

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

Relevancia del receptor cannabinoide CB2 en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Relevance of cannabinoid receptor CB2 in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Espejo Porras

Directores

Eva de Lago Femia
José Javier Fernández Ruiz

Madrid 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



RELEVANCIA DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB₂ EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

RELEVANCE OF CANNABINOID RECEPTOR CB₂
IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS (ALS)

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR CON MENCIÓN INTERNACIONAL**

Presentada por:

FRANCISCO ESPEJO PORRAS

Dirigida por:

**Dra. Eva de Lago Femia
Dr. José Javier Fernández Ruiz**

Madrid, 2018



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
Y BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Ciudad Universitaria, s/n - 28040 – MADRID
Tfno: 91 394 14 56 Fax: 91 394 16 91

EVA DE LAGO FEMIA y JAVIER FERNÁNDEZ RUIZ, Doctores en Ciencias Biológicas y Profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, sección departamental de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid:

CERTIFICAN:

Que la presente TESIS DOCTORAL para optar al título de Doctor Internacional por la Universidad Complutense de Madrid con el título: RELEVANCIA DEL RECEPTOR CANNABINOIDE CB₂ EN LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA), y presentada por FRANCISCO ESPEJO PORRAS, Licenciado en Bioquímica por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada con tal fin.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 9 de Marzo de 2018.

Dra. Eva de Lago Femia

Dr. Javier Fernández Ruiz

ÍNDICE

Resumen / Summary	9 / 13
Abreviaturas	19
Introducción	25
1. Esclerosis Lateral Amtrófica (ELA)	25
1.1 Patología y epidemiología	25
1.2 Causas	27
1.3 Diagnóstico	29
1.4 Proteínas asociadas	30
1.5 Mecanismos patogénicos	37
1.6 Tratamientos	44
2. Sistema Endocannabinoide	47
2.1 Cronología de su estudio	47
2.2 Receptores de cannabinoides	50
2.3 Ligandos cannabinoides	54
2.4 SEC y neuroprotección	59
2.5 Cannabinoides y ELA	60
3. Mielopatía degenerativa canina	63
3.1 Patología	63
3.2 SE en la raza canina	63
Resultados	
- Capítulo 1	67
- Capítulo 2	99
Discusión	139
Conclusiones / Conclusions	147 / 148
Referencias	151

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) o “Amyotrophic Lateral Sclerosis” (ALS) en inglés, es una enfermedad neurodegenerativa en la que se produce la muerte de las motoneuronas superiores e inferiores. Estas neuronas son las encargadas de transmitir el impulso nervioso hacia los músculos permitiendo el movimiento. A lo largo que la enfermedad evoluciona, se produce una debilidad progresiva en las extremidades (suele afectar primero a un tipo para extenderse al otro) y una consecuente debilidad muscular. Esto conlleva a una atrofia de los músculos y en etapas finales a una parálisis total, lo que provoca normalmente una insuficiencia respiratoria que lleva a la muerte del paciente. A día de hoy y como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas, sigue sin haber un tratamiento eficaz para la ELA. Durante años, el único fármaco aprobado para su prescripción ha sido el riluzol, pero ha demostrado una escasa efectividad. La prevalencia de la enfermedad muestra que aproximadamente 2 personas de cada 100.000 padecen la ELA, siendo más frecuente la afección en hombres que mujeres con un ratio 3 a 1. Alrededor de un 90% son casos esporádicos, dejando el restante 10% de origen familiar. En cualquiera de los dos casos, se han identificado múltiples mutaciones asociadas a la ELA. En los años noventa la primera mutación que se identificó fue en el gen de la proteína SOD1, lo que ha hecho que sea la más estudiada. No fue hasta el año 2006 cuando también se identificó a TDP43 como otra proteína cuya mutación se asocia a la ELA (y a la demencia frontotemporal). En estos últimos años otros genes se han ido añadiendo a la lista de mutaciones implicadas, como FUS, o de manera más relevante el gen C9ORF72. La mayoría de las mutaciones en estos genes producen un plegamiento erróneo proteico y en consecuencia, fallos funcionales que desencadenan múltiples eventos citotóxicos que desencadenan la muerte de las motoneuronas. Entre esos eventos, se puede encontrar una marcada activación glial asociada a un incremento de la inflamación; fallos en la respiración celular que desencadenan estrés oxidativo; exceso de glutamato en las sinapsis que promueven una excitotoxicidad, etc. Esta amplia patogénesis en la que los diversos eventos tóxicos se suman y se complementan, dificultan el poder encontrar un tratamiento eficaz para la ELA.

Ante esta diversa patogénesis de la enfermedad, los cannabinoides se perfilan como unos potenciales agentes neuroprotectores en el tratamiento de los eventos tóxicos ya mencionados, del mismo modo que ya lo han sido descritos para otras patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington.

La planta *Cannabis sativa* ya se usaba en la antigüedad con diversos fines entre los que se encuentra el uso medicinal. Pero ha sido a lo largo del s.XX cuando a partir de la caracterización de diversos cannabinoides de la planta, como el 9-delta-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) o el cannabidiol (CBD). Estos elementos interactúan con un sistema endógeno (al que se le denominó endocannabinoide), con receptores y ligandos propios. Dentro del sistema nervioso central (SNC), el sistema endocannabinoide (SEC) está encargado de la regulación de otros sistemas de neurotransmisores gracias a la acción del receptor CB₁ localizado en el soma neuronal. En cambio, el receptor CB₂ está más ligado a la defensa del SNC debido a la respuesta que media principalmente a través de la glía. Estos receptores también se encuentran en otras regiones del cuerpo permitiendo que su mediación abarque a otras patologías de orígenes no neurológicos.

A pesar de la innegable evidencia terapéutica del SEC en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, su potencial terapéutico en la ELA ha sido escasamente estudiado. Esta tesis pretende esclarecer esa falta de información mediante la caracterización completa del SEC a partir de tres modelos de enfermedad diferentes. De forma añadida, este manuscrito busca demostrar que la mediación del propio SEC es una opción real en el tratamiento de la ELA.

Resumen

Por ello, se han considerado el cumplimiento de los siguientes objetivos en la presente tesis:

OBJETIVOS

La hipótesis inicial de tomar al SEC como una potencial diana para el tratamiento de la ELA, marca a su vez dos objetivos diferenciados. Por un lado la caracterización del SEC dentro de la patología, y por otro, abordar farmacológicamente los posibles cambios encontrados con un fin terapéutico.

Para el cumplimiento de estos objetivos, esta Tesis Doctoral se puede dividir en dos capítulos específicos:

- **Capítulo 1:** Caracterización del sistema endocannabinoide en diversos modelos de ELA

Para la consecución de este objetivo se han utilizado tres modelos de la enfermedad diferentes. En primer lugar se ha hecho uso de muestras *post mortem* de pacientes (y de controles) tanto de médula espinal como de corteza motora en los que se ha realizado la evaluación del sistema endocannabinoide. En un segundo lugar, se ha dispuesto de muestras *post mortem* de médula espinal de perros afectados por mielopatía degenerativa canina (MDC), una enfermedad espontánea que cursa con múltiples similitudes a la ELA. Y en tercer lugar, se ha realizado la caracterización del SEC en un modelo murino transgénico de TDP43, una proteína que ha sido relacionada con el origen patogénico y que supone una nueva alternativa al modelo clásico de estudio.

El uso de varios modelos con diversos orígenes patogénicos posibilita un estudio amplio sobre cómo los múltiples eventos tóxicos en la ELA alteran el SEC. De esta manera, también se pone de manifiesto las similitudes encontradas entre modelos, donde el receptor CB₂ toma una especial relevancia.

En el cumplimiento de este objetivo se han incluido en los siguientes artículos de investigación:

Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., de Lago, E. (2018). Analysis of endocannabinoid receptors and enzymes in the post-mortem motor cortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*, 1-10.

Fernández-Traperero, M*., **Espejo-Porras, F***., Rodríguez-Cueto, C., Coates, J.R., Pérez-Díaz, C., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J. (2017). Upregulation of CB₂ receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis. Model. Mech.*, 10(5), 551-558.

Espejo-Porras, F., Piscitelli, F., Verde, R., Ramos, J.A., Di Marzo, V., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J. (2015). Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J. Neuroimmune. Pharmacol.*, 10(2), 233-44.

- **Capítulo 2:** Evaluar un potencial tratamiento en el modelo murino TDP43 (A315T) mediado por el receptor CB₂.

Los resultados reflejados en los tres modelos, y de manera relevante en el ratón transgénico TDP43 (A315T), muestran un incremento del receptor CB₂ en la médula espinal. A partir de este dato, se realizaron diversos experimentos farmacológicos enfocados a este incremento. En el primero de ellos, se administró el cannabinoide sintético WIN 55,212 en el inicio de los síntomas. Este compuesto consiguió retrasar la afección motora que presentan estos ratones y mejorar la supervivencia de las motoneuronas. Debido a que WIN 55,212 es un agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂, se realizó un segundo experimento usando antagonistas de ambos receptores para elucidar por cuál de las vías estaba actuando el compuesto. En los dos casos, el retraso en la afección motora persistió, pero únicamente cuando se bloqueó el receptor CB₂, no se produjo la supervivencia de las motoneuronas. En este experimento se comprobó que los efectos positivos eran producidos mediante la modulación glial a través del receptor CB₂. Un hecho que se repitió en un tercer experimento en el que se usó un agonista completo de dicho receptor, el HU-308.

Los resultados que se concentran en este capítulo se hallan en la siguiente publicación (en revisión para su aceptación):

Espejo-Porras, F., García-Toscano, L., Rodríguez-Cueto, C., Santos-García, I., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J., (2018). Targeting glial CB2 receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice: a model of ALS. *Br. J. Pharmacol.*, (En revisión).

SUMMARY

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease in which the upper and lower motor neurons die. These neurons are responsible for transmitting the nerve impulse to the muscles allowing movement. As the disease progresses, there is progressive weakness in the extremities (usually affecting one type first to spread to the other) and consequent muscle weakness. This leads to atrophy of the muscles and in final stages to a total paralysis, which usually causes a respiratory failure that leads to the death of the patient. Today, there is still no effective treatment for ALS, as other neurodegenerative diseases. For years, the only drug approved for prescription has been riluzole, but it has shown little effectiveness. The prevalence of the disease shows that approximately 2 people in 100,000 suffer ALS, being more frequent in men than women with a ratio of 3 to 1. Around 90% are sporadic cases, leaving the remaining 10% of family origin. In either case, multiple mutations associated with ALS have been identified. In the nineties the first mutation that was identified was in the SOD1 protein gene, which has made it the most studied case. It was not until 2006 that TDP43 was also identified as another protein whose mutation is associated with ALS (and frontotemporal dementia). In recent years other genes have been added to the list of mutations involved, such as FUS, or more significantly the C9ORF72 gene. The majority of the mutations in these genes produce a protein missfolding and consequently, functional failures associates with multiple cytotoxic events that trigger the death of motor neurons. Among these events, one can find a marked glial activation associated with an increase in inflammation; failures in cellular respiration that trigger oxidative stress; excess of glutamate in the synapses that promote an excitotoxicity, etc. This broad pathogenesis in which the various toxic events add up and complement each other makes it difficult to find an effective treatment for ALS.

Given this diverse pathogenesis of the disease, cannabinoids are emerging as potential neuroprotective agents in the treatment of the toxic events already mentioned, in the same way as they have already been described for other neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease or Huntington's disease.

The plant *Cannabis sativa* was already used in ancient times for various purposes among which is the medicinal use. But it has been throughout the twentieth century when from the characterization of various cannabinoids of the plant, such as 9-delta-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) or cannabidiol (CBD). These elements interact with an endogenous system (which was called endocannabinoid), with its own receptors and ligands. Within the central nervous system (CNS), the endocannabinoid system (ECS) is responsible for the regulation of other neurotransmitter systems thanks to the action of the CB₁ receptor located in the neuronal soma. In contrast, the CB₂ receptor is more linked to the defense of the CNS due to the response that mediates mainly through the glia. These receptors are also found in other regions of the body allowing their mediation to cover other pathologies of non-neurological origins.

Despite the undeniable therapeutic evidence of the ECS in the treatment of neurodegenerative diseases, its therapeutic potential in ALS has been poorly studied. This thesis aims to clarify this lack of information through the complete characterization of the ECS from three different disease models. In addition, this manuscript seeks to demonstrate that the mediation of the ECS itself is a real option in the treatment of ALS.

For this reason, the fulfillment of the following objectives in this thesis has been considered:

Summary

OBJECTIVES

The initial hypothesis of taking the ECS as a potential target for the treatment of ALS, in turn marks two differentiated objectives. On the one hand, the characterization of the ECS within the pathology, and on the other, pharmacologically address the possible changes found with a therapeutic purpose.

For the fulfillment of these objectives, this Doctoral Thesis can be divided into two specific chapters:

- **Chapter 1:** Characterization of the endocannabinoid system in various models of ALS.

Three different models of the disease have been used to achieve this objective. In the first place, post-mortem samples of patients (and controls) of both the spinal cord and the motor cortex have been used in which the evaluation of the endocannabinoid system has been carried out. In a second place, post-mortem spinal cord samples from dogs affected by canine degenerative myelopathy (DCM), a spontaneous disease with multiple similarities to ALS, have been available. And third, the characterization of the ECS has been carried out in a transgenic murine model of TDP43, a protein that has been related to the pathogenic origin and that represents a new alternative to the classical model of study.

The use of several models with diverse pathogenic origins allows a broad study on how the multiple toxic events in ALS alter the ECS. In this way, it also reveals the similarities found between models, where the CB₂ receptor takes on special relevance.

In fulfilling this objective, the following research articles have been included:

Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., de Lago, E. (2018). Analysis of endocannabinoid receptors and enzymes in the post-mortem motor cortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*, 1-10.

Fernández-Trapero, M*, **Espejo-Porras, F***, Rodríguez-Cueto, C., Coates, J.R., Pérez-Díaz, C., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J. (2017). Upregulation of CB₂ receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis. Model. Mech.*, 10(5), 551-558.

Espejo-Porras, F., Piscitelli, F., Verde, R., Ramos, J.A., Di Marzo, V., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J. (2015). Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J. Neuroimmune. Pharmacol.*, 10(2), 233-44.

- **Chapter 2:** Evaluate a potential treatment in the murine model TDP43 (A315T) mediated by the CB₂ receptor.

The results reflected in the three models, and in a relevant way in the transgenic mouse TDP43 (A315T), show an increase of the CB₂ receptor in the spinal cord. From this data, several pharmacological experiments focused on this increase were made. In the first of these, the synthetic cannabinoid WIN 55,212 was administered at the onset of symptoms. This compound was able to delay the motor affection presented by these mice and improve the survival of motor neurons. Because WIN 55,212 is a partial agonist of the CB₁ and CB₂ receptors, a second experiment was performed using antagonists of both receptors to elucidate which of the pathways the compound was acting on. In both cases, the delay in the motor condition persisted, but only when the CB₂ receptor was blocked did motor neuron survival not occur. In this experiment it was found that the positive effects were produced by glial modulation through the CB₂ receptor. A fact that was repeated in a third experiment in which a complete agonist of said receptor, HU-308, was used.

The results that are concentrated in this chapter can be found in the following publication (under review):

Espejo-Porras, F., García-Toscano, L., Rodríguez-Cueto, C., Santos-García, I., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J., (2018). Targeting glial CB2 receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice: a model of ALS. *Br. J. Pharmacol.*, (Under review).

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

2AG	2-araquidonoilglicerol
AA	Ácido araquidónico
AA-5-HT	N-araquidonoil-serotonina
ABDH	Hidrolasa que contiene un dominio α/β
AC	Adenil ciclasa
ADD2	β -aduccina2
AEA	Araquidonoiletanolamida o anandamida
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
Arg1	Arginasa 1
AMPA	Receptor glutamatérgico α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4isoxazolepropiónico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
ATXN-2	Ataxina 2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BMAA	β -N-metilamino-L-alanina
CB₁	Receptor cannabinoide tipo 1
CB₂	Receptor cannabinoide tipo 2
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CCL2	Citoquina ligando con motivo C-C tipo 2
CFTR1	Receptor del factor 1 de estímulo de colonial
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2
CRE	Elementos de respuesta por AMPc
CSF1R	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CXCL13	Citoquina ligando con motivo C-X-C tipo 13
C9ORF72	Espacio de lectura 72 en el cromosoma 9
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DAGs	Diacilgliceroles
DFT	Demencia frontotemporal
DRP	Porteínas de dipéptidos repetidos
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAAT	Transportador de aminoácidos excitatorios
ECBs	Endocannabinoides
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EM:	Esclerosis Múltiple
EH:	Enfermedad de Huntington
FAAH	Amidohidrolasa de ácidos grasos (Fatty acid amide hydrolase)
FET	FUS/EWS/TAF15
FIZZ1	Proteína secretada rica en glicina encontrada en zona inflamada
FUS/TLS	Fusionado en el sarcoma/ translocado en el liposarcoma

Abreviaturas

G-CSF	Factor de estimulación colonial de granulocitos
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GlcH	Hormonas glucocorticoides
GM-CSF	Factor de estimulación colonial de granulocitos y macrófagos
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humano tipo 1
hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea
IC	Complejo inmunocitario
IFN-γ	Interferón γ
IGF1	Factor de crecimiento de insulina tipo 1
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
LPI	Lisofosfatidilinositol
LPS	Lipopolisacárido
IPSCs	Células pluripotenciales inducibles
MAGs	Monoacilglicerol
MAGL	Monoacilglicerol lipasa
MAPKs	Proteínas kinasas mitogénicas activadas
MCD	Mielopatía canina degenerativa
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MND	Enfermedad de la motoneurona "Motor neuron disease"
NAAA	Ácido-N-aciletanolamina amidasa
NADA	N-araquidonoildopamina
NAES	N-acil etanolaminas
NAGLy	N-araquidonil glicina
NAPE	N-araquidonilfosfatidiletanolamina
NES	Señal de exportación nuclear
NLS	Señal de localización nuclear
NMDA	Receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato
NMI	Neurona motora inferior
NMS	Neurona motora superior
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
PA	Ácido fosfatídico
PET	Tomografía por emisión de positrones
PGC-1α	Proteína 1 α coactivadora del receptor activado por proliferadores peroximales
PI	Fosfoinositol
PI3	Fosfoinositol trifosfato
PKA	Fosfoquinasa tipo A
PLC	Fosfolipasa tipo C
PPARs	Receptores activados por proliferadores peroxisomales
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RRM	Motivo de reconocimiento de ARN
RXR	Receptor X retinoico
SEC	Sistema endocannabinoide

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Super óxido dismutasa1
SR-A1	Receptor “scavenger” tipo A1
SR-B1	Receptor “scavenger” tipo B1
STAT3	Señal transductora y activadora de transcripción 3
TDP43	Proteína de unión TAR DNA 43
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
THCV	Tetrahidrocannabivarina
TLR4	Receptor tipo <i>toll</i> 4
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRP	Receptor de potencial transitorio
TRPV1	Receptor vainilloide tipo 1
TTX	Tetradotoxina
UBQLN2	Ubiquinilina 2
VEGF	Factor endotelial de crecimiento vascular
x_c⁻	Sistema cisteína/glutamato antiporter con la subunidad específica xCT/ Slc7a11
Δ⁹-THC	9-delta-tetrahidrocannabinol

INTRODUCCIÓN

1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

1.1 Patología y epidemiología

La Esclerosis lateral amiotrófica (ELA, o ALS en sus siglas en inglés) es conocida como la principal enfermedad neurodegenerativa con afección en la motoneurona, afectándose zonas de la corteza motora primaria, el tronco encefálico, el tracto corticoespinal y por supuesto, la médula espinal (visualizar la **Caja 1** para tener más información sobre la médula espinal). La muerte gradual de este tipo neuronal se traduce en una progresiva

debilidad muscular en el paciente que avanza hasta la parálisis del mismo. En el transcurso de la enfermedad, también se produce una atrofia muscular a lo que se irá sumando problemas en la movilidad involuntaria. Esto provoca la muerte del paciente mediante una insuficiencia respiratoria a los 5 o 6 años desde el diagnóstico de la enfermedad. Es de remarcar que a día de hoy no existe un tratamiento eficaz o cura.

Caja 1: Médula espinal.

Dentro del sistema nervioso central (SNC), la médula espinal es el tejido nervioso localizado dentro de la espina dorsal cuya función es transportar los impulsos nerviosos del cerebro al resto del cuerpo o viceversa. Se recubre por una membrana llamada meninge con la función de proteger y nutrir. Longitudinalmente se divide según la altura o posición dentro de la espina dorsal en: cervical, torácica, lumbar y sacra. Estas zonas contienen 7, 12, 5 y 5 vértebras respectivamente, a lo que se le suma el cóccix. Los nervios espinales surgen a través de los agujeros intervertebrales de forma oblicua por su correspondiente vértebra.

Si se le realizase un corte transversal, se podría vislumbrar dos áreas diferenciadas. La sustancia blanca y la sustancia gris, ambas regiones se subdividen en una zona dorsal, que se orienta hacia el exterior de la espalda, y otra zona ventral cuya orientación quedaría hacia la parte interna del cuerpo.

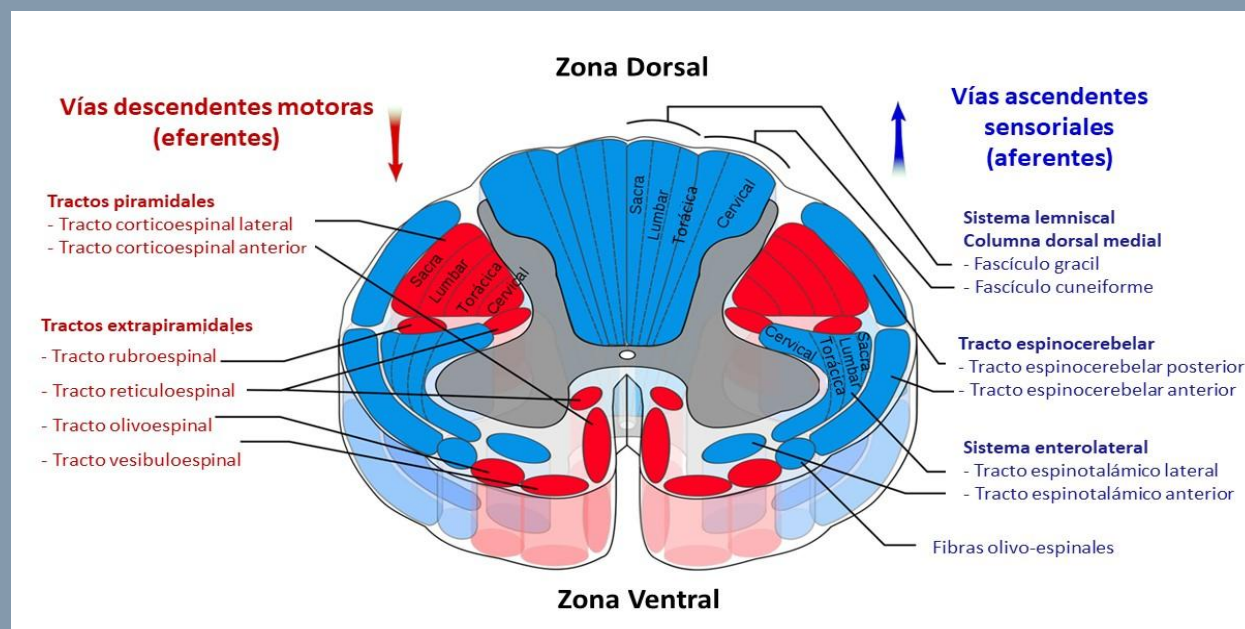


Figura 1: Esquematación de la sustancia blanca según las diferentes vías de conexión. En color rojo se describen las vías descendentes que son las encargadas de mediar el movimiento, en ellas se transporta la información enviada desde el cerebro hacia los músculos. En azul se muestran las vías ascendentes que son las responsables de mediar las señales sensitivas hacia el cerebro para su procesamiento. Gráfico modificado de la Wikipedia.

Introducción

La sustancia blanca se encuentra en la zona más externa de la médula espinal estando constituida por axones dispuestos de manera longitudinal y de células gliales. En la **Figura 1** se puede ver las diferentes orientaciones de las agrupaciones axonales (también llamados tractos). De forma general, en la parte dorsal se concentran las vías ascendentes y sensoriales mientras que en la ventral las descendentes y motoras. En cambio la sustancia gris, coloquialmente conocida por “las alas de mariposa” debida a su forma en H, es una región con múltiples cuerpos neuronales y gliales. Dichas “alas” son las astas medulares y también se subdividen en dorsales y ventrales. Como se puede ver en la **Figura 2**, las diferentes poblaciones neuronales se clasifican en láminas (Sp) según la citoarquitectura celular. Por ejemplo las neuronas de la lámina 7 (Sp7) son interneuronas reguladoras del movimiento al conectar con los núcleos de motoneuronas que forman la lámina 9, siendo éstas las que conectan con los músculos.

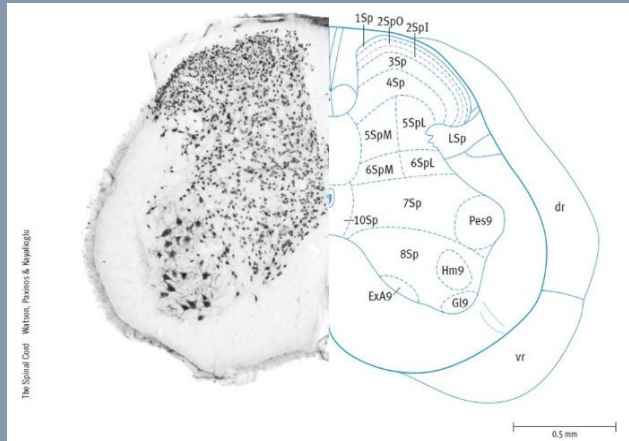


Figura 2: Esquematación de las diferentes láminas de la sustancia gris. Las diferentes poblaciones neuronales se clasifican en láminas (Sp) desde la zona dorsal a la ventral. En la imagen de la izquierda se representa un corte al que se le ha realizado una inmunotinción con NeuN, un marcador específico de neuronas. Ambas imágenes han sido tomadas de: The Spinal Cord. Watson, Paxinos & Kayalioglu.

