, M. L. & Jardim, L. B. Survival estimates for patients with Machado–Joseph disease (SCA3). *Clin. Genet.* **72**, 543–545 (2007).
266. Klockgether, T. *et al.* The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain* **121** (Pt 4), 589–600 (1998).
267. Marras, C. *et al.* Minimum incidence of primary cervical dystonia in a multiethnic health care population. *Neurology* **69**, 676–680 (2007).

268. Matsumoto, S., Nishimura, M., Shibasaki, H. & Kaji, R. Epidemiology of primary dystonias in Japan: comparison with Western countries. *Mov. Disord.* **18**, 1196–1198 (2003).
269. McFadyen, M. P., Kusek, G., Bolivar, V. J. & Flaherty, L. Differences among eight inbred strains of mice in motor ability and motor learning on a rotorod. *Genes, Brain Behav.* **2**, 214–219 (2003).
270. Culpepper, L., Lam, R. W. & McIntyre, R. S. Cognitive impairment in patients with depression: Awareness, assessment, and management. *J. Clin. Psychiatry* **78**, 1383–1394 (2017).
271. McMurtray, A. M., Clark, D. G., Flood, M. K., Perlman, S. & Mendez, M. F. Depressive and memory symptoms as presenting features of spinocerebellar ataxia. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **18**, 420–422 (2006).
272. Cecchin, C. R. *et al.* Depressive symptoms in Machado-Joseph disease (SCA3) patients and their relatives. *Community Genet.* **10**, 19–26 (2007).
273. Villanueva, R. Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast.* **2013**, (2013).
274. Filatova, E. V., Shadrina, M. I. & Slominsky, P. A. Major Depression: One Brain, One Disease, One Set of Intertwined Processes. *Cells* **10**, 1283 (2021).
275. Leishman, E., Mackie, K. & Bradshaw, H. B. Elevated levels of arachidonic acid-derived lipids including prostaglandins and endocannabinoids are present throughout ABHD12 knockout brains: Novel insights into the neurodegenerative phenotype. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).
276. Frasch, S. C. & Bratton, D. L. Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation. *Prog. Lipid Res.* **51**, 199 (2012).
277. Moreno-Luna, R. *et al.* Heterogeneity of the Endocannabinoid System Between Cerebral Cortex and Spinal Cord Oligodendrocytes. *Mol. Neurobiol.* **58**, 689–702 (2021).
278. Gomez, O. *et al.* The constitutive production of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol participates in oligodendrocyte differentiation. *Glia* **58**, 1913–1927 (2010).
279. Wu, X. *et al.* Microstructural alterations in asymptomatic and symptomatic patients with spinocerebellar ataxia type 3: A tract-based spatial statistics study. *Front. Neurol.* **8**, (2017).
280. Ramani, B. *et al.* Comparison of spinocerebellar ataxia type 3 mouse models identifies early gain-of-function, cell-autonomous transcriptional changes in oligodendrocytes. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3362–3374 (2017).
281. Yi Teo, R. T. *et al.* Structural and molecular myelination deficits occur prior to neuronal loss in the YAC128 and BACHD models of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 2621–2632 (2016).
282. Bardile, C. F. *et al.* Intrinsic mutant HTT-mediated defects in oligodendroglia cause myelination deficits and behavioral abnormalities in Huntington disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 9622–9627 (2019).
283. Han, F. *et al.* Neuroinflammation and Myelin Status in Alzheimer’s Disease, Parkinson’s Disease, and Normal Aging Brains: A Small Sample Study. *Parkinsons. Dis.* **2019**, (2019).
284. Bisogno, T. *et al.* Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their

- biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 377–380 (1999).
285. Pacher, P. & Mechoulam, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog. Lipid Res.* **50**, 193 (2011).
286. Zibolka, J. *et al.* Influence of Cannabinoid Receptor Deficiency on Parameters Involved in Blood Glucose Regulation in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
287. Deveaux, V. *et al.* Cannabinoid CB2 Receptor Potentiates Obesity-Associated Inflammation, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *PLoS One* **4**, e5844 (2009).
288. Alshaarawy, O., Kurjan, E., Truong, N. & Olson, L. K. Diet-Induced Obesity in Cannabinoid-2 Receptor Knockout Mice and Cannabinoid Receptor 1/2 Double-Knockout Mice. *Obesity* **27**, 454–461 (2019).
289. Agudo, J. *et al.* Deficiency of CB2 cannabinoid receptor in mice improves insulin sensitivity but increases food intake and obesity with age. *Diabetologia* **53**, 2629–2640 (2010).
290. Lalonde, R. & Strazielle, C. Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. *Brain Res. Rev.* **67**, 252–259 (2011).
291. Chou, A. H. *et al.* Polyglutamine-expanded ataxin-3 causes cerebellar dysfunction of SCA3 transgenic mice by inducing transcriptional dysregulation. *Neurobiol. Dis.* **31**, 89–101 (2008).
292. Lira, A. *et al.* Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol. Psychiatry* **54**, 960–971 (2003).
293. Franklin, J. M. & Carrasco, G. A. Cannabinoid receptor agonists upregulate and enhance serotonin 2A (5-HT_{2A}) receptor activity via ERK1/2 signaling. *Synapse* **67**, 145–159 (2013).
294. Palomo-Garo, C., Gómez-Gálvez, Y., García, C. & Fernández-Ruiz, J. Targeting the cannabinoid CB2 receptor to attenuate the progression of motor deficits in LRRK2-transgenic mice. *Pharmacol. Res.* **110**, 181–192 (2016).
295. Bouchard, J. *et al.* Cannabinoid Receptor 2 Signaling in Peripheral Immune Cells Modulates Disease Onset and Severity in Mouse Models of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* **32**, 18259–18268 (2012).
296. Palazuelos, J. *et al.* Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain* **132**, 3152–3164 (2009).
297. Rodríguez-Cueto, C. *et al.* Inactivation of the CB2 receptor accelerated the neuropathological deterioration in TDP-43 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* **31**, e12972 (2021).
298. Ferraro, A., Wig, P., Boscarino, J. & Reich, C. G. Sex differences in endocannabinoid modulation of rat CA1 dendritic neurotransmission. *Neurobiol. Stress* **13**, (2020).
299. Gupta, B. *et al.* Anti-apoptotic and Immunomodulatory Effect of CB2 Agonist, JWH133, in a Neonatal Rat Model of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Front. Pediatr.* **8**, 65 (2020).
300. Lanciego, J. L. *et al.* Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of Macaca fascicularis. *J. Psychopharmacol.* **25**, 97–104 (2011).

301. Van Sickle, M. D. *et al.* Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**, 329–332 (2005).
302. Skaper, S. D. *et al.* The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3984–3989 (1996).
303. Fernández-Ruiz, J. *et al.* Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 39–45 (2007).
304. Fernández-Ruiz, J., Moro, M. A. & Martínez-Orgado, J. Cannabinoids in Neurodegenerative Disorders and Stroke/Brain Trauma: From Preclinical Models to Clinical Applications. *Neurotherapeutics* **12**, 793–806 (2015).
305. Da Silva Carvalho, G. *et al.* Cytokines in Machado Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia 3. *Cerebellum* **2015** *154* **15**, 518–525 (2015).
306. Rüb, U. *et al.* Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog. Neurobiol.* **104**, 38–66 (2013).
307. Ashizawa, T., Öz, G. & Paulson, H. L. Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development HHS Public Access. *Nat Rev Neurol* **14**, 590–605 (2018).
308. Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Clark, H. B. & Orr, H. T. Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat. Rev. Neurosci.* **18**, 613–626 (2017).
309. Schmahmann, J. D. The cerebellum and cognition. *Neurosci. Lett.* **30**, 1–14 (2018).
310. Stoodley, C. J. & Schmahmann, J. D. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex.* **46**, 831 (2010).
311. Bodranghien, F. *et al.* Consensus Paper: Revisiting the Symptoms and Signs of Cerebellar Syndrome. *Cerebellum* **15**, 369 (2016).
312. Ahmadian, N., Baarsen, K. van, Zandvoort, M. van & Robe, P. A. The Cerebellar Cognitive Affective Syndrome—a Meta-analysis. *Cerebellum* **18**, 941 (2019).
313. Thiele, A. & Bellgrove, M. A. Neuromodulation of Attention. *Neuron* vol. 97 769–785 (2018).
314. Tsotsos, J. K. Attention: The messy reality. *Yale J. Biol. Med.* **92**, 127–137 (2019).
315. Bettcher, B. M. *et al.* Neuroanatomical substrates of executive functions: Beyond prefrontal structures. *Neuropsychologia* **85**, 100–109 (2016).
316. Karr, J. E. *et al.* The unity and diversity of executive functions: A systematic review and re-analysis of latent variable studies. *Psychol. Bull.* **144**, 1147–1185 (2018).
317. Eichenbaum, H. Memory: Organization and Control. *Annu. Rev. Psychol.* **68**, 19–45 (2017).
318. Ferbinteanu, J. Memory systems 2018 – Towards a new paradigm. *Neurobiology of Learning and Memory* vol. 157 61–78 (2019).
319. Chiurchiu, V., Battistini, L. & Maccarrone, M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology* **144**, 352 (2015).