A la ELA también se la conoce como la enfermedad de la motoneurona. No obstante, esta definición realmente abarca a un amplio grupo de trastornos motores donde la ELA representa el tipo más específico y frecuente, dándose lugar la muerte de las motoneuronas superiores e inferiores. De la misma manera, dependiendo del país de origen también es más conocida por un nombre u otro. Este sería el caso del Reino Unido, donde se la conoce como “motor neuron disease” (MND) o

enfermedad de la motoneurona. En cambio en EEUU se la denomina como la enfermedad de Lou Gehrig, debido a que este famoso jugador de baseball sufrió la enfermedad a finales de los años 30 (Lewis et al., 2007). Y en Francia, lugar donde esta enfermedad fue descrita por primera vez, se la llama con el nombre del médico que lo hizo. Por ello se la denomina como la enfermedad de Charcot. Más información sobre Charcot en la **Caja 2**.

Caja 2: J-M. Charcot.

A pesar de que los primeros casos registrados datan de mediados de s.XIX (Aran, 1848) (Cruveilhier, 1852), fue en 1869 cuando el francés Charcot describió por primera vez esta patología (Charcot et al., 1869). Siendo el punto de partida de toda la investigación que realizó durante los siguientes años en la enfermedad y que culminaría con la publicación de sus “Obras Completas” (Charcot, 1874).

Nacido en 1825 en París, obtuvo su título de medicina en 1853. Es en el “Hôpital de la Salpêtrière” donde desarrolló toda su actividad investigadora y médica llegando a obtener la primera cátedra de neurología del mundo en 1882 (Goetz, 2000). Antes de la descripción de la ELA, ya era pionero en el análisis anatómico-clínico, cuando señaló cierta afección medular en un caso de una mujer afectada por una contractura a la cual se le extendía en las cuatro extremidades (Charcot, 1865).

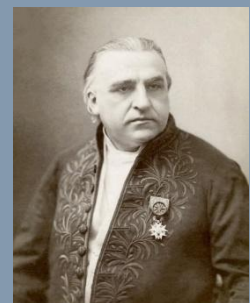


Figura 3: Retrato de Jean-Martin Charcot

La incidencia de la ELA en Europa es de alrededor de 2 casos por cada 100.000 individuos y una prevalencia de 5 en la misma muestra poblacional (Chiò et al., 2013). Con estos datos, la ELA se incluye dentro de las denominadas enfermedades raras. Esta enfermedad suele afectar en una ratio 2,5 mayor a varones que a mujeres. Aunque este valor se puede ver disminuido en cuanto el primero de los síntomas aparece y es diagnosticado con una edad más avanzada (Manjaly et al., 2010).

1.2 Causas

La primera clasificación que se realiza sobre la ELA, viene referida por el origen tisular de la misma. Así, un tipo sería referido como “bulbar”, en cuanto a que el origen de la patología se da en el tronco encefálico. Estos pacientes comienzan con tener dificultades en el habla y posteriormente tendrán afecciones en el movimiento de las extremidades. Este tipo abarcaría un 25% de los casos, y son los que peor pronóstico de esperanza de vida tienen (Turner et al., 2010). En cambio el otro tipo, denominado “espinal”, comienza con la afección en las extremidades para luego ir desarrollando los problemas propios del tipo bulbar. Adicionalmente se podría decir que hay casos atípicos en los que las primeras manifestaciones se dan directamente en la capacidad respiratoria, o también con un deterioro cognitivo. Ver **Figura 4**.

Además la ELA se presenta en dos variantes. La mayoría de los casos se producen de manera esporádica (en torno al 85-90%) mientras que la proporción restante correspondería a una ELA familiar. Esto significa que esa mayoría de casos esporádicos no son debido a un legado genético parental. De manera general, de todas los casos de ELA familiar se han detectado alguna mutación genética en el 20% de los casos. Fue a comienzos

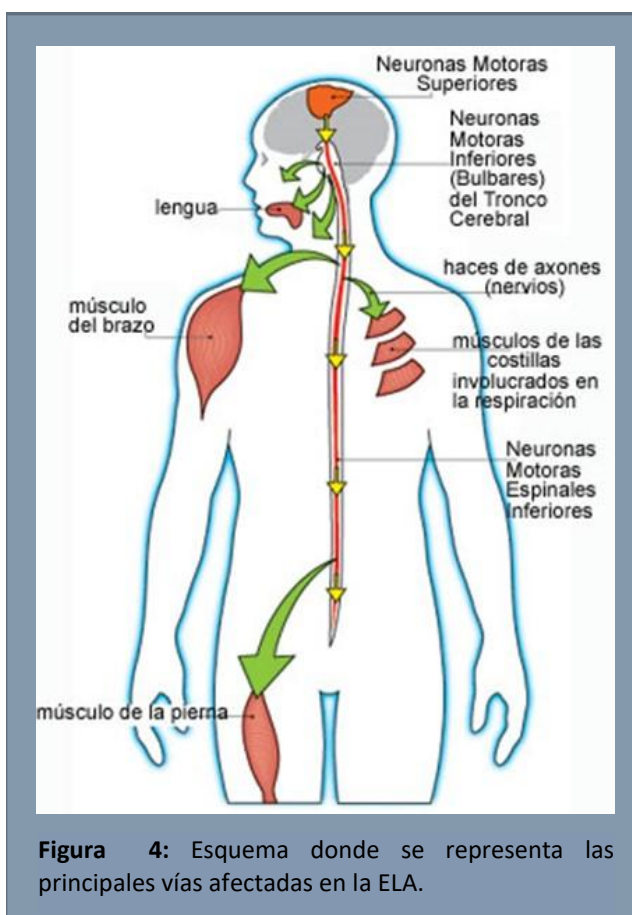
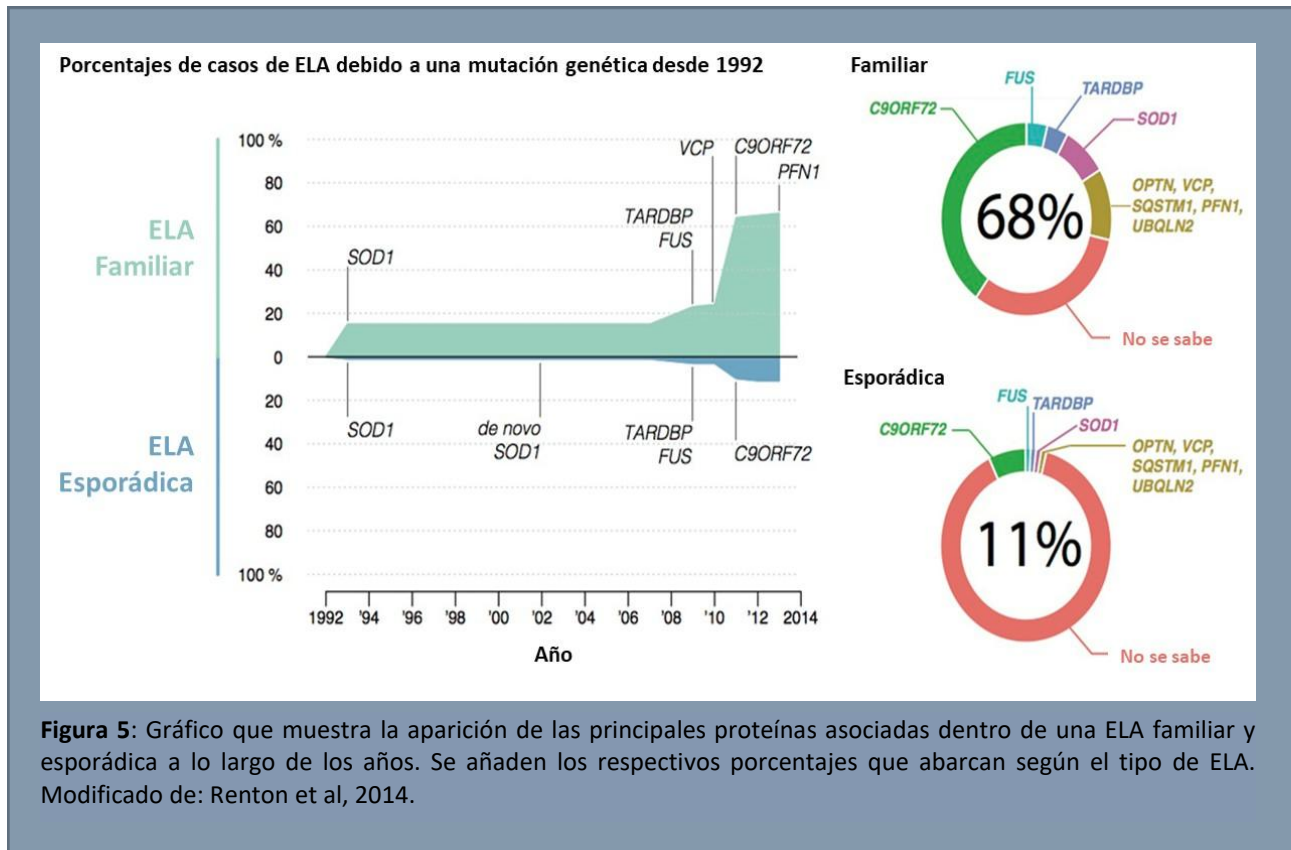


Figura 4: Esquema donde se representa las principales vías afectadas en la ELA.

de los años 90, cuando se identificó la primera mutación en la enzima superóxido dismutasa1 (SOD1) (Rosen et al., 1993). Con el paso de los años se ha ido incrementando la cantidad de mutaciones identificadas en otros genes; como son los casos del gen TARDBP (Neumann et al., 2006), FUS (Kwiatkowski et al., 2009) o UBQLN2 entre otros (Deng et al., 2011). El caso más reciente y relevante ha sido la identificación de la repetición de un hexanucleótido en el gen C9ORF7 como riesgo de padecer la enfermedad (Renton et al., 2014). Dependiendo de la población a tener en cuenta, los porcentajes de casos con una mutación u otra varían. Uno de los últimos metaanálisis revela que mientras que en Europa, es la mutación en C9ORF72 la más común, en Asia es SOD1 la mayoritaria (Zou et al., 2017). Ver **Figura 5** para más información.

Introducción



Sin embargo, diferentes estudios han centrado la atención en la posible implicación de algún factor ambiental en la patogénesis de la ELA, teniendo en cuenta que la mayoría de casos de ELA son de origen esporádica. En esa búsqueda de diversos aspectos ambientales que podrían aumentar el riesgo de afección se han considerado:

- **Agentes tóxicos.** Un ejemplo serían cianotoxinas ingeridas por la dieta (Koerner, 1952). En la isla de Guam se identificó de manera particular una mayor incidencia de la ELA. Este hecho fue achacado al péptido β -methilamino-L-alanina (BMAA) siendo un agente neurotóxico hallado en las semillas de *Cycas micronesica* que mediante la cadena trófica acababa llegando hasta el ser humano. Este péptido también está presente en un tipo de algas y se postula como responsable de casos de ELA en otras poblaciones fuera de Guam (Porojan et al., 2016). En esta dirección se han diseñado ensayos enfocados a la inhibición del péptido con L-serina (Bradley et al., 2017).

- **El exceso de ejercicio físico.** Esta posibilidad fue centro de los focos cuando se hicieron públicos

varios casos en el fútbol profesional italiano (Chiò et al., 2005). Aunque un análisis más metódico de los datos reveló que el riesgo no era mayor que en el resto de la población (Armon, 2007).

- **Metales pesados.** Como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas en las que se conoce cierta relación se ha estudiado su posible implicación. No obstante los datos no reflejan que haya una relación clara (Cicero et al., 2017).

- **Pesticidas.** En un metaestudio realizado apenas se encontró una mayor prevalencia de ELA en regiones cercanas a zonas de cultivo (Vinceti et al., 2017).

Por lo tanto, sin eliminar totalmente la posible implicación de agentes ambientales en la patogénesis, sí queda claro que todavía se necesitan realizar estudios más exhaustivos. Sin dejar de lado el hecho de que cada vez se van conociendo nuevos genes implicados en casos esporádicos.

1.3 Diagnóstico

En cuanto al diagnóstico, a lo largo de los años se han tomado diversos criterios de diagnóstico los cuales se han ido reevaluando para una mejor diagnóstico de la patología. La “World Federation of Neurology” en lo que se conoce como el criterio de El Escorial, dictaminó en 1994 los principales puntos para el diagnóstico de la ELA (Brooks, 1994). De forma general, para ser diagnosticado con ELA se debe constatar una evidencia de degeneración en la neurona motora inferior (NMI) de la misma manera que también debe haber una afección en la neurona motora superior (NMS).

Para la obtención de estos resultados se deben realizar diversos exámenes clínicos y electrofisiológicos. En este sentido las pruebas deben constatar la ausencia de otra patología o enfermedad que pudieran explicar la muerte de la motoneurona (Mitsumoto, 1997). Como se ha mencionado anteriormente, la ELA es la patología más frecuente dentro del grupo de enfermedades que cursan con esta muerte neuronal. Por ello, el diagnóstico inequívoco de la ELA puede demorarse varios años hasta que no se da una confirmación total. Esta necesidad a la hora de mejorar el diagnóstico de la patología, ha llevado a que a lo largo de los años se haya tenido que realizar diversas revisiones en el criterio de diagnóstico (Belsh, 2000).

Por ejemplo, se incluyó la electromiografía (EGM) dentro del convenio realizado en Awaji (Japón) como herramienta para mejorar la identificación en el diagnóstico (de Carvalho et al., 2008). Una mejoría que ha sido certificada por otros grupos de investigación (Geevasinga et al., 2016; Li et al., 2017). A pesar de haber obtenido a día de hoy mejores estrategias para obtener un diagnóstico lo más rápido y acertado posible, se consideran aún insuficientes debido a que esta enfermedad presenta una gran dificultad a la hora de tener una confirmación exacta. Por ello sigue siendo necesario una mayor comprensión de la patología en todos sus niveles (Cortés-Vicente et al., 2017).

Existe una dificultad añadida a la hora de poder diagnosticar la enfermedad. Se habían determinado casos de ELA en los que se desarrollaba una sintomatología cognitiva derivada de una demencia frontotemporal (DFT), y de manera opuesta, casos de DFT que desarrollaban signos de la ELA (Lomen-Hoerth et al., 2003). Se identificó clínicamente hasta un 50% de los casos de ELA en los que en mayor o menor grado padecían déficits cognitivos (Ringholz et al., 2005). Y en otro estudio clínico, pacientes de DFT desarrollaron alteraciones motoras propias de la ELA presentando disfunciones motoras (Burrell et al., 2011). Esto supone que pacientes con ELA tendrían alteraciones a nivel cortical, y pacientes con DFT a nivel espinal. El conjunto de distintos casos patológicos formaría un espectro donde en un extremo habría casos con una ELA pura, y en el otro con una DFT pura. Dándose entre medias, los casos que presentan características propias de ambas enfermedades (Savage et al., 2014).

Este hecho llevó a la idea de que debería haber ciertos elementos comunes en ambas patologías. Tras esa primera hipótesis, se identificó a TDP43 como la principal proteína implicada en casos de ELA con espectro sintomatológico propio de un tipo de DFT (Neumann et al., 2006). En contraposición se encontraría las mutaciones en SOD1 ya que sólo producen casos de ELA puro. 5 años más tarde se identificó la anormal repetición del hexanucleótido GGGGCC (G4C2) dentro de una región no codificante del cromosoma 9 en el “open reading frame” 72 (C9ORF72) como responsable de la mayoría de casos familiares dentro del espectro ELA y FTD (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Además existe la problemática en la identificación exacta de la enfermedad si se tiene en consideración la aparición de diferentes inclusiones proteicas dentro de esos porcentajes (Ling et al., 2015). Ver **Figura 6** para más información.

Introducción

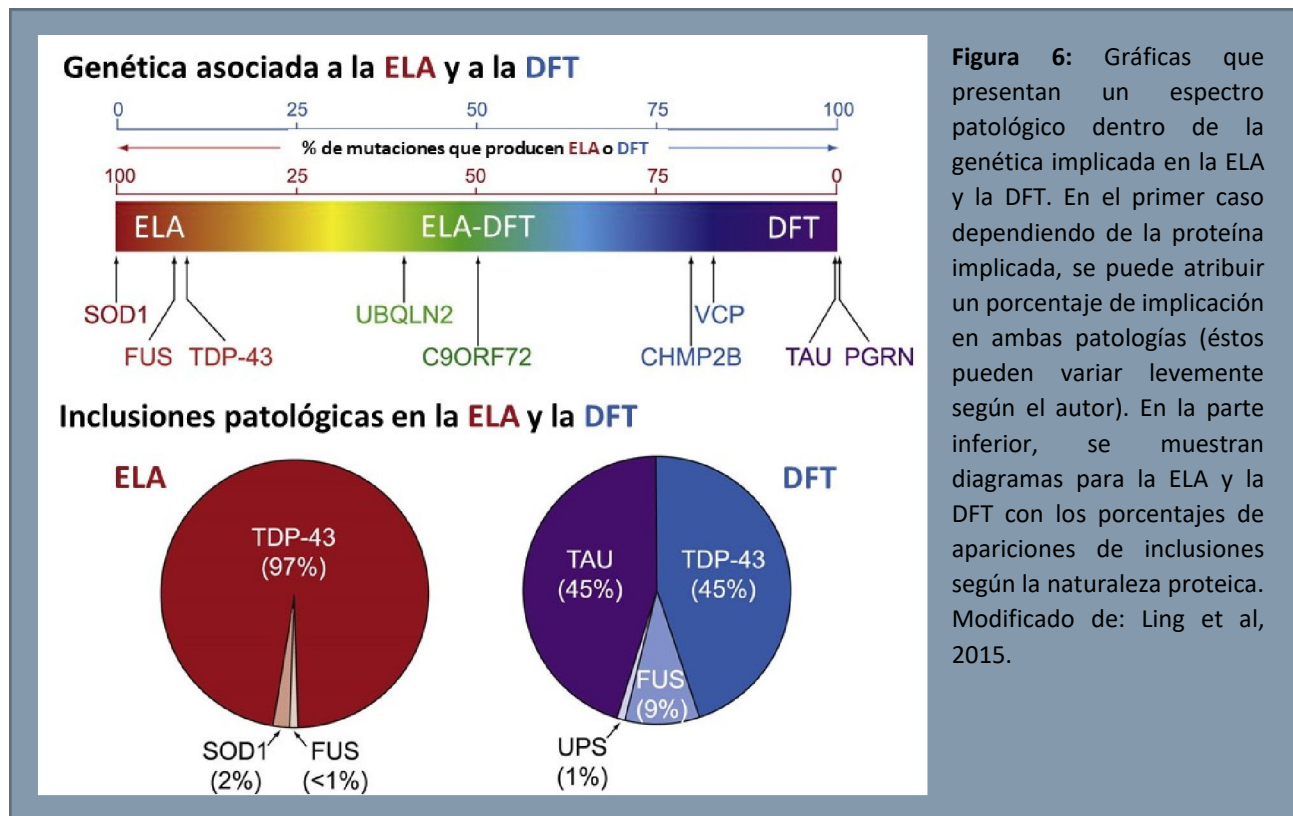


Figura 6: Gráficas que presentan un espectro patológico dentro de la genética implicada en la ELA y la DFT. En el primer caso dependiendo de la proteína implicada, se puede atribuir un porcentaje de implicación en ambas patologías (éstos pueden variar levemente según el autor). En la parte inferior, se muestran diagramas para la ELA y la DFT con los porcentajes de apariciones de inclusiones según la naturaleza proteica. Modificado de: Ling et al, 2015.

1.4 Principales proteínas asociadas a la ELA

Los casos de ELA familiar vienen determinados por diversas mutaciones que implican una alteración estructural proteica y por consiguiente un fallo en el funcionamiento de la propia proteína. En este apartado se describen las principales proteínas

identificadas en la ELA y que han tenido una mayor relevancia en la investigación básica al ser usadas en diferentes modelos animales e *in vitro*. Ver **Tabla 1** para ver la relación de genes identificados en casos de ELA.

Gen	Nombre	Cromosoma	Gen	Nombre	Cromosoma
SOD1	Superóxido dismutasa	21q22.11	SIGMAR1	Receptor intracelular sigma 1 no opioide	9p13
ALS2	Esclerosis lateral amiotrófica 2 (juvenil)	2q33.2	PFN1	Profilina 1	17p13.3
SETX	Senataxina	9q34.13	C9ORF72	Cromosoma 9 secuencia de lectura abierta 72	9p21.2
SPAST	Espastina	2p24	CHMP2B	Proteína cargada de cuerpo multivesicular 2B	3p12.1
FUS	"Fusionado en el sarcoma"	16p11.2	UNC13A	UNC-13 homóloga A	19p13.12
VAPB	VAMP (proteína membranal asociada a vesículas)	20q13.33	DAO	D-aminoácido oxidasa	12q24
ANG	Anglogenina	14q11.1	DCTN1	Dinactina 1	2p13
TARDBP	Proteína de unión a ADN TAR	1p36.22	NEFH	Neurofilamento, polipéptido pesado	22q12.1-q13.1
FIG4	FIG4 homóloga, con dominio de fosfatasa lipídica SAC1	6q21	PRPH	Periferina	12q12
OPTN	Optineurina	10p13	SQSTM1	Secuestrosoma 1	5q35
ATXN2	Ataxina 2	12q23-q24	TAF15	TAF15 ARN polimerasa II	17q11.1-q11.2
VCP	Proteína que contiene valosina	9p13	SPG11	Espástica paraplegia 11	15q14
UBQLN2	Ubiquilina 2	3p11.21	ELP3	Complejo elongador acetiltransferasa subunidad 3	8p21.1

Tabla 1: Lista de genes asociados en la ELA y su localización cromosomal. Modificado de: Al-Chalabi et al., 2013.

1.4.1 SOD1

La superóxido dismutasa 1 (SOD1) fue la primera proteína que se relacionó con la ELA al identificarse mutaciones en su gen (Rosen et al., 1993; Deng et al., 1993). A día de hoy se le atribuye alrededor de un 20% de casos familiares y sólo un 3% de esporádicos con la identificación de alrededor 155 mutaciones, aunque no todas con efectos patogénicos (Saccon et al., 2013).

En su actividad normal forma un homodímero de 32 kDa localizado mayoritariamente en el citoplasma, aunque también se puede encontrar en el núcleo (Senoo et al., 1988). Con la presencia de cobre y zinc, es capaz de eliminar radicales superóxido (O_2^-) y convertirlos en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Esto convierte a SOD1 en una de las principales proteínas encargadas de evitar el estrés oxidativo que se produce como consecuencia de la actividad metabólica celular o derivado de una respuesta a factores exógenos derivados de una inflamación (Fridovich, 1995). Actualmente se cree que puede desempeñar además otros roles en la señalización por glucosa y estabilización de ARN como factor de transcripción (Bunton-Stasyshyn et al., 2015; Tsang et al., 2014).

La primera mutación descrita (y una de las mutaciones más frecuentes que se dan en SOD1), es el cambio de una glicina por una alanina en la posición 93. Este simple cambio provoca la alteración proteica que desencadena la muerte progresiva y selectiva de las motoneuronas (Rosen et al., 1993). Desde entonces otras mutaciones han sido identificadas en SOD1. Algunos ejemplos serían: la A4V, que es la más común en Norteamérica (Armon, 2009); la mutación D90A; o la mutación más típica en Italia, la G41S (Battistini et al., 2010). Así hasta tener alrededor de 150 mutaciones identificadas (Cleveland et al., 2001; Kaur et al., 2016).

Para el estudio de la implicación de SOD1 en la ELA, se diseñó rápidamente un modelo murino transgénico con la primera mutación humana descrita, la G93A (Gurney et al., 1994). Los ratones transgénicos SOD1 (G93A) tras padecer debilidad muscular y posteriormente desarrollar una parálisis, terminan muriendo a los 5 o 6 meses. Este ha sido de hecho, el principal modelo animal usado en la investigación básica hasta la fecha. Eso no quiere decir que otros modelos hayan ido surgiendo desde entonces con la inclusión de otras mutaciones en SOD1. Aparte también se ha estudiado la ausencia de SOD1. Ratones *knock out* para SOD1 en homocigosis fueron viables en el desarrollo. Además no presentaron deficiencias motoras, pero sí una mayor sensibilidad a la muerte después de una lesión axonal (Reaume et al., 1996). Por ello no queda claro la relación existente entre la pérdida de una correcta funcionalidad en SOD1 con la enfermedad.

A pesar de este hecho, el conjunto de diferentes modelos ha posibilitado una mejor comprensión de los diferentes eventos tóxicos envueltos como consecuencia de la presencia de una SOD1 mutada (Turner et al., 2008). El efecto principal que se aprecia cuando SOD1 muta es una axonopatía distal predominantemente en los motoneuronas inferiores (Fischer et al., 2004). Aunque no se produce de forma exclusiva, ya que también puede haber afección en las vías superiores (Zang et al., 2002). SOD1 mutada, al estar mal plegada provoca la aparición de agregados citoplasmáticos que son tóxicos para la célula (Johnston et al., 2000). Y como consecuencia de su mal funcionamiento, una disfunción mitocondrial (Dal Canto et al., 1995). También puede presentar una fragmentación en el aparato de Golgi lo que implica estrés del Retículo Endoplásmico (RE) (Mourelatos et al., 1996). Estas y otras consecuencias vienen recogidas en la **Figura 7**.

Introducción

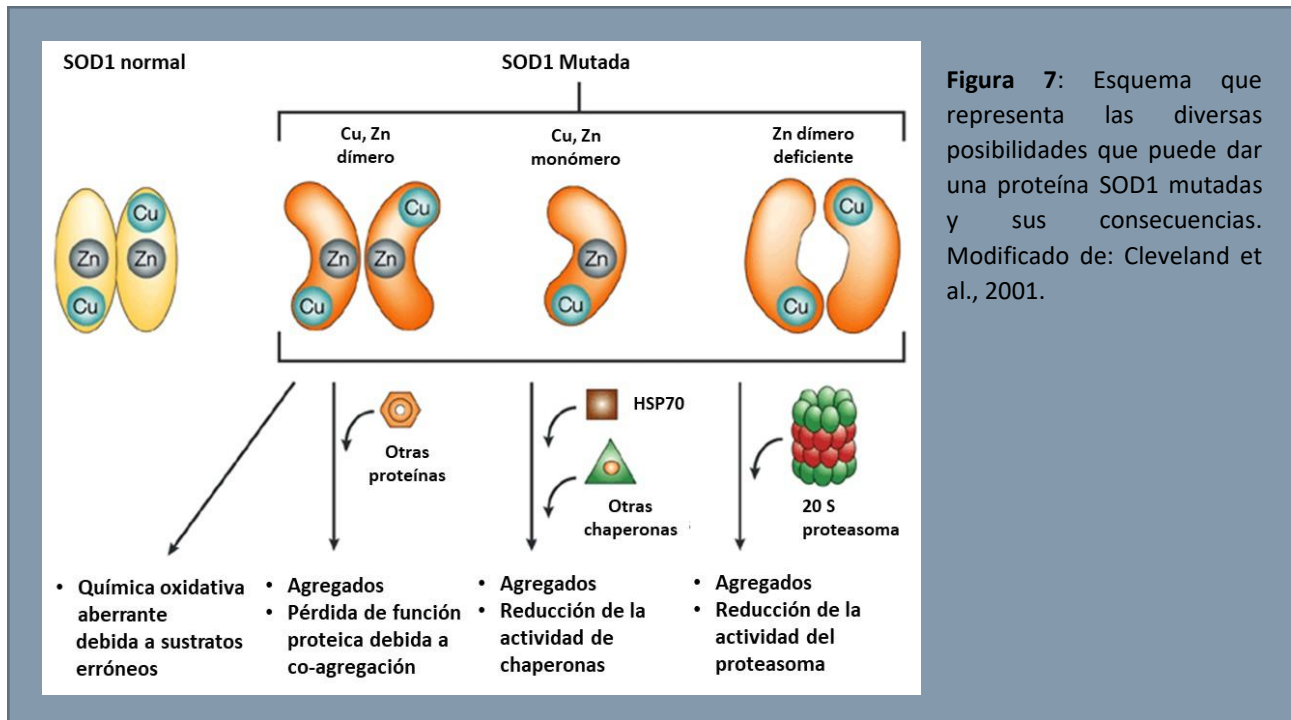


Figura 7: Esquema que representa las diversas posibilidades que puede dar una proteína SOD1 mutada y sus consecuencias. Modificado de: Cleveland et al., 2001.

1.4.2 TDP43

En un principio, la proteína de unión a ADN con un peso molecular de 43KDa (TDP43 del inglés) se catalogó dentro de la familia de las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) identificándose como un modulador genómico del virus HIV-1 (virus de inmunodeficiencia humana 1) (Ou et al., 1995). Seguidamente se constató su capacidad de unión con el regulador transmembranal de fibrosis cística humano (CFTR) (Buratti et al., 2001b). Esto es posible gracias a la posesión de dos regiones de reconocimiento de ARN (RRM) (Buratti et al., 2001a) lo que permite a TDP43 unirse tanto a moléculas de ARN, como a ADN. Estas regiones de reconocimiento están conservadas a lo largo de la escala evolutiva desde el *Caenorhabditis elegans* hasta los mamíferos (Wang et al., 2004).

Codificada en el gen TARDBP, el cual se localiza en el cromosoma 1p36, se transcribe en una proteína de 414 aminoácidos. En su estado nativo TDP43 forma un homodímero (Kuo et al., 2009) cuya región N-terminal es esencial para esa unión dimérica (Jiang et al., 2017). Aparte de los mencionados motivos RRM, posee una región rica en el aminoácido glicina dentro del dominio C-terminal, necesaria para su correcta funcionalidad

(Ayala et al., 2005). Además, la proteína TDP43 también posee una región de señalización de exportación nuclear (NES). A la que hay que sumar otra región de señalización de localización nuclear (NLS) dentro del dominio N-terminal. Ver **Figura 8** para más detalle. Estos motivos permite que TDP43 se transloque del núcleo al citoplasma o viceversa dentro de su correcto funcionamiento (Winton et al., 2008) como puede ser el de aumentar la estabilización de moléculas de ARN (Ratti et al., 2016). Un ejemplo de su actividad sería la modulación de la proteína β -aducina2 (ADD2) relacionada con fenómenos de plasticidad sináptica, memoria y aprendizaje (Costessi et al., 2014). Es interesante saber que entre los genes que regula TDP43, está incluido su propio gen, es decir, TDP43 se autorregula (Ayala et al., 2011). En cambio, cuando TDP43 está mutada, se produce la agregación citoplasmática de la proteína y el consiguiente aclarado nuclear llevando así al desencadenamiento patológico (Neumann et al., 2006).

Fue en el año 2006 cuando se identificó a TDP43 como el principal responsable de los agregados encontrados en las neuronas en pacientes con ELA y DFT cuyas inclusiones eran positivas para

ubiquitina (Neumann et al., 2006). En casos de ELA esporádicos (y casos con signos de demencia) donde no se detectó ni SOD1 mutada ni TDP43 mutada, también se hallaron agregados citoplasmáticos de TDP43 los cuales además estaban altamente ubiquitinizados (Mackenzie et al., 2007). Además, esas inclusiones citoplasmáticas de TDP43, se encontró un alto grado de fosforilación, principalmente en la región C-terminal (Hasegawa et al., 2008). Este hecho indica que no es necesario que TDP43 se encuentre mutada para que se puedan formar agregados de la proteína en estas patologías, y en otras que serán comentadas más adelante. Hoy en día, se ha realizado la subdivisión en diferentes tipos de enfermedad dependiendo de las inclusiones encontradas. Por ejemplo, los casos positivos para inclusiones de TDP43 en los que se produce un solapamiento de la ELA y DFT estaría principalmente dividido en los tipos A y B, siendo C9ORF72 el principal responsable de este segundo grupo (Lashley et al., 2015).

Desde que se identificó a TDP-43 como la proteína responsable de los agregados citosólicos positivos para ubiquitina, se han identificado múltiples mutaciones de la proteína (Yokoseki et al., 2008; Gitcho et al., 2008; Benajiba et al., 2009), en casos

familiares de ELA y también en casos esporádicos (Sreedharan et al., 2008). Algunas de esas mutaciones se pueden dar en la zona N-terminal de la proteína (Mompeán et al., 2017), pero la mayoría de ellas localizan en la parte C-terminal, la cual es rica en glicina (Mackenzie et al., 2010). Ver **Figura 8** para más detalle.

Las inclusiones formadas en el citoplasma se procesan vía autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés *chaperone-mediated autophagy*) donde el motivo de enclave Q¹³⁴VKKD¹³⁸ hallado en el RRM1, es imprescindible (Huang et al., 2014). Previamente se comprobó que en la formación de inclusiones de TDP43 se debía en gran manera a escisiones de la propia proteína en la parte C-terminal. Como resultado de la acción de las proteínas caspasas, se forman fragmentos de 25 KDa (TDP25) que pueden ser igualmente ubiquitinizados y fosforilados que la proteína nativa. Estos fragmentos son en mayor medida los causantes de la formación de las inclusiones (Zhang et al., 2009). También se pueden formar fragmentos de 35 KDa. Ambos se forman igualmente a partir la parte C-terminal de la proteína nativa y también forman complejos con la proteína no alterada (Kitamura et al., 2016). Mientras que TDP35 contiene los dominios RRM1,

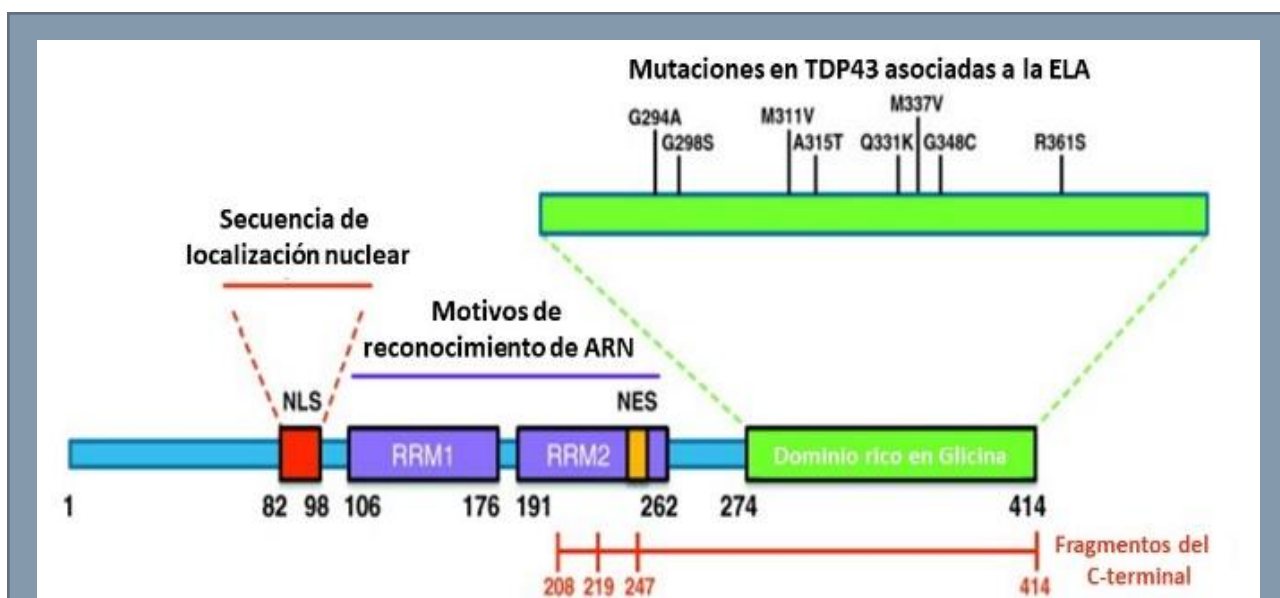


Figura 8: Representación de los principales dominios de la proteína TDP43. Entre ellos se encuentran los motivos de reconocimiento RRM para interactuar con ARN y ADN. La secuencia NLS que le permite moverse entre el núcleo y el citoplasma. Y una región rica en glicina donde se concentran la mayoría de las mutaciones más relevantes. En la parte baja se muestra los posibles fragmentos que se pueden formar por su parte N-terminal. Modificado de: Cohen et al., 2011.

Introducción

RRM2 y toda la parte C-terminal, TDP25 sólo RRM2 y el C-terminal. Recientemente se ha postulado que las diferentes interacciones que se pueden dar en la propia TDP43 con sus diferentes dominios son las que marcan el grado de toxicidad de las inclusiones que se forman en mayor o menor medida (Wey et al., 2017). Ya que como se había demostrado anteriormente, algunas de sus posibles mutaciones pueden conferir a los agregados formada cierta resistencia a la degradación dificultando su aclaramiento citoplasmático (Kabashi et al., 2008).

A lo largo de los años, se ha establecido el debate sobre si las mutaciones en TDP43 y el consecuente aclaramiento nuclear con la consecuente formación de inclusiones citoplasmáticas abocaban a una toxicidad por una ganancia de función de esas inclusiones, o si por el contrario, se producía una disminución de la funcionalidad al no hallarse en el núcleo (Lee et al., 2011). Lógicamente, la presencia de mutaciones en el gen TARDBP provoca una disrupción en la funcionalidad de la proteína. Dependiendo de la mutación que se dé en TDP43, esta podría ganar o perder funcionalidad al poder verse incrementado (o disminuido) la interacción con cualquiera de los transcritos diana que la proteína tiene (Arnold et al., 2013). Aparte, mutaciones en las proteínas con las que TDP43 se relaciona también pueden originar una interacción aberrante y una formación de agregados de TDP43 que llevan al desarrollo de la patología. Un ejemplo de este tipo de interacción proteica, se da con la ataxina-2 (ATX-2). Esta es una proteína poliglutamínica implicada en la reorganización del citoesqueleto y también se la relaciona con el metabolismo del ARN (Carmo-Silva et al., 2017). Cruzando ratones KO para esta proteína con ratones mutantes para TDP-43, comprobaron una menor presencia de agregados junto a una mejora motora y supervivencia (Becker et al., 2017). Otro ejemplo sucede con la profilina-1 (PFN 1), una proteína que se une a la actina para la estabilización del citoesqueleto (Carlsson et al., 1977). Se han identificado mutaciones en esta proteína que llevan a PFN1 al secuestro de TDP43 en agregados

proteicos altamente fosforilados, y que presentan un alto grado de resistencia a la degradación (Tanaka et al., 2016).

Una de las posibles explicaciones de la traslacionalidad que presenta TDP43 respecto a aspectos patológicos que abarcan desde las disfunciones motoras a las cognitivas, puede ser debida al comportamiento de los agregados. Algunos grupos le adjudican cierta capacidad priónica (Smethurst et al., 2016). Esto supondría que esos agregados pueden infectar células sanas provocando la posterior degeneración. A partir de lisados de cerebros de pacientes con mutaciones en TDP43, se usaron agregados insolubles para infectar cultivos neuronales SH-SY5Y. Esta línea neuronal dopaminérgica posteriormente presentaba agregados de la proteína (Nonaka et al., 2013). Se obtuvieron las mismas conclusiones, al usar también homogeneizados de médula espinal sobre una línea celular de motoneuronas NSC-34 (Smethurst et al., 2016).

De manera adicional, la formación de agregados citoplasmáticos de TDP43 se pueden encontrar en múltiples enfermedades neurodegenerativas, no sólo en la ELA y la DFT (Langsbury et al., 2006). Entre esas patologías figuran la enfermedad de Alzheimer (EA) (Josephs et al., 2015). En casos esporádicos de EA se ha visto una correlación de presencia de TDP43 con casos donde se ha producido una mayor atrofia hipocámpal (Josephs et al., 2017). También se pueden encontrar en pacientes que sufren la enfermedad de Parkinson (Chanson et al., 2010). Incluso se han encontrado en enfermedades menos conocidas, como sería el llamado "síndrome de Perry". Esta es una rara patología parkinsoniana con cuadros de depresión, pérdida de peso e hipoventilación, cuya etiología ha sido identificada por una mutación en la proteína dinactina, donde se han encontrado inclusiones de TDP43 (Mishima et al., 2017). El hecho de que TDP43 en otras patologías aparte de la ELA o la DFT ha llevado a que se acuñe la terminología de TDP43 proteinopatías (Nascimento et al., 2017).

1.4.3 C9ORF72

Recientemente se ha identificado como la mutación genética más común en la ELA y la DFT, la repetición del hexanucleótico GGGGCC dentro del cromosoma 9 (Renton et al., 2011; DeJesus-Hernandez et al., 2011), aunque ya se había identificado la anomalía 20 años antes en una familia con un alto índice de casos de ELA (Gunnarsson et al., 1991). Lo normal es poseer entre 2 y 8 repeticiones, mientras que casos de enfermos que se han registrado poseen más de 30 (Majounie et al., 2012). Pacientes con estas repeticiones muestran la aparición de inclusiones en neuronas y glía (Ash et al., 2013). La formación de estas inclusiones o agregados es debida a que la secuencia repetida da lugar a traducciones proteicas llamadas DRP (del inglés dipeptide-repeat proteins), las cuales también se originan en la lectura "anti-sentido", es decir CCCCGG (Mori et al., 2013). Estas inclusiones pueden ser positivas para p62 y negativas para TDP43 en distintos tipos neuronales del cerebelo y el hipocampo (Al-Sarraj et al., 2011). En otro estudio poblacional diferente, se volvieron a encontrar las inclusiones positivas de p62 en las neuronas y la glía de regiones no motoras. En cambio, en las motoneuronas las inclusiones citoplasmáticas fueron positivas para TDP43 (Cooper-Knock et al., 2012). Esta disparidad de inclusiones en diferentes regiones supone una pobre comprensión de la patología propia de la mutación en C9ORF72 con la dificultad añadida del solapamiento de efectos que se tiene cuando TDP43 está mutada (Schipper et al., 2016).

Aunque suene obvio, un dato que sí parece relevante es el propio tiempo. Es decir, que durante el transcurso de la enfermedad podrían darse la aparición de todas las marcas patológicas. En un estudio poblacional, hubo casos positivos con la mutación en C9ORF72 que murieron prematuramente por causas no derivadas de la

enfermedad. En estos casos sólo se encontraron las inclusiones negativas para TDP43 en las regiones no motoras (Baborie et al., 2015). En línea a este argumento, van los datos de los primeros modelos animales surgidos, donde una falta de sintomatología motora y comportamental en unos ratones con una cantidad alta de repeticiones de C9ORF72 humano desarrollaron las inclusiones negativas para TDP43 (O'Rourke et al., 2015). Se tuvieron idénticos resultados en otro modelo murino con unas 500 repeticiones (Peters et al., 2015). Usando un modelo con un fondo genético diferente, han conseguido que no sólo tuviera estas marcas patológicas sino que el ratón presentara deficiencias motoras y degeneración cortical e hipocampal (Liu et al., 2016).

Desconociendo aún la funcionalidad de la proteína que codifica este gen, a partir de pacientes que tenían la mutación de C9ORF72 se tomaron células pluripotenciales inducibles (IPSCs del inglés) que fueron diferenciadas a neuronas. Estas neuronas mostraron además de una repetición masiva de C9ORF72, una desregulación genética y una mayor susceptibilidad a la excitotoxicidad respecto a neuronas diferenciadas de casos controles (Donnelly et al., 2013). Otro estudio posterior que usaba la misma técnica, ha visto que estas neuronas diferenciadas también presentan un mayor estrés oxidativo que podría afectar a la función mitocondrial (López-González et al., 2016). Y en otro trabajo adicional, se detectó fallos en la homeostasis de calcio (Dafinca et al., 2016). Todos estos resultados apuntan a que la funcionalidad celular de C9ORF72 estaría implicada en procesos celulares parejos al resto de proteínas que están implicadas en la ELA.

Introducción

1.4.4 Otras proteínas asociadas

- FUS/TLS

La proteína FUS/TLS (fused in sarcoma/translocated in liposarcoma) se encuentra en el gen *FUS* dentro del cromosoma 16 y está formada por 526 aminoácidos (Aman et al., 1996). De igual manera que TDP43, tiene en su estructura un dominio RRM que le permite interactuar con ácidos nucleicos lo que habilita a FUS a desarrollar funciones similares sobre el metabolismo del ARN. Aunque en este caso forma parte de la familia proteica conocida como FET (*FUS/EWS/TAF15*) que igualmente en condiciones normales se localizan en el núcleo (Andersson et al., 2008). Con la identificación de diversas mutaciones en *FUS* asociadas a la ELA, se descubrió un aclaramiento nuclear que desencadenaba la presencia de agregados citosólicos y la aparición de defectos en el metabolismo del ARN (Kwiatkowski et al., 2009). De igual manera también se han encontrado altos niveles de *FUS* insoluble en muestras de pacientes con DFT (Neumann et al., 2009). No es coincidencia sus semejanzas a TDP43 puesto que a *FUS* también se la considera una hnRNP (Calvio et al., 1995). También se le asume un papel reparador del ADN, por lo que fallos en su funcionamiento incrementan el daño neuronal provocando la muerte de motoneuronas (Wang et al., 2013).

Otros estudios también señalan la posibilidad de la toxicidad y la muerte neuronal debido a un exceso de ganancia funcional debido a las inclusiones citoplasmáticas (Scekic-Zahirovic et al., 2016). De manera indirecta también se relaciona con procesos de estrés oxidativo, ya que es un regulador transcripcional asociado a PGC-1 α (proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α) que es un coactivador transcripcional de proteínas desactivan especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sánchez-Ramos et al., 2011) y que está implicado en la biogénesis mitocondrial y su correcta funcionalidad (Handschin et al., 2009). Además, se le conocen interacciones con proteínas que

modulan la estabilidad del citoesqueleto, como serían Tau (*MAPT*) o la profilina-1 (Ishigaki et al., 2012; Wu et al., 2012).

- Ubiquinilina 2

La ubiquinilina 2 (*UBQLN2*) es una proteína que regula la degradación de proteínas que han sido marcadas con la proteína ubiquitina para su degradación en el proteasoma. Esta proteína fue ligada a casos de ELA (con y sin signos de demencia) con una herencia ligada al cromosoma X, cuando se la identificó mutada en muestras de médula dorsal de pacientes (Deng et al., 2011). El fallo en su funcionamiento en la degradación de proteínas se postula como causa de la aparición de agregados neuronales, los cuales también colocalizan con TDP43 y *FUS* de manera frecuente (Williams et al., 2012).

- Ataxina 2

La ataxina 2 (*ATXN2*) es una proteína relacionada con la organización del citoesqueleto cuya mutación de una expansión de su cola de poliglutamina ya estaba relacionada con la ataxia espinocerebelar tipo 2, pero además se la ha relacionado con la ELA cuando su expansión de poliglutaminas alcanza la cifra de 30 repeticiones, diez más de lo normal. No obstante, es su posible asociación con TDP43 la que hace que cuando la *ATXN2* esté mutada se formen complejos en la médula espinal (Elden et al., 2010). Otro factor que apoya esta idea es que casos de ataxia espinocerebelosa tipo 2 presentan en las células de Purkinje la deslocalización celular de TDP43 en el citoplasma (Elden et al., 2010). Además también se ha descrito su relación con la proteína reguladora *FUS*, al encontrarse colocalizada en muestras de médula espinal de pacientes, concretamente en las motoneuronas lo que supondría un nuevo aporte sobre una proteína que al estar mutada aumentaría el riesgo de ELA al implicarse en su patogénesis (Farg et al., 2013).

1.5 MECANISMOS PATOGENICOS

Tras haber comentado diversas proteínas asociadas y sus funciones, ahora es posible una mejor comprensión de las implicaciones que se derivan de sus mutaciones o en el caso que la enfermedad sea de origen esporádico. Existen por ello, diferentes procesos implicados en la patofisiología de la ELA que bien pueden ser encontrados en otras enfermedades neurodegenerativas. A día de hoy conocemos los principales mecanismos implicados: estrés oxidativo, la excitotoxicidad, inflamación, y agregación proteica. No obstante, ese conocimiento no ha alcanzado aún la suficiente comprensión sobre cómo esos eventos perjudiciales se manifiestan de manera simultánea convergiendo en una patología común. Ver **Figura 9**.

1.5.1 Agregación proteica

Como ya se ha ido explicando, la presencia de mutaciones en diversas proteínas puede desembocar en una alteración estructural de las mismas. Estos fallos llevan a que se vean alteradas la funcionalidad y las interacciones que esas proteínas tengan con otras o incluso con ella misma. Centrados en este último aspecto, una incorrecta asociación proteica suele concurrir a la formación de agregados que colapsan los mecanismos de degradación celular lo que acaba provocando la muerte de la célula.

Tras el reconocimiento de diversas mutaciones de SOD1 en casos de ELA familiar entre las que se encuentra G93A, se transfectaron neuronas con dichas mutaciones las cuales provocaron la aparición de agregados de la proteína.

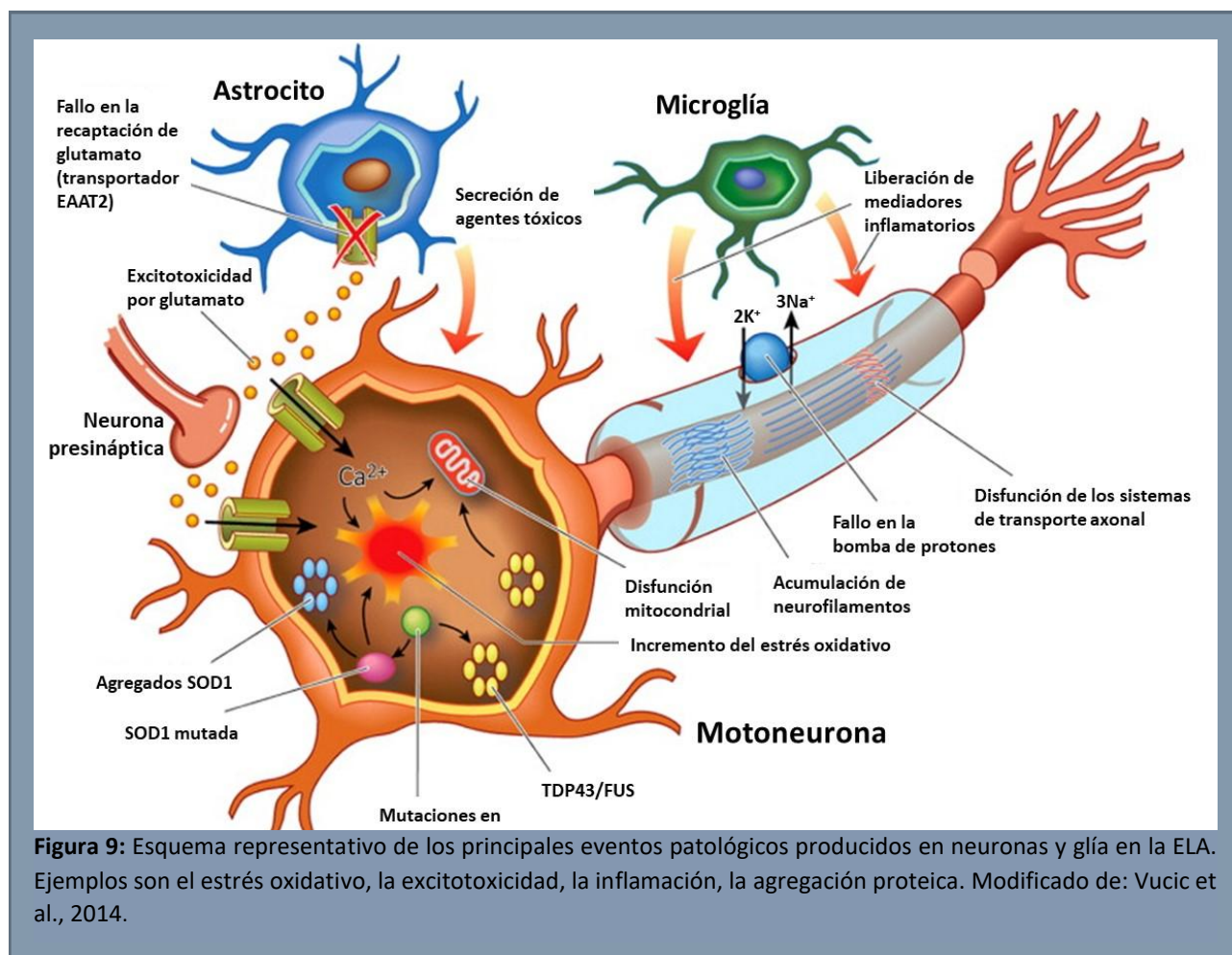


Figura 9: Esquema representativo de los principales eventos patológicos producidos en neuronas y glía en la ELA. Ejemplos son el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la inflamación, la agregación proteica. Modificado de: Vucic et al., 2014.

Introducción

Estos agregados demostraron ser más tóxicos en motoneuronas que en otros tipos neuronales como las hipocampales. Las transfecciones realizadas con una SOD1 inalterada no provocaron la aparición de dichos agregados (Durham et al., 1997). Parece claro que ni la ausencia total de SOD1 (al formar ratones knock-out para SOD1), ni un aumento de la forma silvestre influye en la patología, pero cuando aparece una mutación en la proteína sí se produce una formación aberrante de la misma y la consecuente presencia de agregados (Bruijn et al., 1998). En paralelo a la formación de agregados de SOD1, se ha descrito un descenso en la actividad citoplasmática de las chaperonas en la espina dorsal de los ratones transgénicos SOD1 (G93A) a diferencia de las de los animales con la SOD1 WT (Tummala et al., 2005). La agregación proteica se manifestó cuando homogeneizados de médula espinal de pacientes con ELA familiar por mutaciones en SOD1, provocan la aparición de inclusiones en cultivos celulares (Pokrishevsky et al., 2017). Otros mecanismos también favorecen la aparición de agregados de SOD1. La sumoilación de SOD1 mediante la proteína SUMO3 ha sido descrita como un proceso que aumenta y acelera la agregación de la SOD1 (Niikura et al., 2014).

Además, trabajando con SOD1 mutada en diferentes líneas celulares para explicar la sensibilidad de las motoneuronas, se ha identificado que la línea celular de músculo C2C12 posee mecanismos proteasómicos más eficientes que la línea celular híbrida de motoneuronas NSC-34 lo que evita la formación de agregados (Onesto et al., 2011). Otro grupo trabajando con esta misma línea, detecta agregados de SOD1 sólo cuando es transfectada con la proteína SOD1 mutada y no con la SOD1 normal (Gomes et al., 2010). Por otro lado, los agregados de SOD1 no son los únicos que pueden afectar a la correcta funcionalidad del proteasoma. Se ha demostrado

que también los DRPs que se forman por la mutación en C9ORF72 bloquean el proteasoma (Gupta et al., 2017).

Previamente se ha hecho mención de la formación de inclusiones de la proteína TDP43 las cuales no tienen por qué ser debidas a sus mutaciones (Mackenzie et al., 2007; Neumann, 2009). Se ha comprobado una mayor supervivencia neuronal cuando se incrementó la actividad autofágica al favorecer una disminución de agregados de TDP43 (Barmada et al., 2014). Más allá de la propia toxicidad de los agregados, la presencia de inclusiones de TDP43 o de FUS también ocasionan de manera indirecta un plegamiento erróneo de SOD1 (Pokrishevsky et al., 2012).

1.5.2 Excitotoxicidad

Se entiende por excitotoxicidad al efecto patológico que se produce debido a un exceso de activación neuronal debida al neurotransmisor excitatorio glutamato. Esta sobreactivación mediada por los receptores de tipo NMDA y AMPA (N-metil-D-aspartato y α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico respectivamente) daña las neuronas y provoca su muerte a través de una excesiva señalización mediada por calcio que lleva a la activación de vías apoptóticas (Manev et al., 1989).

En condiciones normales se mantiene una correcta homeostasis del glutamato liberado en las sinapsis mediante una familia de transportadores de glutamato dependiente de sodio. Estos receptores se diferencian entre sí dependiendo del tipo de célula en el que se expresan y la regulación que tiene cada tipo. Los transportadores de aminoácidos excitatorios 1 y 2 (EAAT1 y 2, también conocidos como GLAT y GLT1 respectivamente) son propios de la astrogliá, EAAT3 y 4 de neuronas, y EAAT5 de la retina (Sims et al., 1999).

A partir de tejidos *post mortem* de pacientes afectados, se comprobó que presentaban una menor detección de EAAT2 en corteza y médula espinal con cambios muchos menos relevantes en EAAT1 o en los transportadores neuronales EAAT3 y 4 (Rothstein et al., 1995). Aunque el hecho de que los niveles de glutamato en plasma y en el fluido cerebroespinal no variaran al compararlos con los sujetos controles podría sugerir que el aumento de la excitotoxicidad es una consecuencia y no una causa (Bendotti et al., 2001).

Con los primeros modelos animales de SOD1 mutada, se verificó que el estrés oxidativo provocaba la oxidación del transportador EAAT2 de los astrocitos lo que llevaba su inactivación y por consiguiente, al exceso de glutamato en la brecha sináptica (Trotti et al., 1999). De forma concreta, la inactivación del transportador EAAT2 se produce mediante la actividad de la Caspasa-3 (Boston-Howes et al., 2006). En cualquier caso, a diferencia de los astrocitos que poseen la mutación de SOD1, astrocitos normales activados sí son capaces de modular el exceso de glutamato (Benkler et al., 2013).

La toxicidad por glutamato no se produce exclusivamente mediada por los transportadores EAAT2. También se ha demostrado la implicación de los receptores metabotrópicos. El uso de un agonista para los receptores metabotrópicos presinápticos mGLUR1 y mGLUR5 provocaba un aumento de liberación de glutamato lo que agravaba el fenotipo de los ratones transgénicos SOD1 (G93A) (Giribaldi et al., 2013). En contraposición, estos ratones SOD1 fueron

cruzados para generar un nuevo fenotipo para carecer parcialmente de los autorreceptores mGLUR1 (Milanese et al., 2014), o mGLUR5 (Bonifacino et al., 2017), los cuales presentaron una mejora en la sintomatología, así como en la supervivencia.

De forma adicional la microglía puede modular en menor medida los niveles de glutamato a través de su sistema x_c^- (del inglés: a cystine/glutamate antiporter with the specific subunit xCT/Slc7a11) que puede introducir o liberar glutamato según las condiciones (Persson et al., 2006). Este sistema aumenta en expresión y funcionalidad a través de su subunidad xCT cuando la microglía se activa como puede darse en eventos inflamatorios (Mesci et al., 2015) lo que podría favorecer una mayor presencia del neurotransmisor en las sinapsis.

1.5.3 Inflamación

En el momento que se produce un evento perjudicial dentro del sistema nervioso, se produce una respuesta glial. Cambios morfológicos, liberación de citoquinas, etc son la consecuencia de esa activación celular. La glía, que constituye el mayor número de células del SN, representada por los astrocitos y la microglía, son los máximos responsables de una respuesta que en un comienzo tiene un papel protector y de reparación. Pero si dicha respuesta persiste en el tiempo, la sobreactivación de esas células acaba produciendo un daño neuronal hasta precipitar la muerte celular. Este proceso ocurre en diversas enfermedades neurodegenerativas además de la ELA (Ilieva et al., 2009). No en vano, Ver **Caja 3** para una mayor información sobre estas células gliales en la ELA.

Caja 3: Astrocitos y microglía.

ASTROCITOS

Tradicionalmente, los astrocitos (cuyo nombre procede por su identificación como se muestra en la **Figura 10**), han estado en un segundo plano a la hora del estudio de cualquier procedimiento patológico. No obstante, en los últimos 20 años este hecho ha cambiado (Gorshkov et al., 2018). No en vano, en condiciones normales desempeñan una amplia variedad de funciones. Suelen ser conocidos por ser el soporte energético de las neuronas (Nortley et al., 2017), debido a que regulan el flujo sanguíneo en el cerebro (MacVicar et al., 2015). También mantiene una correcta homeostasis de los neurotransmisores de glutamato y GABA en las sinapsis, tanto por la propia síntesis como por el control que realizan de ellos en la brecha sináptica (Schousboe et al., 2013). Además, se le ha asignado recientemente un papel en la sinaptogénesis y el correcto desarrollo del circuito neuronal (Clarcke et al., 2013). Y dentro del papel de protección neuronal, es capaz de eliminar del espacio extracelular ROS procedentes de la respiración celular o de eventos patogénicos (Drukarch et al., 1998).

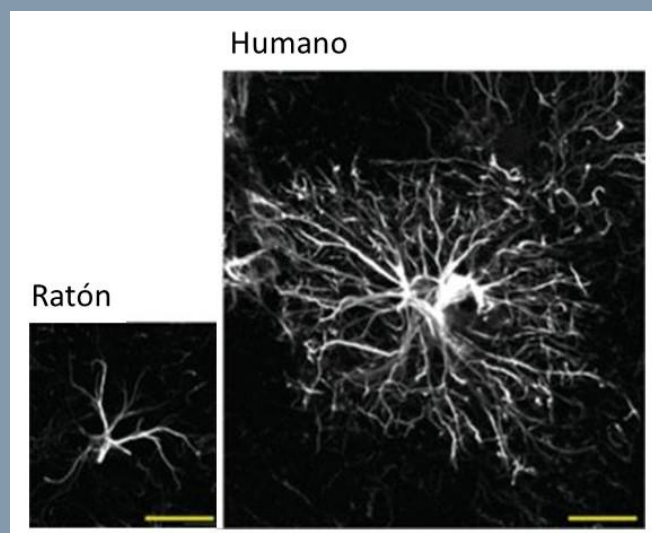


Figura 10: Astrocitos. Inmunodetección de la proteína GFAP en astrocitos de ratón y de humano con forma estrellada. El tamaño del humano es más grande y forma una estructura más compleja al mantener un mayor número de conexiones que un astrocito de ratón. La barra de escala equivale a 20µm. Modificado de: Oberheim et al., 2012.

Pero cuando ocurre un evento patológico, los astrocitos sufren un cambio a un estado “activado” caracterizado por un aumento de la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP denominado astrogliosis (Colangelo et al., 2014). En esta situación, el astrocito empieza a liberar interleuquinas inflamatorias como el interferón γ (IFN- γ) o la interleuquina 1 β (IL-1 β) (Sheng et al., 2013). También forman la llamada cicatriz astrogliosa, que contrariamente al pensamiento popular, su función está relacionada con un adecuado crecimiento axonal (Anderson et al., 2016).

Astrocitos que poseen la proteína SOD1 mutada han demostrado ser capaces de matar neuronas mediante la liberación de factores (Nagai et al., 2007; Ramírez-Jarquín et al., 2017). En cambio, no queda claro el efecto que puede producir la mutación de TDP43 respecto a la activación del astrocito y sus efectos en las neuronas (Haidet-

Phillips et al., 2013). Sí se sabe que también son capaces de modular la propia activación microglial. En un experimento animal en el que se deleccionaba la mutación de SOD1 en los astrocitos, se comprobó una menor activación microglial (Yamanaka et al., 2008). Esa modulación puede ser debida por ejemplo a la liberación del factor de crecimiento transformante 1 β (TGF-1 β) (Butovsky et al., 2014), el cual se encuentra incrementado en pacientes de ELA y que se sabe que acelera la progresión de la enfermedad en el modelo murino SOD1 (G93A) (Endo et al., 2014). Otro ejemplo sería la citoquina ligando con motivo C-C tipo 2 (CCL2), cuyo receptor CCR2 está presente en la microglía (Zhang et al., 2007), al provocar un aumento del estado inflamatorio de la microglía (He et al., 2016). No obstante, también está descrito que una microglía activa puede marcar un fenotipo tóxico en los astrocitos (Liddelow et al., 2017).

MICROGLÍA

Son las células inmunitarias residentes del SNC. Sus propiedades inmunológicas abarcan desde el potencial neuroprotector, al neurotóxico. En este sentido se han referenciado dos estados microgliales a forma simplificada. El estado neuroprotector, también llamado M2, la microglía libera factores de protección neuronal como la interleuquina 4 (IL-4) o la interleuquina 10 (IL-10) y expresa moléculas como la arginasa 1 (Arg1). En cambio, el neurotóxico o M1, que se puede dar por estimulación con el agente lipopolisacárido (LPS) o por procesos patogénicos, se liberan otros factores proinflamatorios como la IL-6 o el TNF- α (Orihuela et al., 2016). Estos estados pueden verse en la **Figura 11**.

Dentro de la ELA, la mayoría de los estudios realizados se centran en el uso de modelos con la proteína SOD1 mutada. De todos ellos, surge la idea de que en los inicios de la enfermedad, la microglía tiene un rol más neuroprotector, pero con el avance y la aparición de eventos como el estrés oxidativo, la microglía adoptaría un rol tipo M1 proinflamatorio que perjudicaría aún más la evolución de la enfermedad (Henkel et al., 2009) al provocar la

consecuente muerte neuronal (Frakes et al., 2014). No obstante, en otro estudio que bloquea parcialmente este estado M1 no detiene la evolución de la enfermedad en el ratón SOD1 (G93A) (Tada et al., 2014).

Por otro lado, Yiangou y colaboradores, detectaron una mayor presencia microglial en la médula espinal de pacientes con ELA y un aumento de los receptores CB₂ y P2X7 en estas células (Yiangou et al, 2006). El recetor P2X7 es un modulador de la activación microglial que depende del adenosín trifosfato (ATP) que liberan las neuronas en condiciones determinadas (Amadio et al., 2011). El bloqueo de este receptor en el modelo de ratón SOD1 (G93A) demostró ser efectivo para retrasar el inicio de la enfermedad, pero no llegó a mejorar la supervivencia de los animales (Apolloni et al., 2014). El mismo grupo de investigación obtuvo nuevos datos al usar agonistas para este receptor y obtener un aumento de la vía autofágica en la microglía, hecho que favorece el estado M2, lo que abre la vía de un comportamiento dual de p2X7 (Fabrizio et al., 2017).

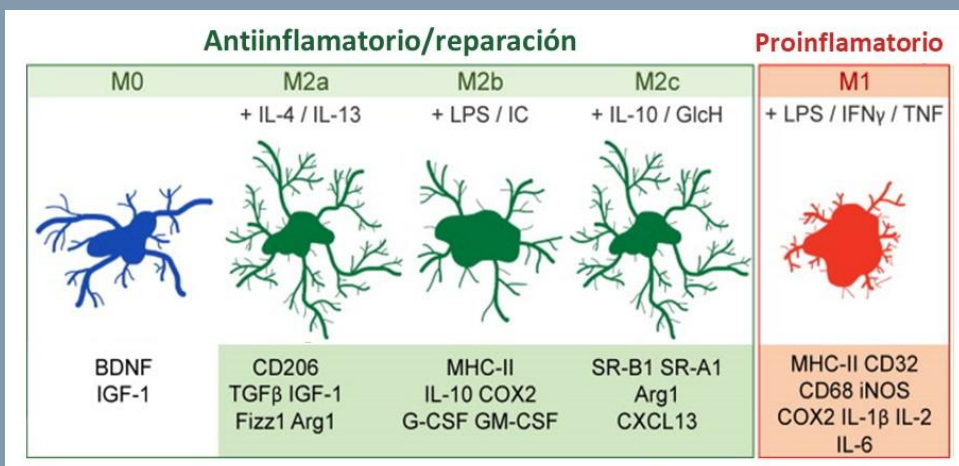


Figura 11: Esquema con los diversos estados de activación microglial descritos, así como las moléculas que los inducen y que los caracterizan. Por un lado, el estado M1 o clásico y por el otro, el M2 o alternativo. El estado M2 ha sido subdividido según las características morfológicas. El estado M0 se incluye dentro del M2 como un estado “en reposo”. Arg1, arginasa 1; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; COX2, ciclooxigenasa tipo 2; CXCL13, citoquina ligando con motivo C-X-C 13; Fizz1, proteína secretada riza en glicina encontrada en zona inflamada; G-CSF, factor de estimulación colonial de granulocitos ; GlcH, hormonas glucocorticoides; GM-CSF, factor de estimulación colonial de granulocitos-macrófagos; IC, complejo inmunitario; IFN γ , interferón gamma; IGF-1, factor de crecimiento de insulina tipo 1; IL, interleuquina; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; LPS, lipopolisacárido; MHC-II, complejo mayor de histocompatibilidad tipo II; SR-A1, receptor “scavenger” tipo A1; SR-B1, receptor “scavenger” tipo B1; TGF β , factor de crecimiento transformante beta; TNF, factor necrosis tumoral. Modificado de: Franco et al., 2015.

Introducción

Ya desde principios de los 90 se conocía el papel de proteínas del complemento como C4d y C3d en procesos patológicos inflamatorios en enfermedades como el Alzheimer (McGeer et al., 1991). Esto implica que hay una modulación inmune en los procesos inflamatorios. Esta modulación también afecta a la ELA, ya que en diversos tejidos de personas afectadas por la ELA, como el área ventral de la médula o en la propia corteza motora, se hallaron infiltrados de linfocitos (Kawamata et al., 1992). También se ha detectado una alteración de monocitos periféricos que invaden el SN (Zondler et al., 2016). Recientemente en un metaanálisis realizado sobre la presencia en sangre de citoquinas inflamatorias en pacientes con ELA frente a controles se constata un mayor incremento del factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6) y 8 (IL-8), además del factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF) (Hu et al., 2017). Adicionalmente, se ha podido detectar en pacientes de ELA esporádica un elevado nivel de monocitos en sangre (Zhang et al., 2005). Estudios con esas células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs, del inglés. Peripheral blood mononuclear cells) han demostrado un aumento en la expresión de genes asociados a la vía LPS/TLR4 (la endotoxina lipopolisacárido activa los receptores tipo *toll* 4) (Zhang et al., 2011), una vía proinflamatoria (Takeda et al., 2003). El mismo patrón se tuvo cuando PBMCs de casos controles fueron expuestos a LPS (Zhang et al., 2011).

Una prueba de una mayor actividad glial viene dada por mediciones vía tomografía por emisión de positrones (PET) cuando se usa un radioligando específico para células gliales. Las áreas de mayor detección coinciden con las zonas más afectadas de los pacientes con ELA (Alshikho et al., 2016). Acorde a esta idea, en muestras de médula espinal

de afectados por la ELA se obtuvo un aumento en la señalización de STAT3 (del inglés signal transducer and activator of transcription-3), un factor de transcripción proinflamatorio, detectado en células de microglía (Shibata et al., 2009) independientemente del fenotipo del caso. De manera adicional se han encontrado niveles elevados de GFAP en muestras de líquido cerebroespinal de pacientes que denotan una mayor activación astrocitaria (Benninger et al., 2017).

Los efectos de la inflamación en pacientes de ELA también son patentes en otras regiones además de la médula espinal. Cerebros de pacientes han manifestado una elevada activación astrogliar en diversas localizaciones de la sustancia blanca (Kushner et al., 1991). Además, a partir de muestras post-mortem de corteza motora de casos esporádicos se evaluó la expresión de genes inflamatorios y sus vías de acción obteniendo un claro aumento de estos (Morello et al., 2017). El mismo grupo de investigación había realizado previamente un estudio sobre las vías de señalización que se ven alteradas en la ELA (metabolismo, transporte axonal, etc) también utilizando muestras de corteza. El estudio de los diferentes genes alterados les permitió realizar una división en dos subgrupos de su población de estudio. Muchos de esos genes también se encuentran alterados en casos de ELA familiar (Aronica et al., 2015).

Una importante característica que se observa como consecuencia de mutaciones en la proteína SOD1, es una activación en la médula espinal de astrocitos y de microglía, la cual se acentúa a lo largo del progreso de la enfermedad (Hall et al., 1995). También se produce una alteración de macrófagos y microglía en ratones KO para

C9ORF72 sugiriendo la idea de su implicación en mecanismos inflamatorios (O'Rourke et al., 2016). Respecto a la proteína TDP-43, el uso del inductor de inflamación LPS en cultivos primarios de astrocitos y de microglía de ratones transgénicos TDP43 (A315T) supuso un aumento en la mislocalización y agregación de la propia proteína. Además el tratamiento de estos ratones con LPS propició un empeoramiento en el fenotipo (Correia et al., 2015).

Llegados a este punto, queda claro la especial relevancia de la población glial dentro de la patogénesis de la ELA. Tanto es así, que durante los últimos años se ha estado haciendo referencia a la terminología “non-cell autonomous” para recalcar la importancia de la astrocitos y microglía en los mecanismos tóxicos de la enfermedad (Lee et al., 2016). Así quedaría de manifiesto, que a pesar de que sean las motoneuronas las que se mueren, es la glía quien podría abarcar el principal rol patogénico en la ELA.

1.5.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se origina como fruto de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad celular para mitigar ese efecto (Sies, 2015). Cuando ese desequilibrio se produce (de una manera aguda como ocurre en casos de isquemia, o de forma crónica que es lo que sucede en las enfermedades neurodegenerativas), tanto proteínas, como los lípidos de la membrana celular, e incluso el propio ADN, todos estos componentes son dañados llevando a la muerte celular.

Como ejemplo que explica el aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), se encuentra la actividad natural de la proteína SOD1. Su

capacidad enzimática elimina las especies reactivas de oxígeno (como pueden ser los iones superóxido) para formar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno (Ischiropoulos et al., 2003). Que SOD1 posea mutaciones puede implicar que la unión con el cobre se debilite y que la capacidad tamponadora se vea afectada (Carri et al., 1994). Como consecuencia, se produce un aumento de iones superóxido que pueden reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitritos (ONOO⁻). Esta molécula es la especie más reactiva afectando a la integridad del ADN. Además, es una modificadora de proteínas estructurales como la actina (Beckman et al., 1996). En diversos modelos de ELA también se han encontrado un aumento de proteínas oxidadas (Andrus et al., 1998) y nitrosiladas (Ferrante et al., 1998). Además de un aumento de peroxidación de lípidos (Liu et al., 1998). Todos estos eventos patogénicos provocan la muerte neuronal característica de la ELA.

Tras la identificación de SOD1 como responsable en casos de ELA familiar, se comprobó que pacientes con mutaciones en SOD1 poseían una disminuida capacidad de fosforilación oxidativa en diversos tejidos lo que implica una disfunción mitocondrial (Browne et al., 1998). Este efecto se vio en el ratón transgénico SOD1 (G93A) al comprobar una severa deficiencia en la función mitocondrial y una mayor oxidación de las proteínas de este orgánulo (Mattiuzzi et al., 2002). Además, el incremento de estrés oxidativo puede provenir de la población glial. Astrocitos con la mutación G93A en SOD1 poseen proteínas nitrosiladas y una mayor proporción de radicales superóxido en sus mitocondrias, las cuales presentaron fallos en la respiración celular, así como en el consumo de oxígeno o en el potencial de membrana (Cassina et al., 2008). De forma adicional, sea por mutaciones en SOD1 o en

Introducción

TDP43, se ha comprobado que los astrocitos provocan la muerte de motoneuronas a través de medios condicionados provocando estrés nitrooxidativo por medio de los canales de sodio sensibles al voltaje (Rojas et al., 2014). Sabiendo que el uso de inhibidores de la óxido nítrico sintasa y antioxidantes en los medios de esos astrocitos, pueden prevenir la muerte neuronal (Cassina et al., 2008).

1.5.5 Disfunción mitocondrial

Es conocido el papel esencial de la mitocondria en el metabolismo y la supervivencia celular. Concretamente está implicada en la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, además de tener otros roles en la biogénesis de fosfolípidos o en la homeostasis de calcio. Todas ellas son funciones que si alteran acaban siendo efectos patogénicos de la ELA (Smith et al., 2017).

Recientemente se ha descrito la presencia de TDP43 dentro de las mitocondrias con un papel similar al descrito en el citoplasma, es decir, de regulación y estabilización de los tránsitos formados, solo que en este caso proceden del ADN mitocondrial. Como apoyo a esta idea, está el trabajo de Izumikawa y colaboradores, el cual demuestra que una disminución de TDP43 tenía como consecuencia una disminución en la función mitocondrial (Izumikawa et al., 2017).

Además, usando diferentes modelos animales se han encontrado defectos en la morfología de la mitocondria y en su transporte neuronal. El tiempo de aparición de esos fallos depende de la proteína mutada. Por un lado, con SOD1 mutada

esos signos aparecieron antes de que se produjera el desarrollo de la enfermedad en el ratón transgénico SOD1 (G93A), a diferencia del ratón transgénico TDP43 (A315T) cuyos defectos mitocondriales aparecieron en pleno desarrollo de la patología. Este hecho refuerza la idea de la implicación de diferentes mecanismos regulatorios según la proteína mutada (Magrené et al., 2014).

1.5.6 Alteración del transporte axonal

Se ha observado en diversas patologías como el transporte axonal y el tráfico vesicular juegan un papel importante en el desarrollo patogénico. Son muchas las proteínas implicadas en el mecanismo de transporte axonal y en el tráfico vesicular. Habiendo descritas múltiples patologías debidas a un fallo en esos mecanismos, donde también se incluyen diversos desórdenes motores (James et al., 2006). En el modelo murino SOD1 (G93A) se comprobó una disminución de neurofilamentos en la zona lumbar (Zhang et al., 1997). Incluso antes del inicio sintomatológico de la enfermedad ya se tenía una disminución del transporte axonal (Williamson et al., 1999).

1.6 Tratamientos

La falta de un tratamiento eficaz para la ELA ha llevado el desarrollo de múltiples compuestos como futuros fármacos. La mayoría de ensayos realizados han sido realizados con compuestos para tratar un determinado evento patológico, ya sea para disminuir la presencia de glutamato, disminuir la inflamación, reducir el estrés oxidativo, es decir, se centran en una única diana (Petrov et al., 2017). Ver **Tabla 2** para más información.

Compuesto	Administración	Fase(s)	Resultado	Financiación	Referencia
Antiglutamatérgicos					
Ceftriaxona	i.v.	1–2; 3	Fallido	Académica	Berry et al., 2013
Memantina	Oral	2–3	Fallido	Académica	De Carvalho et al., 2010
Riluzol	Oral	3	Mixto	Mixto	Bensimon et al., 1994
Talampanel	Oral	2	Fallido	Industria	Pascuzzi et al., 2010
Antiinflamatorios					
Celecoxib	Oral	2–3	Fallido	Industria	Cudkowicz et al., 2006
Eritropoyetina	i.v.	2; 3	Fallido	Académica	Lauria et al., 2009
Acetato glatiramérico	s.c.	2; 2–3	Fallido	Industria	Gordon et al., 2006
Minociclina	Oral	1–2; 3	Fallido	Académica	Gordon et al., 2004
NP001	i.v. infusión	1; 2	Fallido	Industria	Miller et al., 2014
Pioglitazona	Oral	2	Fallido	Industria	Dupuis et al., 2012
Ácido valproico	Oral	3	Fallido	Académica	Piepers et al., 2009
Antioxidantes					
Coenzima Q10	Oral	2	Fallido	Académica	Ferrante et al., 2005
Creatina	Oral	2; 2–3; 3	Fallido	Académica	Rosenfeld, 2008
Edaravona	i.v. infusión	2; 3	Mixto	Industria	Abe et al., 2017
Neuroprotectivos					
Dexpramipexola	Oral	2; 3	Fallido	Industria	Cudkowicz et al., 2011
Olesoxima	Oral	2–3	Fallido	Mixto	Lenglet et al., 2014
TCH346	Oral	2–3	Fallido	Industria	Miller et al., 2007a
Xaliprodeno	Oral	2; 3	Fallido	Industria	Lacomblez et al., 2004
Factores neurotróficos					
BDNF	i.v.	1–2; 3	Fallido	Mixto	Bradley, 1995
CNTF	s.c.	1; 1–2; 2–3; 3	Fallido	Mixto	Miller et al., 1993
IGF-1	s.c.	3	Fallido	Mixto	Lai et al., 1997
Inhibición CSF1R					
Masitinib	Oral	2–3	Positivo	Industria	
Otros					
Litio	Oral	2; 2–3; 3	Fallido	Mixto	Fornai et al., 2008
Tirasemtiv	Oral	2	Fallido	Industria	Shefner et al., 2012

Tabla 2: Diferentes tratamientos llevados a la clínica en función de su especificidad, administración, fase de ensayo alcanzado, resultado y financiación con la que se ha realizado. CSF1R, receptor del factor 1 de estímulo de colonial; i.v., intravenosa; s.c., subcutánea. Tabla modificada de: Petrov et al., 2017

Introducción

Aparte, la farmacología usada está más enfocada al tratamiento de los síntomas que al hecho de obtener una neuroprotección que pueda disminuir la progresión de la enfermedad. Tal vez ante la diversa heterogeneidad de eventos tóxicos dentro de la patología, los compuestos usados para ensayos clínicos no han alcanzado una eficacia deseada. Ver **Tabla 2**. De entre todos, únicamente varios de ellos han tenido cierto éxito. El riluzol, que hasta hace poco era el único fármaco aprobado para su uso en la ELA, y dos nuevos compuestos prometedores: la edaravona y el masitinib.

- Riluzol

Aprobado en los años 90, únicamente se había dispuesto del riluzol como fármaco para tratar la ELA (Wokke, 1996). Este fármaco bloquea los canales de sodio sensibles a tetradotoxina (TTX) consiguiendo reducir el flujo de iones calcio y previniendo la estimulación de receptores de glutamato (Song et al., 1997), es decir su foco de acción es disminuir la excitotoxicidad por glutamato. No obstante, los resultados reflejan una baja eficacia ya que sólo permite retrasar la defunción del paciente en unos meses (Miller et al., 2007b).

Que este fármaco estuviera aprobado para el tratamiento de la ELA desde hace más de 20 años ha llevado a que se probara también en otras patologías. Por ejemplo, como agente antiglutamatérgico posee un perfil adecuado para ser usado en determinados tipos de cáncer: como el osteosarcoma (Liao et al., 2017), de hígado (Seol et al., 2016), de pecho (Speyer et al., 2016) o para glaucoma (Pirhan et al., 2016). También ha sido probado como antidepresivo (Matthew et al., 2017) o para la depresión bipolar (Park et al., 2017), para el síndrome de Tourette (Lemmon et al., 2015) y en otras enfermedades

neurodegenerativas como como la ataxia espinocerebelosa tipo III (Schmidt et al., 2016). En todos los casos, el riluzol ha obtenido un nulo resultado.

- Edaravona

Ha sido en el año 2017 cuando la Agencia de alimentación y medicamentos americana (FDA, de sus siglas en inglés) ha aprobado el uso del compuesto edaravona como tratamiento para la ELA (Rothstein, 2017). Nombrado comercialmente como Radicava[®], el fármaco parece mostrar una mejora del paciente especialmente en aquellos que tuvieron un diagnóstico temprano (Abe et al., 2017). Anteriormente, este compuesto había demostrado su eficacia en combatir el estrés oxidativo que se generaba en un proceso isquémico mediante la eliminación de la peroxidación de lípidos y de radicales hidroxilo (Watanabe et al., 1994).

Un hecho a tener en consideración, es que los estudios clínicos realizados con este compuesto han sido realizados en su totalidad en Japón. Esto podría derivar en que se tuvieran un menor efecto terapéutico en otras poblaciones debido a la amplia diferencia epidemiológicas (Marin et al., 2017).

- Masitinib[®]

Este fármaco es un inhibidor específico de un tipo determinado de tirosina quinasa presente en mastocitos, el CD117 o también llamado receptor del factor de células madre (SCF de sus siglas en inglés) (Dubreuil et al., 2009). En procesos inflamatorios este factor se encuentra incrementado (Reber et al., 2006). Por ello, Masitinib[®] bloqueando esta vía estaría enfocado a ser un potencial agente frente a la neuroinflamación. Además es conocido por sus propiedades anticancerígenas (Marech et al.,

2014). Este compuesto también es efectivo a la hora de disminuir el área de infarto en un modelo isquémico en rata confirmando su potencial efecto terapéutico (Kocic et al., 2015). Y en referencia a la ELA, Masitinib® ha sido capaz de mitigar la neuroinflamación y la activación glial en un modelo de rata transgénica SOD1 (G93A) prolongando la supervivencia de los animales en un 40% respecto a los animales sin tratar (Trias et al., 2016).

El último ensayo clínico realizado, finalizó a mediados del año 2017 (ensayo ID# NCT02588677). Tras una duración de 48 semanas con un total de 382 pacientes que ya recibían riluzol y que fueron divididos en dos grupos con diferentes dosis y un tercero con placebo. Los resultados finales no se han publicado aún, pero las primeras notas de prensa reflejan que la dosis de 4,5 mg/kg/día consiguió rebajar la caída en la escala funcional de los pacientes en diversas pruebas.

Durante toda esta parte de la introducción queda de manifiesto que dentro de la ELA pueden ocurrir múltiples eventos patológicos. Es posible que de todos ellos, dentro de patogénesis: la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, o la inflamación, sean los que toman una mayor relevancia. Además, hay múltiples proteínas las que pueden verse implicadas, estén o no mutadas. Y que son múltiples tipos celulares los que son partícipes de la patogénesis. Es decir, la ELA es una enfermedad en la que convergen en distintos niveles múltiples factores que llevan al desencadenamiento de la patología.

2. SISTEMA ENCOCANNABINOIDE

2.1 Cronología de su estudio

El sistema endocannabinoide (SEC) recibe este nombre debido a que son los componentes de la planta *Cannabis Sativa* los que interaccionan con él. Se denominan fitocannabinoides a esos mismos compuestos los cuales también se encuentran presentes en las distintas preparaciones recreacionales de la planta (marihuana, hachís, etc). En cambio, las moléculas que activan al SEC de forma endógena se las nombra endocannabinoides (ECBs). Existe un tercer tipo de compuestos que también interaccionan con el SEC, concretamente aquellos que son sintetizados en el laboratorio y que tienen un origen sintético. Son moléculas que no existen en la naturaleza, pero poseen actividad cannabinoide como tal. Como veremos, este tipo de cannabinoides han resultado de gran utilidad para el estudio del SEC debido a su potencia y/o selectividad.

Desde la antigüedad, la planta *Cannabis Sativa* ha sido usada para fines lúdicos, religiosos, y no menos importante, ha sido utilizada con un fin medicinal. Los primeros vestigios de su uso vienen desde el este asiático, donde se han encontrado diversos restos de la planta en antiguos emplazamientos antropológicos con más de dos mil años de antigüedad. Se tiene constancia de regiones de Nepal (Alt et al., 2003), Siberia (Rudenko, 1970) o el territorio que actualmente es China (Russo et al., 2008). Gracias a estos hallazgos se sabe que dependiendo de la parte de la planta, se le daba un uso u otro. Así, a partir de las raíces se realizaban fibras para vestimentas (Mallory et al., 2000), mientras que las semillas se usaban como alimento. En cambio, las flores se reservaban para darles un uso medicinal (Clarcke, 2007). No es baladí que haya una selección de partes de la planta según el fin, ya que la mayor concentración de cannabinoides se encuentra en las flores y hojas (Pacífico et al., 2008), y en menor medida en el polen (Ross et al., 2005).

Introducción

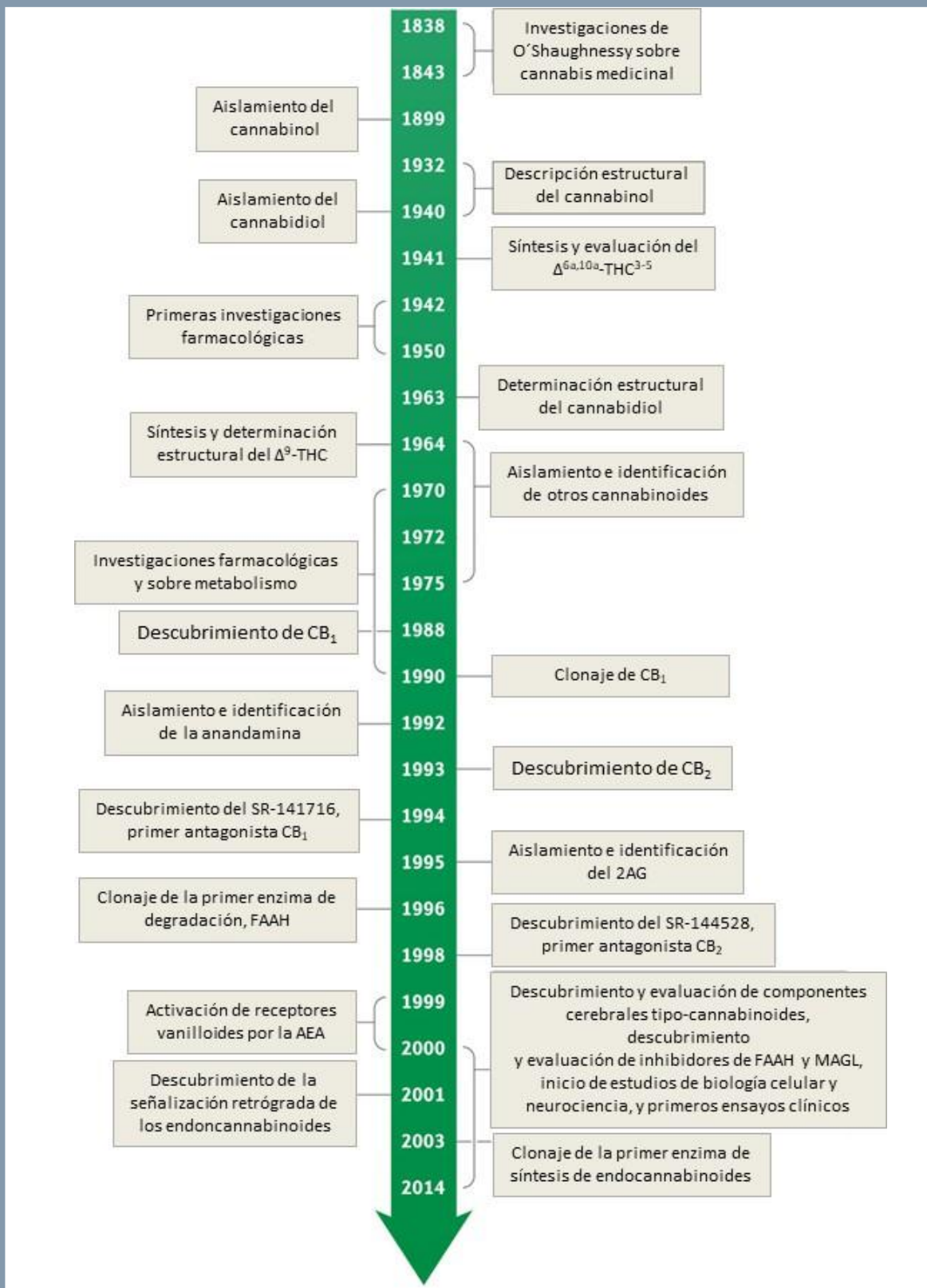


Figura 12: Diagrama temporal que recoge los principales hitos en la investigación sobre la *Cannabis Sativa*, los cannabinoides y el SEC. Modificado de: Mechoulam et al., 2014.

Como se puede ver en la **Figura 12**, habría que dar un salto en la historia hasta los inicios de la medicina moderna para tener las primeras observaciones médicas utilizando la planta *Cannabis Sativa*. Fue William Brooke O'Shaughnessy, médico afincado en Calcuta donde vio efectos positivos para el tratamiento de los espasmos producidos por el tétanos al usar aceites extraídos de la planta. También llegó a investigar otros usos, como aplacar los dolores menstruales o resolver problemas de sueño (Clendenning, 1843). No obstante, debido al impedimento y obstaculización que se impuso desde la sociedad americana (principalmente por la asociación a un uso recreacional), la investigación sobre cannabinoides vivió una época de estancamiento que duraría décadas (Ligresti et al., 2016).

El inicio del cambio, llegó en los años sesenta con el aislamiento y caracterización de los dos principales cannabinoides de la planta. El primero de ellos fue el compuesto no psicotrópico, el cannabidiol (CBD) (Mechoulam et al., 1963), siendo después el turno del mayor componente psicoactivo presente en la planta, el 9-delta-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni et al., 1964). Durante los años 70, el estudio sobre cannabinoides se fue ampliando gracias la mejora de técnicas que permitió mejores purificaciones y aislamientos de compuestos (Mechoulam et al., 1976). Las primeras observaciones sobre los cannabinoides sobre interacciones lipofílicas (Lawrence et al., 1975), condujo al pensamiento de que estas moléculas también podrían interaccionar con nuestros propios lípidos, lo que provocó un mayor estudio de los cannabinoides en nuestro metabolismo encaminado al descubrimiento de posibles dianas farmacológicas (Dewey, 1986).

De esta forma, no tardaría en llegar el descubrimiento del primer receptor

cannabinoides. Identificado en el cerebro de la rata, se le denominó receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁) (Devane et al., 1988), con su posterior elucidación estructural y expresión funcional (Matsuda et al., 1990). El hecho de encontrar este nuevo receptor despertó el interés por la identificación de posibles ligandos endógenos. Fue cuando se identificó a la molécula araquidonoiletanolamida, más conocido por anandamida (AEA), como el primer endocannabinoides capaz de interaccionar con el receptor CB₁ (Devane et al., 1992). El denominado con posterioridad SEC, fue creciendo con el descubrimiento de un segundo receptor, llamado receptor cannabinoide tipo 2 (CB₂) (Munro et al., 1993) y la identificación de un segundo ligando endógeno a partir de intestino del perro, el 2-araquidonoilglicerol (2AG). Además, en esta época se consiguió una valiosa herramienta para el estudio farmacológico del SEC, se sintetizó el primer antagonista para el receptor CB₁, el compuesto SR141716A, más conocido como Rimonabant (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Más tarde llegaría la identificación de la primera enzima de degradación de endocannabinoides, la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos FAAH (Cravatt et al., 1996). En los siguientes años, los estudios sobre el SEC se expandieron no sólo identificando más elementos del sistema, como podría ser la diacilglicerol lipasa (DAGL) una enzima implicada en la síntesis del 2AG (Bisogno et al., 2003), sino que se empezaron a centrar en un mayor entendimiento del SEC. En estos últimos 20 años ha habido un crecimiento exponencial en la investigación del funcionamiento del SEC, abarcando estudios sobre su caracterización tisular y celular, así como su exploración funcional como regulador de otros sistemas de neurotransmisores y más allá, tomándolo como potencial diana terapéutica en patologías de diversos orígenes (Katona et al., 2012).

2.2 Receptores de cannabinoides

Introducidos previamente, los receptores CB₁ y CB₂ son los elementos clásicos dentro del SE. Ambos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Felce, et al., 2017) presentando un 44% de homología entre ellos. Porcentaje que aumenta al 68% en las zonas intramembranales (Montero et al., 2005). Estos receptores se encuentran en muchos de los vertebrados presuponiendo un antecesor común y alto grado de conservación durante la evolución (Elphick, 2012). Los insectos son un caso particular al carecer estos receptores presumiblemente por la escasa producción de ligandos endógenos (McPartland et al., 2001). Los receptores CB₁ y CB₂ son considerados los receptores clásicos del SEC, pero en los últimos años se ha postulado que otros receptores no canónicos se relacionan con ciertos elementos del SEC. La mayoría también son GPCRs, y aunque su nivel de homología es muy menor, los receptores huérfanos GPR18, GPR55 y en menor medida GPR119, pueden ser activados por ECs (Irving et al., 2017). Aparte de estos receptores metabotrópicos, los ECs pueden interactuar con canales dependientes de voltaje, canales iónicos o incluso receptores de otros sistemas neurológicos como el receptor vanilloide de tipo 1 (TRPV1) (De Petrocellis et al., 2017).

2.2.1 Receptor CB₁

En el año 1988 se identificó en el cerebro de la rata el que sería el primer receptor cannabinoide, CB₁ (Devane et al., 1988). Rápidamente fue clonado en esa especie (Matsuda et al., 1990), y a continuación en la especie humana localizado en el cromosoma 6 con un total de 472 aminoácidos (Gerad et al., 1991). No obstante, ha sido recientemente cuando se ha obtenido la

estructura cristalina del receptor CB₁ humano (Hua et al., 2016). Dentro de su estructura, tiene relevancia el segundo *loop* intracelular del receptor para la interacción con la proteína G (Chen et al., 2010). Además, su modulación también puede darse mediante ligandos alostéricos (Khurana et al., 2017). Actualmente está aceptado que el receptor CB₁ se encuentra en múltiples partes del cuerpo, siendo el cerebro especialmente rico en este receptor (Herkenham et al., 1991). El hecho de encontrarse en regiones como el hipocampo o los ganglios basales, ha llevado a que se le relacionase con procesos de aprendizaje y memoria (Lutz, 2007) o a que tuviese una relevante implicación en desórdenes motores (Fernández-Ruiz, 2009).

En cualquier caso, fue en neuronas del cerebelo donde se le identificó como el responsable de la atenuación sináptica en células de Purkinje, al provocar una reducción del calcio intracelular debida a una despolarización de la neurona (Kreitzer et al., 2001). Mientras que fue en el hipocampo, donde se vio que la activación de CB₁ era dada mediante una activación de receptores metabotrópicos de glutamato de la neurona postsináptica (Varma et al., 2001). Es decir, los receptores CB₁ localizados en los terminales presinápticos son capaces de modular la transmisión sináptica al reducir la liberación vesicular de otros neurotransmisores. Un ejemplo es su papel en los ganglios basales regulando las transmisiones GABAérgicas y dopaminérgicas (Mátyás et al., 2006). Además de las neuronas, también ha sido identificado en los astrocitos (Bosier et al., 2013). El receptor CB₁ al estar acoplado a proteína Gi/o realiza la mediación de la señalización celular mayoritariamente a través de la inhibición de la adenilil ciclasa. Para más información sobre la señalización mediada por el receptor CB₁ ver la **CAJA 4**.

CAJA 4: Señalización intracelular de los receptores CB₁ y CB₂.

Los receptores CB₁ y CB₂ forman parte de la familia de receptores 7 segmentos transmembrana acoplados a proteínas G. Sus extremos C-terminales son los que se asocian intracelularmente con la proteína G (Howlett, 2005). Ésta suele ser de tipo Gi para los dos receptores, lo que conlleva que con su activación, la subunidad α produzca la inhibición de la enzima adenil ciclasa (AC) y se reduzcan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Esa reducción de AMPc disminuye la activación de la enzima fosfokinasa A (PKA), la cual es una reguladora de la expresión génica a través de la actividad de elementos de respuesta por AMPc (CRE) (Felfer et al., 1995; Slipetz et al., 1995). Por otro lado, las subunidades βγ promueven la activación de la cascada enzimática de las proteínas kinasas mitogénicas activadas (MAPKs) y la regulación de factores de transcripción relacionados con la supervivencia o muerte celular. Ver **FIGURA 13**.

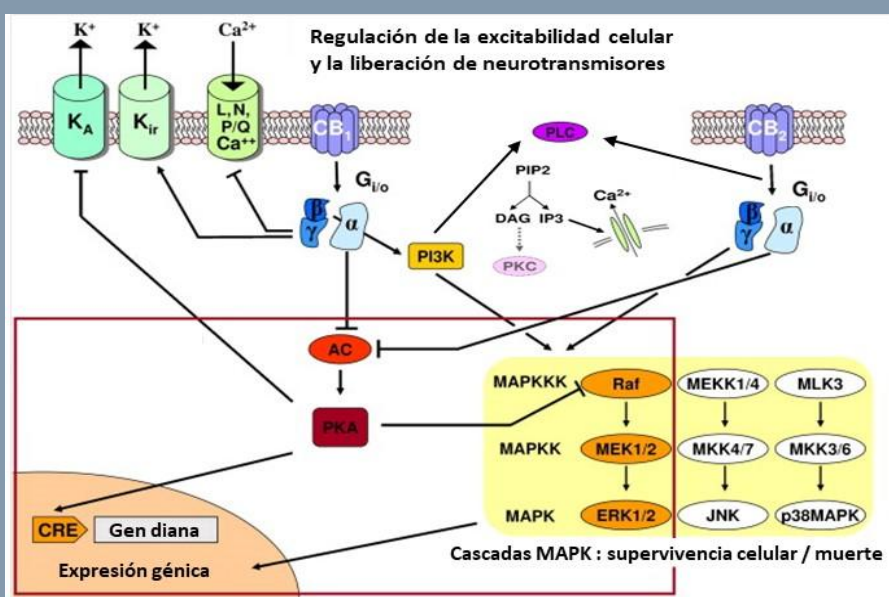


Figura 13: Principales rutas de señalización de los receptores CB₁ y CB₂. Modificado de: Bosier et al., 2010.

Aparte, al poder estar también acoplados a una proteína Go, pueden incrementar la concentración de calcio intracelular a través del RE mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC) en la ruta de inositol trifosfato (IP3). Al principio se pensaba que esta vía era exclusiva del receptor CB₁, pero también ha sido descrita para CB₂ (Zoratti et al., 2003).

No obstante, la inhibición de canales de calcio tipo N y P/Q y la activación del canal de potasio que permite la salida de iones K⁺, parecen acciones exclusivas del receptor CB₁. Estos mecanismos son los que mantienen una despolarización de la membrana celular modulando la liberación de neurotransmisores. De forma particular, también se ha asociado al receptor CB₁ con vías de señalización a través de proteínas Gs (Glass et al., 1997; Bash et al., 2003) y Gq (Lauckner et al., 2005).

No obstante, la inhibición de canales de calcio tipo N

Más allá de su implicación con el sistema nervioso central, ha sido descrita la presencia del receptor CB₁ en otras zonas del cuerpo. Diversas revisiones ubican a este receptor en: el hígado y tejido adiposo (Howlett et al., 2010), el corazón (Hiley, 2009), los huesos (Idris, 2008) o la piel (Bíró et al., 2009). En todos los casos se apunta su modulación desde un punto de vista patológico, en el que el receptor CB₁ se posiciona como una diana terapéutica como posible tratamiento. Un

ejemplo destacado sería el tratamiento del dolor a través del receptor CB₁ (Talwar et al., 2011).

Recientemente se ha descrito también la presencia del receptor CB₁ en las mitocondrias de las neuronas. Se le atribuye el papel de modular la respiración mitocondrial y el consumo energético mediante la disminución de AMP cíclico y la actividad del complejo enzimático I cuando es activado por ECs exógenos o de la propia neurona

Introducción

(Bénard et al., 2012). De hecho, se atribuye al receptor CB₁ mitocondrial de neuronas hipocámpales los déficits de memoria en casos de una activación aguda. Dicha activación, disminuiría los niveles de la enzima adenil ciclasa y la consecuente inhibición de la enzima PKA, cuya activación se relaciona directamente con un correcto transporte electrónico. Al haber una menor respiración celular, el metabolismo energético afectaría a la transmisión sináptica y con ello la constitución de la memoria (Hebert-Chatelain et al., 2016).

Otro dato a considerar, es la posibilidad de que la existencia de diversos polimorfismos en la expresión de CB₁ pueda tener algún tipo de implicación en diversas patologías. Este hecho ha sido relacionado principalmente con la posibilidad de tener una mayor predisposición a padecer cierto tipo de adicciones (drogas o alcohol), o trastornos mentales como la esquizofrenia (Norrod et al., 2007) o la depresión (Domschke et al., 2008).

2.2.2 Receptor CB₂

El que fuera llamado receptor cannabinoide tipo 2, fue localizado inicialmente en tejidos periféricos como el bazo y en elementos del sistema inmune como los macrófagos (Munro et al., 1993). En estudios posteriores, también se identificó al receptor CB₂ en células de microglía ubicadas en el cerebelo (Nuñez et al., 2004). Al receptor CB₂ se le presumía el título de receptor cannabinoide periférico. No obstante y aunque aún hoy haya controversia, cada vez hay más estudios que evidencian la presencia de receptor CB₂ dentro del sistema nervioso central (Van Sickle et al., 2005; Onaivi et al., 2006) y más concretamente en diversas áreas cerebrales (Gong et al., 2006). En un principio se le identificó en células de microglía con un papel regulador de la inflamación (Klegeris et al., 2003). Pero posteriormente, el receptor CB₂ fue localizado postsinápticamente en neuronas de la sustancia nigra y del hipocampo (Brusco et al., 2008). Estudios más recientes le asignan un papel

en la plasticidad neuronal con su localización en las neuronas piramidales del hipocampo (Stempel et al., 2016). Antwood y Mackie, en una revisión sobre la controversia existente sobre la presencia del receptor CB₂ en el SNC, plantean la posibilidad de que la detección del receptor CB₂ en condiciones no patológicas podría ser dificultosa (Antwood et al., 2010).

Este hecho podría ser así, ya que desde el comienzo de su descripción, el receptor CB₂ ha sido ligado a procesos neuroinflamatorios (Ashton et al., 2006). Con ello no es de extrañar que siempre se haya relacionado su presencia a procesos de activación glial. Se describieron células inmunitarias poseedoras de este receptor: macrófagos, células B, natural killers, linfocitos CD4⁺ y 8⁺ (Galiègue et al., 1995; Schatz et al., 1997; Carayon et al., 1998; McCoy et al., 1999). Y en el SNC, la expresión del receptor CB₂ está ligada a la microglía (Walter et al., 2003). Las cuales emulando a las células del sistema inmune, son activadas en determinadas circunstancias patológicas dentro del propio SNC (Hanisch et al., 2007) incluido la médula espinal (Zhang et al., 2003). Un hecho a tener en cuenta, es que la expresión de CB₂ en macrófagos y microglía viene determinada por la activación celular, ya que sólo una vez que fueron expuestos y activados por LPS, se pudo detectar la presencia del receptor (Carlisle et al., 2002). La modulación de procesos inflamatorios mediante el receptor CB₂ queda patente cuando modelos murinos que carecen de este receptor presentan una inflamación exacerbada (Turcotte et al., 2016).

En cualquier caso, desde que el receptor CB₂ fue clonado, se comprobó que no poseía la capacidad de unión al antagonista del receptor CB₁, SR141716 (Shire et al., 1996; Griffin et al., 2000). En cambio, sí es activado por el 2AG y con menor eficacia por la AEA (Gonsiorek, et al., 2000).

Experimentos con ratones knock-out para el receptor CB₂ y el uso de una farmacología diversa, también apuntan directamente al receptor CB₂ como modulador del dolor neuropático (Ibrahim

et al., 2006). Acorde a este hecho, los ratones transgénicos que no expresan el receptor CB₂ presentaron una marcada activación glial en el asta ventral de la médula espinal en un modelo de lesión de nervio ciático con hiperalgesia y alodinia incluido en la pata contralateral de la lesión. En cambio, usando otro ratón que sobreexpresaba el receptor CB₂ se encontraron los efectos opuestos (Racz et al., 2008). Aunque en la transmisión del dolor también tiene implicación el receptor CB₁, en los últimos años el desarrollo de nuevos agonistas específicos para el receptor CB₂ está haciendo que este receptor gana mayor relevancia al carecer de los efectos psicoactivos (Brownjohn et al., 2012; Han et al., 2013; Woodhams et al., 2015).

2.2.3 Otros receptores relacionados con el SEC

- GPR55

En 1998 se identificó un nuevo receptor acoplado a proteínas G altamente expresado en el cerebro (Sawzdargo et al., 1998). Este receptor presenta un grado bajo de homología con CB₁ y CB₂ (13.5% y 14.4% respectivamente) (Baker et al., 2006). Se ha sugerido que su principal ligando endógeno es el lisofosfatidilinositol (LPI) (Oka et al., 2007; Yamashita et al., 2013), pero su farmacología no queda muy clara actualmente. Por ejemplo en la actuación del Δ^9 -THC, Lauckner y colaboradores apuntan el fitocannabinoide sí puede activar a GPR55, pero sólo a bajas concentraciones (Lauckner et al., 2008). Mientras tanto, el CDB parece comportarse como un antagonista, ya que produce la misma inactivación en osteoclastos que ratones knock-out para el receptor GPR55 (Whyte et al., 2009). Por otro lado, el cannabinoide sintético WIN55-212, que activa los receptores CB₁ y CB₂, no tiene este efecto en el receptor GPR55 (Johns et al., 2007). Este receptor ha sido identificado tanto en la línea celular BV-2 como en microglía obtenida mediante cultivos primarios cuya estimulación produce efectos paralelos a la activación de CB₂ (Pietr et al., 2009). Por ello de la misma manera que al receptor CB₂, a GPR55 se le

confiere un rol en la modulación de la inflamación (Yang et al., 2016) y del sistema inmunitario (Zhou et al., 2016). Además otras investigaciones en los últimos años, han relacionado a GPR55 en funciones diversas como el procesamiento de la memoria (Kramar et al., 2017), la plasticidad sináptica (Hurst et al., 2017), la ansiedad (Shy et al., 2017), y no menos importante, su implicación en determinados tipos de cáncer (Falasca et al., 2016).

- GPR18

El clonaje del receptor huérfano acoplado a proteína G, GPR18 en base a la búsqueda de posibles dianas de citoquinas en una línea celular T, permitió describir a la N-araquidonilglicina (NAGLy) como su ligando (Kohno et al., 2006). No obstante, ya se había identificado su presencia en testículos y bazo veinte años antes (Gantz et al., 1997). A este receptor se le relaciona con el SEC debido a que tanto la AEA como el Δ^9 -THC se comportan como agonistas al menos *in vitro* (McHugh et al., 2010).

- TRPV1

El receptor de potencial transitorio tipo V1, conocido como TRPV1 o recetor vanilloide tipo 1, es un canal no selectivo de cationes codificado en el gen TRPV1. Este canal provoca preferiblemente la entrada de calcio a la célula cuando es activado por un ligando. El primer ligando que se describió fue la capsaicina, molécula que aporta el picante a diferentes guindillas y pimientos (Oh et al., 1996). Se identificó en neuronas DRG (del inglés “dorsal root ganglion”) y en neuronas sensoriales. La activación de este canal también se produce por un incremento de calor, que junto a la sensación de picor, tienen una relación directa en la transmisión del dolor (Caterina et al., 1997). Su implicación con el SEC, es debida a que es activado por fitocannabinoides como el Δ^9 -THC y el cannabinoide (CBN) (Zygmunt et al., 2002). O por endocannabinoides como la AEA (Zygmunt et al., 1999). Se le relaciona junto con el receptor CB₁ (Cristino et al., 2006) en mecanismos moleculares como la acción sobre la nNOS (óxido nítrico sintasa

Introducción

neuronal) (Carletti et al., et al 2017). Incluso hay bloqueadores de la FAAH, como la N-araquidonoil-serotonina (AA-5-HT) que también bloquea al receptor TRPV1 de manera conjunta. Este hecho implica que se produzca un incremento de endocannabinoides, los cuales al actuar vía receptor CB₁ producen un efecto ansiolítico. Este efecto fue que se revertió con el bloqueo de CB1 (Micale et al., 2009; Navarra et al., 2014).

- PPARs

Los PPARs (receptores activados por proliferadores peroxisomales) son un grupo de receptores nucleares cuya función principal es la regulación de la expresión de ciertos genes. Existen tres tipos: α , δ y γ . Estos receptores heteromerizan con el receptor X retinoico (RXR) en una correcta funcionalidad para controlar funciones como la homeostasis de glucosa, la degradación de ácidos grasos o la inflamación (Shearer et al., 2003). Su relación con una funcionalidad tan diversas es debida a que estos receptores se expresan en múltiples tipos celulares, como neuronas o células gliales o inmunitarias (Villapol, 2018). Se han descrito diversos cannabinoides que interactúan con PPAR γ (Burstein, 2005). Endocannabinoides como el 2AG (Rockwell et al., 2006), fitocannabinoides como el Δ^9 -THC (O'Sullivan et al., 2006) y cannabinoides sintéticos derivados del cannabigerol (CBG) son ejemplos diversos de activadores de este receptor (García et al., 2018).

2.3 Ligandos cannabinoides

2.3.1 Fitocannabinoides

Dentro de la Cannabis Sativa se encuentran en diferentes proporciones más de 100 compuestos cannábicos (Andre et al., 2016). En la **Tabla 3** se pueden ver los principales fitocannabinoides. De entre ellos, son el Δ^9 -THC y el CBD los que se hallan en mayor proporción (dependiendo de la variedad de la planta). Pero hay una gran cantidad de otros cannabinoides que han sido estudiados para

diversos fines. Sus respectivas formas carboxiladas, son los ácidos tetrahidrocannabinólico (THCA) y cannabidiólico (CBDA). El CBG o el CBN son otros compuestos que aunque se encuentren en menor concentración en la planta, también han tomado parte en diversas investigaciones con vistas a sus posibles usos terapéuticos debido a que poseen otros perfiles farmacológicos de interés (El-Alfy et al., 2010; Deiana et al., 2012; Aizpurua-Olaizola et al., 2014; ElSohly et al., 2017).

- Δ^9 -THC

Este cannabinoide es el mayor constituyente de la planta. Su perfil de agonista parcial del receptor CB₁ provoca sus efectos psicotrópicos al activar a este receptor presente en diferentes áreas del SNC. Aunque también puede activar parcialmente a los receptores CB₂, GPR55 y GPR18 entre otros (Pertwee, 2008; McHugh et al., 2014). Desde los años 80 ya se había descrito su capacidad como antiinflamatorio al disminuir la liberación de interferón (Blanchard et al., 1986). Esta capacidad antiinflamatoria la presenta incluso al usarse tópicamente en alergias cutáneas (Gaffal et al., 2013). Aunque hay estudios que muestran la edad como una variable, al menos respecto a la liberación de citoquinas (Moretti et al., 2014). Con los años se han ido sumando otros estudios que muestran otras posibles funcionalidades del Δ^9 -THC. Desde su acción como neuroprotector, siendo empleado en procesos neurodegenerativos como la EM en un modelo en encefalitis autoinmune (Lyman et al., 1989; Fujiwara et al., 2004) o para la ELA en el modelo murino con la proteína SOD1 mutada (Raman et al., 2004). Incluso se ha explorado su uso en otro tipo de patologías como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Williams et al., 2015) o como antitumoral (Sánchez et al., 1998). En cualquier caso, el posible riesgo a la dependencia y el desarrollo de tolerancia pueden limitar su potencial uso terapéutico (Costa, 2007).

Fitocannabinoides	Estructura	Farmacología
Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC)		Psicoactivo. Más abundante en plantas no fibrosas Agonista parcial CB ₁ ≈ CB ₂
Cannabidiol (CBD)		No psicoactivo. Más abundante en plantas fibrosas. Antagonista no específico de CB ₁ y CB ₂ Inhibidor de la captación de la AEA y su metabolismo
Cannabinol (CBN)		Agonista débil CB ₁ , agonista parcial CB ₂
Δ^9 -tetrahidrocannabivarina (THCV)		Δ^9 -THCV antagoniza Δ^9 -THC a bajas dosis (< 3 mg/kg) Agonista CB ₁ a dosis alta (10 mg/kg)
Cannabidivarina (CBDV)		Mecanismos de acción desconocidos
Ácido cannabidiólico (CBDA)		Inhibidor selectivo de COX2, TRPA1 Y agonista TRPV1
Cannabigerol (CBG)		Agonista TRPA1 y TRPV1 Agonista CB ₅ ; inhibidor captación AEA
Cannabicromeno (CBC)		Agonista TRPA1 Inhibidor captación AEA

Tabla 3: Estructuras moleculares de los principales fitocannabinoides con sus respectivos perfiles farmacológicos de la *Cannabis sativa*. Tabla modificada de: Pisanti et al., 2017.

Introducción

- CBD

El CBD en cambio, es el principal cannabinoide mayoritario de la planta *Cannabis sativa* que no produce efectos psicotrópicos. No en vano, se le considera un cannabinoide atípico al apenas mostrar interacción con los receptores CB₁ y CB₂. Las interacciones descritas con estos receptores muestran un perfil de antagonización cuando se presenta en concentración del rango nanomolar para el receptor CB₁ y de agonista inverso para el receptor CB₂ (Thomas et al., 2007). De la misma manera que parece antagonizar también al receptor GPR55 (Brown, 2005). Su falta de activación de los receptores clásicos del SEC, ha llevado a explorar otras vías de actuación para explicar sus diversas características que posee. De esta manera, se ha descrito que actúa como activador del canal TRPV1 (Bisogno et al., 2001) y del receptor nuclear PPAR γ (De Filippis et al., 2011). Incluso se ha descrito su capacidad de agonista de receptores que no se consideran parte del SEC, como son el receptor de serotonina 5HT_{1A} (Russo et al., 2005) y el receptor de adenosina A_{2A} (Mecha et al., 2013). Así, su amplio espectro de actuación abarca desde la modulación de elementos del sistema inmune (Lunn et al., 2006), la acción motora (Espejo-Porras et al., 2013), como agente antiisquémico (Ceprián et al., 2017) y para el tratamiento de desórdenes de alimentación, de ansiedad, depresión, y demás aspectos psicóticos (Zuardi et al., 2006; Pisanti et al., 2017).

- Otros fitocannabinoides

El resto de fitocannabinoides (los cuales se muestra una selección en la **Tabla 3**) al estar en menor proporción en la planta, han sido en general menos estudiados. No obstante, los últimos años sí han centrado cierto interés algunos de ellos debido a ciertas características que los distinguen de los fitocannabinoides clásicos, el Δ^9 -THC y el CBD. Uno de estos compuestos es la tetrahidrocannabivarina (THCV), al cual se le atribuyen capacidades antiinflamatorias al suprimir la liberación de nitritos por parte de macrófagos a través de sus interacciones con los

receptores CB₂ y de la activación de algunos receptores TRP (del inglés “transient receptor potential”) (Romano et al., 2016). También se le reconoce como activador del receptor GPR55 (Anavi-Goffer et al., 2012). Este compuesto ha proporcionado buenos resultados en el control glucémico de pacientes con diabetes tipo II (Jadoon et al., 2016). Además, es capaz de contrarrestar los efectos negativos del Δ^9 -THC (Englund et al., 2016), debido a su capacidad antagonizadora del receptor CB₁, postulándose también como un regulador del apetito (Rzepa et al., 2015; Silvestri et al., 2015). Más allá del SEC, el THCV puede también interactuar con el receptor de serotonina 5HT_{1A}, potenciando el efecto antipsicótico de este receptor (Cascio et al., 2015).

Otro claro caso de cannabinoide que está teniendo cada día más atención es el CBG. Parece ser un compuesto que estimula la ingesta (Brierley et al., 2016). Farmacológicamente, según estudios realizados *in vitro*, activa los canales TRPV1, TRPV2, TRPA1 y el α 2-adrenorreceptor, en cambio bloquea la recaptación de endocannabinoides y el receptor serotoninérgico 5HT_{1A} (Cascio et al., 2010). Ha sido postulado como un inhibidor carcinogénico debido a su capacidad de bloqueo del TRPM8 (Borrelli et al., 2014; Baek et al., 1998).

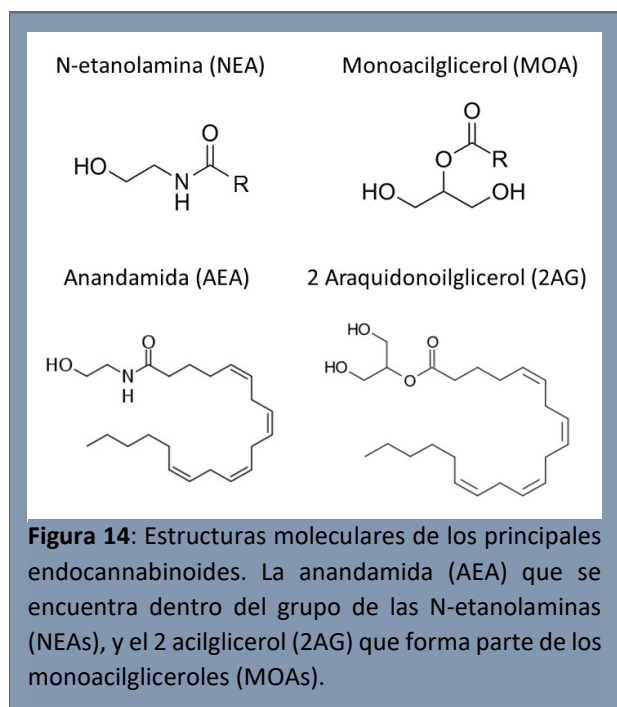
2.3.2 Endocannabinoides

Se hace referencia a los endocannabinoides a aquellos ligandos endógenos que son capaces de interactuar con los receptores cannabinoides. Son de naturaleza lipídica caracterizados por tener una cadena de ácidos grasos poliinsaturados. Los principales ECBs son descritos a continuación y son reflejados en la **Figura 14**.

- Anandamida

Dentro de las N-acil etanolaminas (NAEs), se encuentra la anandamida (AEA). Este fue el primer ECB que se describió cuando se obtuvo purificado del cerebro de cerdo (Devane et al., 1992). Dentro del SNC se encontró en regiones ricas de expresión del receptor CB₁, mayoritariamente en el hipocampo y en el estriado. En la periferia también se detectó en el bazo y también en niveles bajos

en órganos como el corazón o la piel (Felder et al., 1996). A lo largo de los años se ha podido investigar su farmacología. La AEA se comporta como un agonista parcial tanto del receptor CB₁ como de CB₂, pudiendo activar también al receptor GPR55 (Ryberg et al., 2007). La AEA también tiene la capacidad de activar el canal TRPV1 (Sousa-Valente et al., 2014), así como el receptor nuclear PPAR γ (Maccarrone, 2017).



- 2-araquidonoilglicerol

Este endocannabinoide con estructura de monoacilglicerol (MAGs), abreviado en 2AG, fue aislado en un principio en el intestino de perro (Mechoulam et al., 1995). Como en caso anterior, el 2AG se encuentra en zonas del SNC ricas en el receptor CB₁, pero en mayor cantidad. Además, zonas de la corteza cerebral y el cerebelo también son ricas en este ECB (Bisogno et al., 1999). En menor medida también se detectó pequeños niveles en el bazo, los pulmones y los riñones (Kondo et al., 1998). A diferencia de la AEA, el 2AG se comporta como un agonista directo de los receptores CB₁ y CB₂, presentando además cierta afinidad por los receptores GPR55 y TRPV1 (Rygmunt et al., 2013).

- Otros ECBs

Existen otras moléculas endógenas que se relacionan dentro del SEC bien por posicionarse como potenciales ligandos de los receptores cannábicos como pueden ser el 2-araquidonoilglicerol éter, la O-araquidonoil-etanolamina (“virodhamina”) o la N-araquidonoil-dopamina (NADA) (Pacher et al., 2006). Por otro lado, figuran otras moléculas que sin unirse a los receptores clásicos, sí pueden modular el efecto de los propios ECBs al compartir vías con las enzimas de síntesis o degradación. Un caso sería la palmitoiletanolamida (PEA) que es degradada por la ácido-N-aciletanolamina amidasa (NAAA) en etanolamida y ácido palmítico (Conti, et al., 2002).

2.3.3 Síntesis de ECBs

Existen diversas enzimas que participan en la síntesis de ECBs. De naturaleza grasa, los ECBs son producidos a demanda a partir de la membrana celular (Piomelli, 2003).

En el caso de la AEA, su formación consta de dos etapas: una primera etapa en la que la enzima N-aciltransferasa (en un proceso dependiente de calcio) forma N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (NAPE) a partir de fosfatidiletanolamina. Para luego en un segundo paso, una fosfolipasa tipo D (por ello la enzima es referida como NAPE-PLD) hidroliza NAPE para liberar ácido fostatídico (PA) y la propia AEA (Okamoto et al., 2004). Además, experimentos en los que se producía la inactivación de la enzima NAPE-PLD, reflejó que existen vías de síntesis secundarias para la AEA (Leung et al., 2006; Ueda et al., 2013). Recientemente también se ha descrito la presencia de adiposomas o vesículas que contienen AEA haciendo de reservorios del neurotransmisor (Oddi, et al., 2008; Gabrielli et al., 2015).

La síntesis del ECB más abundante, el 2AG (en un proceso también dependiente de calcio), empieza por la formación de diacilgliceroles (DAGs) a partir de los fosfolípidos de la membrana celular. Dicha formación puede ser realizada por la hidrolisis de fosfoinositoles (PI) mediada por la fosfolipasa tipo

Introducción

C (PLC), o a partir de PA por la de una fosfolipasa. En el siguiente paso se transforma los DAGs en 2AG por medio de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL) (Murataeva et al., 2014).

2.3.4 Degradación de ECBs

Una vez que los ECBs son liberados en la brecha sináptica pueden unirse con su receptor diana. Cuando han finalizado con su cometido y han transmitido la señal por la fueron producidos, vuelven al interior celular para su degradación.

Durante años se ha mantenido la idea de que la rápida movilización de los ECBs era dada por la naturaleza lipídica de los mismos, ya que le permitiría un movimiento de difusión en la membrana celular. Siendo esta posibilidad la más asentada, recientemente se ha postulado la existencia de un transportador de ECBs que facilite el paso intermembranal (Chicca et al., 2012).

Dentro de la célula, los ECBs son inactivados por diferentes enzimas. Una de ellas es la amidahidrolasa de ácidos grasos (FAAH, de sus siglas en inglés). Esta enzima hidroliza la AEA en ácido araquidónico (AA) y etanolamina (Cravatt et

al., 1996), aunque también hidroliza otras NAEs secundarias. En general se encuentra localizada en el soma de las neuronas postsinápticas en las regiones donde hay abundancia del receptor CB₁ (Egertová et al., 2003), más concretamente en la cara citosólica del RE, en las mitocondrias y en menor medida en la membrana celular (Gulyas et al., 2004). Por otro lado, se encuentra la monoacilglicerol lipasa (MAGL), siendo la principal enzima de degradación del 2AG en AA y glicerol. Como ocurre con la enzima FAAH, también se sitúa en zonas ricas de expresión del receptor CB₁, pero en las neuronas presinápticas (Dinh et al., 2002). Se estima que alrededor de un 85% de la hidrólisis del 2AG es mediada por MAGL, el resto es hidrolizado por la enzima FAAH y por otras enzimas secundarias como las hidrolasas que contienen un dominio α/β , ABHD6 y ABHD12 (Blankman et al., 2007; Murataeva et al., 2014). Otra enzima de interés capaz de degradar el 2AG, es la ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2), la cual está implicada en procesos inflamatorios (Masferrer et al., 1994). Esta enzima es capaz de oxidar el 2AG (Kozac et al., 2000) en un tipo de prostaglandina, la PGE₂-G, que es un modulador sináptico que no depende de los receptores de cannabinoides (Sang et al., 2006). La contextualización de las principales vías de síntesis y degradación se pueden ver en la **Figura 15**.

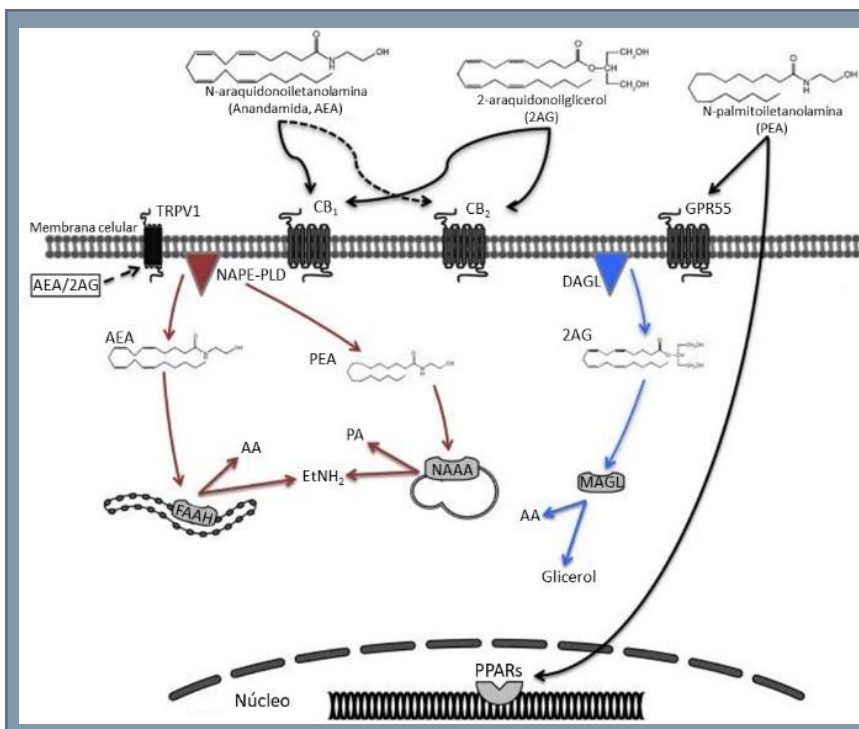


Figura 15: Esquema representativo de las principales vías de síntesis y degradación de ECBs. La enzima NAPE-PLD sintetiza la AEA y la PEA, mientras que es la enzima DAGL quien sintetiza el 2AG. Por otro lado las enzimas FAAH y MAGL degradan la AEA y el 2AG respectivamente, y es la enzima NAAA quien degrada la PEA. Además, se muestra la interacción de la AEA, la PEA y el 2AG con los diferentes receptores de cannabinoides. Modificado de: Chirchiù et al., 2015.

2.4 SEC y neuroprotección

La modulación del SEC ha permitido explorar múltiples vías terapéuticas derivadas de la amplia gama de mecanismos patológicos a los que puede hacer frente (Fernández-Ruiz, 2009). Desde el mantenimiento de la homeostasis, la inflamación, la disfunción mitocondrial o la supervivencia neuronal mediada o no por la glía, son ejemplos que convierten al SEC en una diana esencial para la neuroprotección. Ver **FIGURA 16**. Por ello en patologías como la EA, el Parkinson, o la EM son enfermedades que cursan con estos eventos tóxicos, el SEC se posiciona como una diana terapéutica (Ranieri et al., 2016).

2.4.1 Cannabinoides y excitotoxicidad

La propia funcionalidad del SE ya denota evitar un exceso de liberación de glutamato en las sinápsis. En casos patológicos como la enfermedad de Huntington, es la activación del receptor quien regula el exceso de glutamato en el modelo murino R6/2 de la enfermedad (Chiarlone et al., 2014). En cambio, el HU-210 actuando tanto vía

receptor CB₁ como CB₂, ha sido usado en un modelo de esclerosis múltiple para evitar la excitotoxicidad mediada por glutamato típica del desarrollo de la enfermedad (Docagne et al., 2007). Otra opción sería bloquear los receptores de glutamato, acción vista por el compuesto HU-211 el cual fue descrito como un bloqueante de los receptores de NMDA (Feigenbaum et al., 1989). Por otra parte, fitocannabinoides como el CBD también tienen propiedades que evitan dicha toxicidad. En este caso en un modelo de isquemia cerebral al bloquear parcialmente los canales de calcio, los cuales favorecerían la liberación vesicular (Khaksar et al., 2017).

2.4.2 Cannabinoides y estrés oxidativo

En un principio las propiedades antioxidantes de los cannabinoides eran achacadas a su estructura molecular con grupos fenólicos que median el secuestro de ROS de manera directa, sin interferir en vías de señalización mediadas por receptores (García-Arencibia et al., 2007).

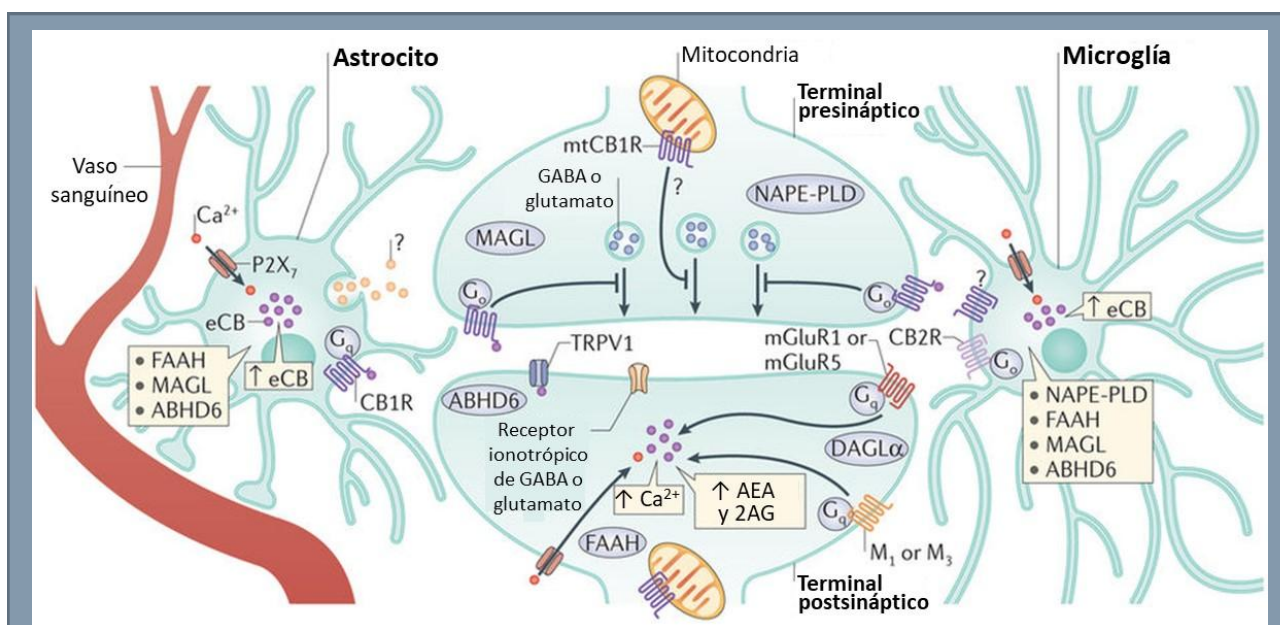


Figura 16: Esquema celular con la integración de diversos elementos del SEC. El receptor CB₁ de la neurona presináptica modula la excitotoxicidad al regular la liberación de vesículas con glutamato. Esta misma acción está aún en entredicho de los receptores CB₁ de las mitocondrias, aunque sí modulan el estrés oxidativo derivado de la respiración mitocondrial. La presencia de este receptor en astrocitos favorecería la recaptación de glutamato. Es el receptor CB₂ presente en las células de microglía quien media los procesos inflamatorios. Las diferentes enzimas de síntesis y degradación de ECBs en los diferentes tipos celulares controlan el metabolismo de SEC y su modulación en diferentes eventos patogénicos. Modificado de: Lutz et al., 2015.

Introducción

Hoy en día se sabe que sí hay vías activadas por cannabinoides que pueden paliar los efectos del estrés oxidativo (Lipina et al., 2016). El CBD por ejemplo, es capaz *in vitro* de evitar la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS ante la exposición un oxidante como el agua oxigenada (H₂O₂) (Chen et al., 2016). La AEA en cambio, previene la apoptosis debida a la exposición de la toxina 6-OHDA a través de la vía de la P3IK en un modelo de la enfermedad de Parkinson (Mnich et al., 2010). Otros estudios apuntan directamente a una activación del receptor CB₂ como medio para paliar los efectos tóxicos de la reperusión (la reoxigenación promueve la aparición de ROS) en un modelo de isquemia (Bátkai et al., 2007). Han y colaboradores, al activar el receptor CB₂ con el agonista AM1241 evitan el estrés oxidativo y la apoptosis mediante la vía de STAT3, un factor transcripcional que regula la expresión de genes relacionados con la inflamación o la autofagia, además del estrés oxidativo (Han et al., 2017).

2.4.3 Cannabinoides e inflamación

Existen múltiples evidencias de los efectos antiinflamatorios de los cannabinoides (Ranieri et al., 2016b). De todos los elementos del SEC, es el receptor CB₂ el que tiene más implicación en este tipo de procesos, debido principalmente a su localización, principalmente en las células gliales, como se ha descrito anteriormente (Turcotte et al., 2016). Acorde a este hecho, está descrito que su activación en la lía activada tiene efectos beneficiosos en procesos inflamatorios que ocurren en la EA (Aso et al., 2016). Mediante la activación de este receptor, el Δ⁹-THC previene la liberación de citoquinas inflamatorias provocadas por la broncoconstricción en un modelo celular de permeabilidad endotelial (Shang et al., 2016). Otros receptores que también disminuyen la inflamación son los PPAR_γ, los cuales mediante la activación por el 2AG puede disminuir la acción de la COX-2 (Li et al., 2015).

2.5 Cannabinoides y ELA

Los cannabinoides y el propio SEC han tienen un potencial efecto terapéutico sobre múltiples

eventos patogénicos que surgen en las enfermedades neurodegenerativas, incluida la ELA (Fernández-Ruiz, 2009; de Lago et al., 2015). Más allá de los efectos farmacológicos, el propio cannabis medicinal también posee otras diversas propiedades terapéuticas que podrían ser beneficiosas para los enfermos de ELA, como podría ser un alivio en el dolor, o mejorar el sueño de los pacientes (Lotan et al., 2014). Los pocos estudios clínicos realizados reflejan una falta de profundización en el potencial terapéutico del SEC, ya que básicamente se centran en el alivio sintomático de la ELA y no como una terapia para atenuar el desarrollo de la enfermedad (Giacoppo et al., 2016). Por ello, hay autores que demandan una mayor investigación sobre el sistema endocannabinoide como diana para tratar la ELA (Carter et al., 2010).

2.5.1 Preclínica

Si nos fijamos el número de estudios a nivel preclínico de cannabinoides y ELA, la realidad es que hay un escaso número de ellos. El primer estudio *in vitro*, fue realizado por Abood y colaboradores, previniendo la excitotoxicidad provocada por el compuesto kainato en neuronas obtenidas de médula espinal mediante la activación del recetor CB₁ con Δ⁹-THC (Abood et al., 2001). En cuanto a experimentos *in vivo*, la mayoría se han llevado a cabo utilizando el modelo de ratón transgénico SOD1 (G93A), debido principalmente a que este modelo ha sido el mejor caracterizado (Gurney, 1997). Los primeros datos del primer cannabinoide usado en este modelo, fueron dados por el uso del compuesto Δ⁹-THC. Probaron concentraciones de 5 y 10 mg/kg/día desde el día 60 de edad, antes del inicio de los primeros síntomas, pero el mejor resultado fue al tratar a los ratones con una dosis de 20 mg/kg/día a partir de los primeros síntomas apareciesen (75 días de edad). Esta dosis alargó la vida de los animales 7 días respecto a los controles. Los autores atribuyeron el efecto positivo del Δ⁹-THC a la alta capacidad que tiene como antioxidante y antiexcitotóxico, pero sin realizar pruebas de ello (Raman et al., 2004). Seguidamente, también se

describió que el CBN, un cannabinoide no psicotrópico, administrado a 5mg/Kg/día y durante 6 semanas era capaz de mejorar los parámetros motores de los ratones, aunque no así la supervivencia de los mismos (Weydt *et al.*, 2005).

El primer tratamiento claramente beneficioso en los ratones SOD1 (G93A) se obtuvo con la administración del agonista selectivo para el receptor CB₂, la molécula sintética AM-1241. La administración del compuesto a una concentración de 1 mg/kg/día se inició cuando los primeros síntomas aparecieron. Se analizó la función motora, la pérdida de peso y la supervivencia. El tratamiento con AM-1241 no alteró el peso de los animales ni mejoró la supervivencia respecto a los animales controles tratados con vehículo, pero sin embargo sí consiguió retrasar la progresión de la enfermedad analizada mediante el uso de Rota-Rod tanto en machos como en hembras (Kim *et al.*, 2006).

Posteriormente, se obtuvieron nuevos datos del estado del SEC a partir de experimentos en el modelo SOD1 (G93A). Se constató un aumento en la expresión del receptor CB₂ y una disminución del receptor CB₁ en la médula espinal tanto en niveles de RNAm como de proteína una vez que los ratones habían desarrollado los primeros síntomas (Shoemaker *et al.*, 2007). Seguidamente se comparó la eficacia de dos compuestos cannabinoides sintéticos: el AM-124 y del WIN-55,212. El primero de ellos, agonista selectivo del receptor CB₂, obtuvo un aumento del 56% en la supervivencia de los roedores a una concentración de 3 mg/kg. En el caso de WIN-55,212, que teniendo una capacidad agonista parcial tanto por CB₁ como por CB₂, se usó a 5 mg/kg obteniendo un resultado comparable al anterior caso (Shoemaker *et al.*, 2007). No obstante, los autores aluden que el efecto beneficioso de estos compuestos recae en el papel que puede desempeñar CB₂ en contraposición al que pudiera tener CB₁. Esta teoría está fundada en la disminución de expresión del receptor CB₁ observada. Además, este hecho concuerda con los datos obtenidos en

el experimento realizado por Bisland y colaboradores en el año 2006, donde se generaron ratones transgénicos para SOD1 (G93A) y que además eran knock-out para el receptor CB₁. Estos animales no mostraron ninguna diferencia en el momento de inicio de la enfermedad, pero sin embargo tuvieron un incremento en la supervivencia. Una posible hipótesis que explique estos resultados sería que en este caso se estaría dando una mayor activación del receptor CB₂ mediante los propios endocannabinoides, ya que en este mismo estudio, se obtuvieron unos resultados similares al truncar la enzima FAAH. (Bisland *et al.*, 2006).

Acorde al aumento de ECBs como un tratamiento en estos ratones, se centra otra línea de investigación que estudia los efectos de la inhibición de la enzima MAGL, lo que llevaría a un mayor nivel endógeno del endocannabinoide 2AG. El grupo de Witting A., administró oralmente el inhibidor de MAGL a los ratones SOD1 con la mutación G93A logrando el retraso de la aparición de los síntomas y en el progreso de la enfermedad. La disminución de citoquinas inflamatorias en la médula espinal de estos ratones y la misma disminución detectada en cultivos primarios de microglía, podría estar indicando una vía de actuación a través de la activación del receptor CB₂ (Pasquarelli *et al.*, 2017).

En un estudio previo a esta tesis, se obtuvieron datos obtenidos en nuestro laboratorio sobre los niveles de los diferentes componentes de SEC y de los endocannabinoides en el modelo murino SOD1 (G93A), y se realizó un tratamiento con la combinación de Δ 9-THC y CBD emulando al Sativex®. No obstante, la administración del tratamiento apenas influyó levemente en la mejoría de síntomas y en el aumento de la supervivencia (Moreno-Martet *et al.*, 2014). Para más información sobre el Sativex® acudir a la **Caja 5**.

Caja 5: Sativex®.

En una situación particular se encuentra el Sativex®. Un fármaco con base cannábica aprobado en España y en otros países de la Unión Europea para el tratamiento sintomatológico de la espasticidad que sufren pacientes con esclerosis múltiple (EM). Aprobado en la mayoría de países europeos desde 2010, incluido España. Se trata de una formulación de ratio 1:1 de Δ^9 -THC y CBD (2,7 mg de Δ^9 -THC y 2,5 de CBD/ 0,1 mL) preparada en un spray para una pulverización bucal en base alcohólica (50% etanol). Sativex® está indicado para combatir la espasticidad que sufren los pacientes de EM. A día de hoy existe una sólida base sobre la efectividad del fármaco (Zettl et al., 2016; Giacoppo et al., 2017). Una de las ventajas que posee el fármaco, a diferencia del uso aislado del Δ^9 -THC, viene dado por la inclusión en la fórmula del CBD. Que por su capacidad de bloquear de forma parcial los receptores CB₁, disminuye los efectos psicoactivos que aporta el Δ^9 -THC (McPartland et al., 2015).

Con el beneficio terapéutico del Sativex® para la EM no sería descabellado usarlos en otras patologías como podría ser la ELA. En este sentido, ha sido probado para tratar el dolor crónico que sufren los paciente de cáncer en EEUU, pero no demostró una mejoría frente al grupo placebo (Fallon et al., 2017), aunque sí podría ser recomendado para pacientes con poca tolerancia a los opioides (Lichtman et al., 2017). En el caso de las enfermedades neurodegenerativas, otro estudio piloto en pacientes de la enfermedad de Huntington (EH) no obtuvo cambios relevantes aparte de constatar su seguridad (López-Sendón Moreno et al., 2016). No obstante, en estudios preclínicos, una combinación administrada de Δ^9 -THC y CBD emulando fórmula del Sativex® tuvo efectos positivos mediados tanto por el receptor CB₁ como CB₂ en un modelo proinflamatorio de la EH al retrasar la sintomatología (Valdeolivas et al., 2012). En un modelo genético de la enfermedad, usando ratones R6/2, esa misma administración volvió a tener cierto beneficio en el desarrollo de la enfermedad (Valdeolivas et al., 2017).

2.5.2 Clínica

A nivel clínico, los escasos estudios realizados con cannabinoides han analizado el efecto terapéutico en aspectos secundarios de la enfermedad sin abordar la patogénesis propia. Por ejemplo, se ha analizado si la administración crónica del Δ^9 -THC (5 mg por dosis, dos veces al día vía oral) era capaz de disminuir la cantidad o intensidad de los calambres en pacientes con ELA en un ensayo randomizado, doble ciego y sujeto a control con grupo placebo en una muestra de 27 pacientes, aunque los resultados obtenidos fueron negativos (Weber et al., 2010). En un ensayo posterior, en la que los pacientes eran su propio control tras un lavado de dos semanas, se estudió la posible efectividad y la farmacodinámica aumentando la dosis a 10 mg. En este caso, los autores encontraron un mayor incremento de efectos no deseados (como somnolencia, debilidad o vértigo) en los pacientes que recibieron esta dosis respecto a los que recibieron la dosis de 5 mg, que podría ser debido a los efectos indeseados de la

activación del receptor CB₁ en el sistema nervioso central. Sin embargo, los autores señalan la necesidad de una valoración individualizada debido a la alta variabilidad encontrada entre los individuos (Joerger *et al.*, 2012). Otro estudio realizado de forma telemática en la que pacientes de todo el mundo eran encuestados, sí recoge ciertos efectos beneficiosos más relacionados con el estado de ánimo que por ejemplo en mejorar la capacidad de hablar y la de tragar (Amtmann *et al.*, 2014).

Queda patente que es necesario un mayor conocimiento sobre el posible papel del SEC en la patogénesis de la ELA y su posible potencial terapéutico. Es por ello importante, la realización de un estudio detallado acerca de cómo se encuentran los diferentes elementos del SEC durante las diferentes etapas de la enfermedad, y cuya modulación proporcione información sobre su papel durante el desarrollo de la enfermedad. Éste es precisamente, el objetivo principal de esta tesis doctoral.

3. MIELOPATÍA DEGENERATIVA CANINA

3.1 Patología

La mielopatía degenerativa canina (MDC) fue descrita por primera vez como una axonopatía que afecta al SNC y al sistema nervioso periférico en la raza del ‘pastor u ovejero alemán’ (Averill, 1973). Esta enfermedad se caracteriza por una ataxia con atrofia muscular (especialmente en las patas traseras) y la parálisis progresiva debido a la afección de las neuronas motoras superiores e inferiores. Esta afección se fue describiendo con el paso del tiempo en otras razas como el ‘Husky siberiano’ (Bichsel *et al.*, 1983). Por lo general, esta patología es más frecuente en perros de raza grande, pero también es posible encontrar casos de MDC en razas más pequeñas como el ‘corgi galés de Pembroke’ (Coates *et al.*, 2007; March *et al.*, 2009). A pesar de ello, una gran prevalencia en pastores alemanes presuponía cierto carácter genético de la enfermedad (Braund *et al.*, 1978).

Perros afectados por MDC presentan una patología con rasgos comunes a la ELA humana, lo que coloca a la MDC como un potencial modelo espontáneo de la ELA (Shelton *et al.*, 2012). Debido a la falta de tratamiento, la mayoría de los casos acaban con el sacrificio del animal. Al igual que sucede en la ELA, se pueden encontrar los mismos factores patológicos en la MDC. Ejemplos relevantes en esta patología son: el estrés oxidativo, la degeneración axonal o una marcada astrogliosis en la médula espinal de estos perros con MDC (Nardone *et al.*, 2016).

Las semejanzas dadas con la ELA propiciaron que la posibilidad de que en la MDC tuviera también proteínas alteradas fuera estudiada. De acuerdo con esta hipótesis se encontraron inclusiones de la proteína SOD1 en la médula espinal de perros afectados, de la misma manera que ocurre en pacientes de ELA que poseen mutaciones en SOD-1 (Awano *et al.*, 2009). Aunque en el caso de los perros afectados, por ahora sólo se han identificado dos tipos de mutaciones en la enzima SOD1, la E40K y la T18S. Ambas mutaciones a

pesar de mostrar la capacidad de dimerización de la enzima SOD1 inalterada, provocan la aparición de las inclusiones (Crisp *et al.*, 2013). Como ocurre en los casos de ELA con la mutación en SOD1, en la MDC los astrocitos de los perros afectados también presentan la aparición de cúmulos de la proteína mutada (Kobatake *et al.*, 2017).

Es evidente que el estudio de la MDC se puede convertir en una herramienta de especial interés como modelo espontáneo de la ELA. Por desdichado tiene, que además el estudio de la MDC puede dar lugar al desarrollo de tratamientos también con fines veterinarios (Coates *et al.*, 2010).

3.2 SEC en la raza canina

Respecto al sistema endocannabinoide en la raza canina son pocos los estudios realizados. En el caso del receptor CB₂, su clonaje demostró una homología cercana al 80% en especies como el ratón o la humana. Cuando se clonó el receptor en células CHO también presentó unas características de unión de compuestos similares al receptor humano. Sin embargo, poseían diferentes potencias y eficacias funcionales (Ndong *et al.*, 2011).

La distribución de ambos receptores abarca un espectro de estudios centrados en el uso de muestras fijadas. Por ejemplo, se identificó tanto la presencia del receptor CB₂ como de CB₁ en la piel de perros sanos, concretamente en distintos tipos celulares de la dermis y la epidermis. Sorprendentemente, perros afectados por una dermatitis atópica presentaron una elevación en la expresión de ambos receptores (Campora *et al.*, 2012). Al igual que en el desarrollo embrionario humano, en los embriones de perros el receptor CB₁ también tiene relevancia debido a su amplia expresión epitelial (Pirone *et al.*, 2015). Incluso se identificó la presencia del receptor CB₁ (y de la misma manera también de FAAH) en el *clastrum* canino (Pirone *et al.*, 2016). Un mayor estudio elaborado para la localización de CB₁, constató que al igual que los humanos, este receptor se puede encontrar en amplias zonas del SNC y periférico. Zonas de hipocampo, cerebelo y

Introducción

sustancia gris de la médula espinal donde la presencia de CB1 más allá de ser neuronal, también se identificó en astrocitos (Freundt-Revilla *et al.*, 2017)

Sí se ha visto en perros un papel del receptor CB₁ en cuanto a su bloqueo por el antagonista

selectivo SR141716, el cual mejoraba la resistencia hepática a la insulina sin afectar directamente al peso de los canes (Kim *et al.*, 2012). Más recientemente, parece indicar que esos efectos mediados por CB₁, serían efectuados a través de una *up-regulation* de los receptores de adiponectinas (Kabir *et al.*, 2015).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Caracterización del sistema endocannabinoide en diversos modelos de ELA

Para la consecución de este objetivo se han utilizado tres modelos de la enfermedad diferentes. En primer lugar se ha hecho uso de muestras *post mortem* de pacientes (y de controles) tanto de médula espinal como de corteza motora en los que se ha realizado la evaluación del sistema endocannabinoide. En un segundo lugar, se ha dispuesto de muestras *post mortem* de médula espinal de perros afectados por mielopatía degenerativa canina (MDC), una enfermedad espontánea que cursa con múltiples similitudes a la ELA. Y en tercer lugar, se ha realizado la caracterización del SEC en un modelo murino transgénico de TDP43, una proteína que ha sido relacionada con el origen patogénico y que supone una nueva alternativa al modelo clásico de estudio.

El uso de varios modelos con diversos orígenes patogénicos posibilita un estudio amplio sobre cómo los múltiples eventos tóxicos en la ELA alteran el SEC. De esta manera, también se pone de manifiesto las similitudes encontradas entre modelos, donde el receptor CB₂ toma una especial relevancia.

En el cumplimiento de este objetivo se han incluido en los siguientes artículos de investigación:

Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., de Lago, E. (2018). Analysis of endocannabinoid receptors and enzymes in the post-mortem motor cortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*, 1-10.

Fernández-Trapero, M*, **Espejo-Porras, F***, Rodríguez-Cueto, C., Coates, J.R., Pérez-Díaz, C., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J. (2017). Upregulation of CB2 receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis. Model. Mech.*, 10(5), 551-558.

Espejo-Porras, F., Piscitelli, F., Verde, R., Ramos, J.A., Di Marzo, V., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J. (2015). Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J. Neuroimmune. Pharmacol.*, 10(2), 233-44.



RESEARCH ARTICLE

Analysis of endocannabinoid receptors and enzymes in the post-mortem motor cortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients

FRANCISCO ESPEJO-PORRAS^{1,2,3} , JAVIER FERNÁNDEZ-RUIZ^{1,2,3}  & EVA DE LAGO^{1,2,3} 

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, and ³Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

Abstract

Objective: We have investigated the endocannabinoid system in the motor cortex of motor neuron disease (MND) patients. **Methods:** Post-mortem samples from MND patients and controls were used for immunostaining and/or Western blotting analysis of endocannabinoid elements. **Results:** We did not find any evidence of neuronal losses in the motor cortex of MND patients, but elevations in glial markers Iba-1 and GFAP were evident. We found no changes in FAAH and MAGL enzymes and in the CB₁ receptor, which correlated with the lack of cortical neuron death. By contrast, the Western blotting analysis of CB₂ receptors proved an increase in the motor cortex corroborated by immunostaining, correlating with the elevated gliosis in these patients. Double-labeling analyses revealed that this elevated CB₂ receptor immunostaining was located in GFAP-labelled astroglial cells. However, we also found CB₂ receptor labeling in cortical neurons confirmed with double immunofluorescence with the neuronal marker MAP-2. This was also found in the spinal cord, using double-labeling with the spinal motor neuron marker choline-acetyl transferase. This happened in both patients and controls, despite these neurons experienced an important degeneration in patients reflected in reduced Nissl staining, TDP-43 immunostaining and CB₁ receptor levels measured by Western blotting. **Conclusion:** We have confirmed that CB₂ receptors are elevated in the motor cortex of MND patients associated with the reactive gliosis. This phenomenon is previous to neuronal losses. We also found CB₂ receptors in cortical and spinal motor neurons. These observations support that targeting this receptor may serve for developing neuroprotective therapies in MNDs.

Keywords: Motor neuron disease, amyotrophic lateral sclerosis, post-mortem tissues, CB₁ and CB₂ receptors, FAAH and MAGL enzymes

Introduction

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), also known as motor neuron disease (MND) in UK, is a neuromuscular disease characterized by the progressive degeneration of upper and lower motor neurons, causing muscle weakness and paralysis (1). Most of the ALS cases are sporadic, but several genes causing the disease have been identified, including the copper-zinc superoxide dismutase gene (*SOD1*), which encodes the antioxidant enzyme SOD1, discovered in 1993 (2), and more recently *TARDBP* (TAR-DNA binding protein) and *FUS*

(fused in sarcoma), which encode proteins involved in pre-mRNA splicing, transport and/or stability (3,4), and the CCGGG hexanucleotide expansion in the *C9orf72* gene (5). The pathogenic mechanisms of these new genes, which differ, in part, from the toxicity associated with mutant SOD1, led to a novel molecular classification of ALS subtypes, and to its association with forms of frontotemporal dementia (FTD) (6,7).

Rilutek[®] and Radicava[®] are the only FDA approved drugs for slowing disease progression in ALS, but they have modest efficacy (8–10). Recently cannabinoids have been shown to

Correspondence: Javier Fernández-Ruiz, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid-28040, Spain. E-mail: jjfr@med.ucm.es; Eva de Lago, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid-28040, Spain. E-mail: elagofem@med.ucm.es

(Received 17 October 2017; revised 4 December 2017; accepted 27 December 2017)

ISSN 2167-8421 print/ISSN 2167-9223 online © 2018 World Federation of Neurology on behalf of the Research Group on Motor Neuron Diseases
DOI: 10.1080/21678421.2018.1425454

RESEARCH ARTICLE

SPECIAL COLLECTION: NEURODEGENERATION

Upregulation of CB₂ receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis

María Fernández-Trapero^{1,2,3,4,*}, Francisco Espejo-Porras^{1,2,3,*}, Carmen Rodríguez-Cueto^{1,2,3}, Joan R. Coates⁵, Carmen Pérez-Díaz⁴, Eva de Lago^{1,2,3,§} and Javier Fernández-Ruiz^{1,2,3,§}

ABSTRACT

Targeting of the CB₂ receptor results in neuroprotection in the SOD1^{G93A} mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The neuroprotective effects of CB₂ receptors are facilitated by their upregulation in the spinal cord of the mutant mice. Here, we investigated whether similar CB₂ receptor upregulation, as well as parallel changes in other endocannabinoid elements, is evident in the spinal cord of dogs with degenerative myelopathy (DM), caused by mutations in the superoxide dismutase 1 gene (*SOD1*). We used well-characterized post-mortem spinal cords from unaffected and DM-affected dogs. Tissues were used first to confirm the loss of motor neurons using Nissl staining, which was accompanied by glial reactivity (elevated GFAP and Iba-1 immunoreactivity). Next, we investigated possible differences in the expression of endocannabinoid genes measured by qPCR between DM-affected and control dogs. We found no changes in expression of the CB₁ receptor (confirmed with CB₁ receptor immunostaining) or NAPE-PLD, DAGL, FAAH and MAGL enzymes. In contrast, CB₂ receptor levels were significantly elevated in DM-affected dogs determined by qPCR and western blotting, which was confirmed in the grey matter using CB₂ receptor immunostaining. Using double-labelling immunofluorescence, CB₂ receptor immunolabelling colocalized with GFAP but not Iba-1, indicating upregulation of CB₂ receptors on astrocytes in DM-affected dogs. Our results demonstrate a marked upregulation of CB₂ receptors in the spinal cord in canine DM, which is concentrated in activated astrocytes. Such receptors could be used as a potential target to enhance the neuroprotective effects exerted by these glial cells.

KEY WORDS: Cannabinoids, Endocannabinoid signaling, CB₂ receptors, Canine degenerative myelopathy, Amyotrophic lateral sclerosis, *SOD1*, Activated astrocytes

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid 28040, Spain. ³Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid 28040, Spain. ⁴Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain. ⁵Department of Veterinary Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA.

*These authors contributed equally to this work

§Authors for correspondence (elagofem@med.ucm.es; jifr@med.ucm.es)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 20 October 2016; Accepted 4 January 2017

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive degeneration and loss of upper and lower motor neurons in the brain and spinal cord, causing muscle weakness and paralysis (Hardiman et al., 2011). In 1993, genetic studies identified the first mutations in the copper-zinc superoxide dismutase gene (*SOD1*), which encodes a key antioxidant enzyme, SOD1 (Rosen et al., 1993). Mutations in *SOD1* account for 20% of genetic ALS and 2% of all ALS. More recently, similar studies have identified mutations in other genes, such as *TARDBP* (TAR-DNA binding protein) and *FUS* (fused in sarcoma), which encode proteins involved in pre-mRNA splicing, transport and/or stability (Buratti and Baralle, 2010; Lagier-Tourenne et al., 2010) and, in particular, the CCGGGG hexanucleotide expansion in the *C9orf72* gene, which appears to account for up to 40% of genetic cases (Cruts et al., 2013). Their pathogenic mechanisms, which differ, in part, from the toxicity associated with mutations in *SOD1*, led to a novel molecular classification of ALS subtypes (Al-Chalabi and Hardiman, 2013; Renton et al., 2014).

The ultimate goal in ALS is to develop novel therapeutics that will slow disease progression. Rilutek has been the only drug approved by the US Food and Drug Administration (FDA), but it is limited in efficacy (Habib and Mitsumoto, 2011). Recently, cannabinoids have been shown to have neuroprotective effects in transgenic rodent ALS models (Bilsland and Greensmith, 2008; de Lago et al., 2015, for review). Chronic treatment with the phytocannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) delayed motor impairment and improved survival in the SOD1^{G93A} transgenic mouse (Raman et al., 2004). Other cannabinoid compounds, including the less psychotropic plant-derived cannabinoid cannabidiol (Weydt et al., 2005), the non-selective synthetic agonist WIN55,212-2 (Bilsland et al., 2006), and the selective cannabinoid receptor type-2 (CB₂) agonist AM1241 (Kim et al., 2006; Shoemaker et al., 2007), produced similar effects. Genetic or pharmacological inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH), one of the key enzymes in endocannabinoid degradation, was also beneficial in SOD1^{G93A} transgenic mice (Bilsland et al., 2006). The efficacy shown by compounds that target the CB₂ receptor (Kim et al., 2006; Shoemaker et al., 2007) appears to be facilitated by the fact that this receptor is upregulated in reactive glia in post-mortem spinal cord tissue from ALS patients (Yiangou et al., 2006). Such elevation of CB₂ receptors has been also described in SOD1^{G93A} transgenic mice (Shoemaker et al., 2007; Moreno-Martel et al., 2014), and we recently found that the response occurred predominantly in activated astrocytes recruited at lesion sites in the spinal cord (F.E.P., unpublished results). We have also described a similar increase in CB₂ receptors on reactive microglia in TDP-43 transgenic mice (Espejo-Porras et al., 2015). Based on

these studies, the CB₂ receptor may be a novel target in altering disease progression in ALS, given its effective control of glial influences exerted on neurons, as investigated in other disorders (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2015; Iannotti et al., 2016 for review).

A challenge of preclinical studies of novel neuroprotective agents in ALS is poor translation of therapeutic success in small animal (e.g. rodents, zebrafish, flies, nematodes) to human ALS patients. Most studies have been based on overexpression of specific human gene mutations. In this context, we have recently turned to canine degenerative myelopathy (DM), a multisystem central and peripheral axonopathy described in dogs in 1973 (Averill, 1973), with an overall prevalence of 0.19% (Coates and Winger, 2010 for review), which shares pathogenic mechanisms with some forms of human ALS, including mutations in SOD1 as one of the major causes of the disease (Awano et al., 2009). With some differences depending on the type of breed, DM is characterized by degeneration in the white matter of the spinal cord and the peripheral nerves, which progresses to affect both upper and lower motor neurons (Coates and Winger, 2010 for review). The disease appears at 8-14 years of age with an equivalent effect in both sexes that necessitates euthanasia (Coates and Winger, 2010 for review). This canine pathology represents a unique opportunity to investigate ALS in a context much closer to the human pathology, using an animal species that are phylogenetically closest to humans, and in which the disease occurs spontaneously. Our objective in the present study has been to investigate the changes that the development of DM produces in endocannabinoid elements in those CNS sites (spinal cord) most affected in this disease. It is important to note that such elements may result in potential targets for a pharmacological therapy with cannabinoid-based therapies (e.g. Sativex) aimed at delaying/arresting the progression of the disease in these dogs, and ultimately in humans. The study was carried out with post-mortem tissues (spinal cords) from dogs affected by DM kindly provided by Dr Joan R. Coates (University of Missouri, Columbia, MO, USA) and classified in different disease stages (Coates and Winger, 2010). All DM tissues included the necessary clinical, genetic and neuropathological information, and they were accompanied by adequate matched control tissues. Both DM-affected and control tissues were used for analysis of endocannabinoid receptors and enzymes using biochemical (qPCR, western blot) and, in some cases, histological (immunohistochemistry) procedures, including the use of double

immunofluorescence staining to identify the cellular substrates in which the changes in endocannabinoid elements (CB₂ receptors) take place.

RESULTS

Validation of the expected histopathological deterioration in DM-affected dogs

The data provided by the biobank confirmed that all tissues obtained from DM-affected dogs had a clinical diagnosis of DM in all cases supported by the genetic analysis which confirmed the presence of the SOD1 mutation. They corresponded to two different breeds, which are from species most affected by this disease (Coates and Winger, 2010), and animals were all euthanized in an age interval of 9-13.6 years (11.8±0.6; mean±s.d.), with a grade of the disease of 1-3 (2.2±0.3). DM-affected dogs included 6 spayed females and 2 castrated males (see details in Table 1). The control tissues were selected from dogs with no clinical diagnosis of DM. All control dogs were homozygous wild-type and age-matched (8-13.6 years; 10.0±0.8). They included 6 females, 1 of them spayed, and 1 castrated male (see details in Table 1).

We found a significant reduction in the number of Nissl-stained cell bodies corresponding to lower motor neurons located in the ventral horn of DM-affected spinal cords (Fig. 1A,B). The neuronal loss was accompanied by an intense glial reactivity in the affected areas, in particular, we detected a 3-fold increase in GFAP immunolabelling in the spinal grey matter (Fig. 1C,D). We also found microgliosis in both white and grey matter of the spinal cord, detected with DAB immunostaining for the microglial marker Iba-1 (Fig. 2A); Iba-1 levels were increased 2.5-fold in the grey matter of DM-affected dogs compared with levels in control dogs (Fig. 2B,C).

Changes in the endocannabinoid receptors and enzymes in DM-affected dogs

Next, we investigated possible differences between DM-affected dogs and control animals in the expression of endocannabinoid genes measured by qPCR. Although there was a trend towards an elevation, there were no significant changes in expression of the CB₁ receptor (*CNRI*), or *FAAH*, monoacylglycerol lipase (*MAGL*), *N*-arachidonoyl-phosphatidylethanolamine phospholipase D (*NAPE-PLD*) and diacylglycerol lipase (*DAGL*) enzymes between the two groups (Fig. 3A). We attempted to determine whether the trends detected for these five parameters may

Table 1. Clinical, genetic and histopathological characteristics of DM-affected and control dogs whose spinal tissues were used in this study

Code	Genotype	Age at death (years)	Sex	Breed	Diagnosis	Disease grade
DM-affected dogs						
DM#1	A/A	12	Spayed female	Boxer	DM	2
DM#2	A/A	11	Spayed female	Boxer	DM	1.5
DM#3	A/A	9	Spayed female	Boxer	DM	1
DM#4	A/A	12.78	Spayed female	Pembroke Welsh corgi	DM	3
DM#5	A/A	12.58	Castrated male	Pembroke Welsh corgi	DM	2.5-3
DM#6	A/A	13.6	Spayed female	Pembroke Welsh corgi	DM	3 (early)
DM#7	A/A	11.6	Castrated male	Pembroke Welsh corgi	DM	2
DM#8	A/A	11.7	Spayed female	Pembroke Welsh corgi	Severe DM and disc herniation 2 years prior	3
Control dogs						
CT#1	G/G	10.5	Castrated male	German shepherd	Spinal cord normal	NA
CT#2	G/G	13.6	Female	Pit bull mix	Spinal cord normal	NA
CT#3	G/G	11.8	Spayed female	Rhodesian ridgeback	Spinal cord normal	NA
CT#4	G/G	8.5	Female	Beagle	Spinal cord normal	NA
CT#5	G/G	8	Female	Beagle	Spinal cord normal	NA
CT#6	G/G	9.6	Female	Beagle	Spinal cord normal	NA
CT#7	G/G	8	Female	Beagle	Spinal cord normal	NA

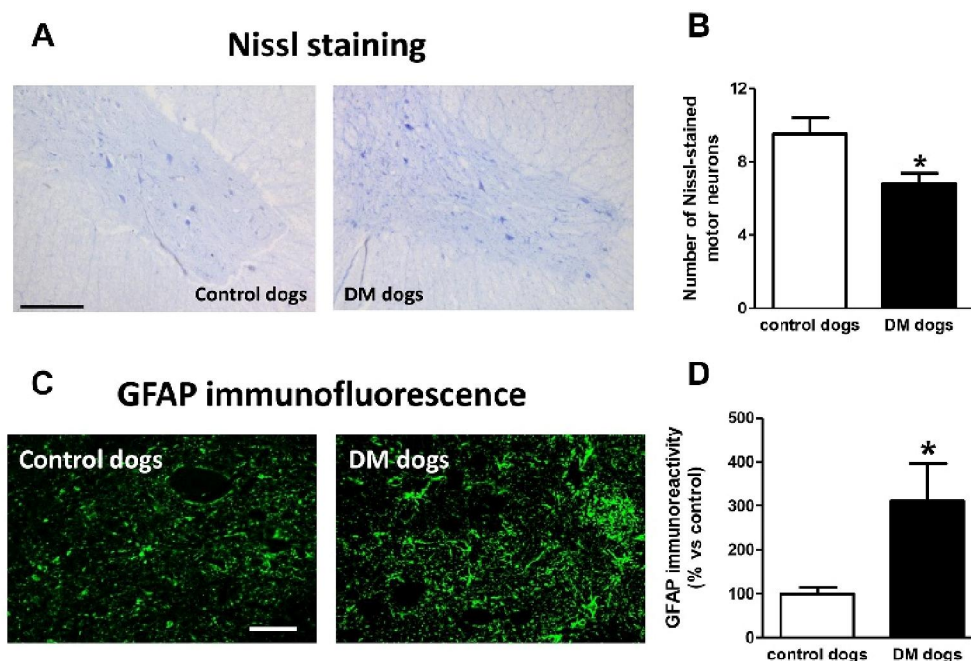


Fig. 1. Nissl staining and glial activity in spinal cord sections of dogs with degenerative myelopathy (DM). Representative photomicrographs and quantification of Nissl staining (A,B) and GFAP immunofluorescence (C,D) in spinal cord sections (grey matter in the ventral horn at T7-T10) of DM-affected and age-matched control dogs. Values are expressed as mean±s.e.m. for 6-7 animals per group. Data were analysed using the unpaired Student's *t*-test (**P*<0.05 compared with control animals). Scale bars: 300 µm (A) and 200 µm (C).

correspond to a greater effect in DM dogs with advanced disease, but we did not find any statistically significant correlation (data not shown). They were not related to gender-dependent differences (data not shown). The absence of changes in CB₁ receptor gene expression was observed at the protein level using DAB immunostaining in the grey matter (Fig. 3B,C). This occurred despite the reduction in the number of motor neurons detected with Nissl staining.

Next, we investigated the CB₂ receptor, an endocannabinoid element that is frequently altered in conditions of neurodegeneration (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2015; Iannotti et al., 2016), including ALS (Yiangou et al., 2006; Shoemaker et al., 2007; Moreno-Martet et al., 2014; Espejo-Porras et al., 2015). First, we detected an increase of more than 2-fold in CB₂ receptor (*CNR2*) expression, measured by qPCR, in DM-affected dogs (Fig. 4A). We also investigated whether this increase occurred predominantly in the tissues obtained from DM-affected dogs at the intermediate and advanced stages, but we did not find any significant correlation between both variables (data not shown). This increase in gene expression was confirmed at the protein level using western blotting (2-fold increase; Fig. 4B), as well as using DAB immunostaining, which showed that the number of CB₂ receptors increased predominantly in the grey matter (Fig. 5A,B).

Double-labelling analyses to identify the CB₂ receptor-positive cellular substrates

Examination of the morphology of those cells positive for the CB₂ receptor in DAB immunostaining (Fig. 5A) suggested they were glial cells. We wanted to confirm this by using double-labelling immunofluorescence analysis. We found that CB₂ receptor immunolabelling colocalized with GFAP immunofluorescence (Fig. 6), thus indicating that the upregulation of CB₂ receptors in

the spinal cord of DM-affected dogs occurred in reactive astrocytes. Similar double-labelling immunofluorescence with Iba-1 did not detect any colocalization with the CB₂ receptor immunostaining, indicating that the receptor is not located in microglial cells in the spinal cord of DM-affected dogs (Fig. 7).

DISCUSSION

Our study addressed changes in specific endocannabinoid elements in canine DM, a disease of older dogs with similarities to ALS (Coates and Winger, 2010 for review). The endocannabinoid system has been previously investigated in different regions of the canine brain (Pirone et al., 2016), but this is the first time that these elements have been investigated in the context of an important neurodegenerative disorder occurring in dogs. The benefits of such an investigation could result in the development of cannabinoid-based therapies for human ALS, but these studies may also serve as a first step in a cannabinoid-based pharmacotherapy useful for veterinary medicine. Our study has investigated the six endocannabinoid elements commonly recognized to develop pharmacological therapies, and has identified the CB₂ receptor as promising potential target. It is important to mention that our study demonstrates no loss of CB₁ receptors, which are typically located in neurons, despite the loss of motor neurons occurring in canine DM. This suggests that, contrary to other neurodegenerative conditions in humans, which suffer a profound loss of neuronal CB₁ receptors, e.g. Huntington's disease (Fernández-Ruiz et al., 2015), the CB₁ receptor may serve as a potential target in canine DM (shown here) and also in human ALS (de Lago et al., 2015).

As we report for canine DM here, the CB₂ receptor also becomes strongly upregulated in activated glia in response to neuronal damage in transgenic ALS rodent models (Shoemaker et al., 2007;

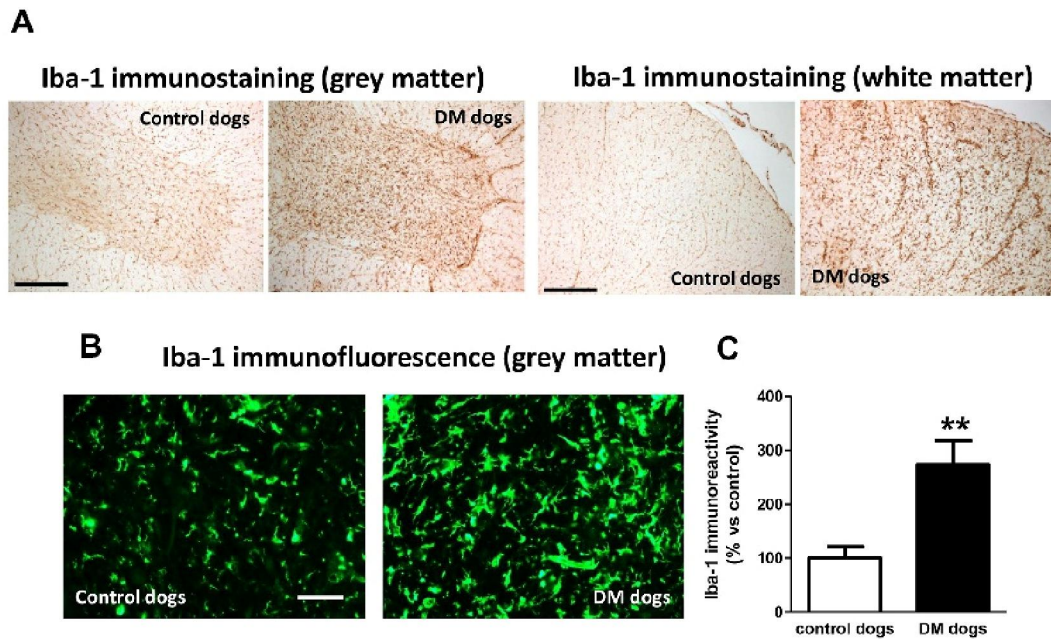


Fig. 2. Iba-1 distribution in spinal cord sections of DM-affected dogs. Representative photomicrographs of Iba-1 immunostaining using DAB (A) and Iba-1 immunofluorescence (B) and its quantification (C) in spinal cord sections (grey matter in the ventral horn and white matter in the dorsal area, both at T7-T10) of DM-affected and age-matched control dogs. Values are expressed as means±s.e.m. for 5-7 animals per group. Data were analysed using the unpaired Student's *t*-test (***P*<0.01 compared with control animals). Scale bar: 300 µm (A) and 200 µm (B).

Moreno-Martet et al., 2014; Espejo-Porras et al., 2015) and ALS patients (Yiangou et al., 2006). The response is not exclusive to ALS but is also observed in other acute or chronic neurodegenerative disorders (e.g. ischemia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease; reviewed in Fernández-Ruiz et al., 2007, 2015; Iannotti et al., 2016). These findings support the idea that the rise in CB₂ receptors in activated glial elements is an endogenous response of endocannabinoid signalling aimed at protecting neurons against cytotoxic insults, as well as restoring

neuronal homeostasis and integrity (Pacher and Mechoulam, 2011; de Lago et al., 2015; Fernández-Ruiz et al., 2015).

Results of our study further demonstrated that the elevation of CB₂ receptors occurs in activated astrocytes rather than in microglial cells. This finding has been previously described in the spinal cords of transgenic SOD1 mice (F.E.P., unpublished results). In other transgenic models of ALS, e.g. TDP-43 transgenic mice, the upregulatory response of these receptors occurs predominantly in reactive microglial cells (Espejo-Porras et al., 2015) and in tissues of

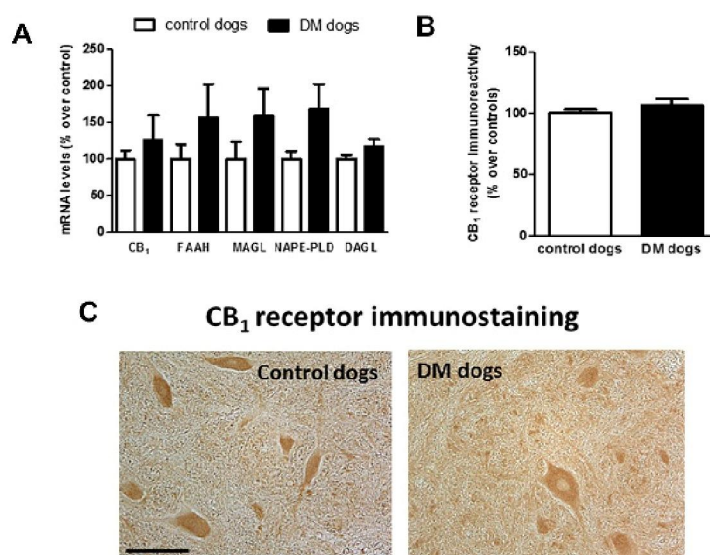


Fig. 3. Status of CB₁ receptors in spinal samples of DM-affected dogs. Gene expression for the CB₁ receptor (*CNR1*) and *NAPE-PLD*, *DAGL*, *FAAH* and *MAGL* measured by qPCR (A), and representative microphotographs for CB₁ receptor immunostaining using DAB (C) and its quantification in the grey matter in the ventral horn (B), in the spinal cord samples (for qPCR) or T7-T10 sections (for immunostaining) of DM-affected and age-matched control dogs. Values are expressed as means±s.e.m. for 7-8 animals per group. Data were analysed using the unpaired Student's *t*-test. Scale bar: 150 µm.

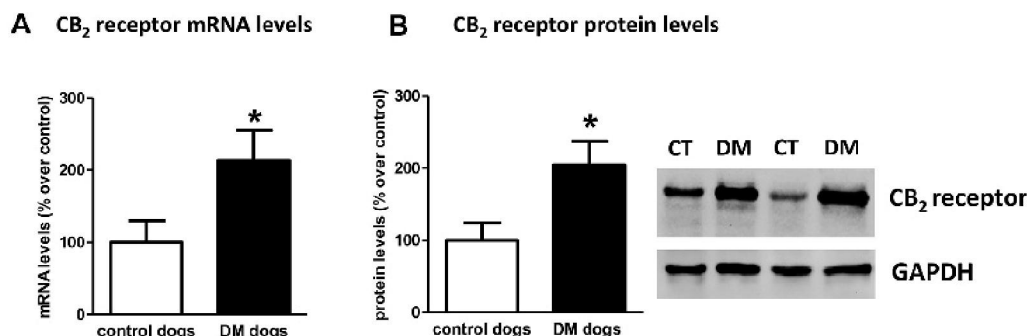


Fig. 4. Gene expression and protein levels of CB₂ receptor in DM-affected dogs. Gene expression of the CB₂ receptor (*CNR2*) measured by qPCR (A), as well as western blot analysis for this receptor (B) in spinal cord samples of DM-affected and age-matched control dogs. Values correspond to % over control animals and are expressed as means±s.e.m. for 7 animals per group. Data were analysed using the unpaired Student's *t*-test (**P*<0.05 compared with control animals).

human ALS patients (Yiangou et al., 2006). In multiple sclerosis and Huntington's disease, the overexpression of CB₂ receptors occurs in both activated astrocytes and reactive microglia (Benito et al., 2007; Sagredo et al., 2009). The increase in CB₂ receptors in activated glial elements may be related to the influence of these cells on neuronal homeostasis, for example, by enhancing metabolic support and glutamate reuptake activity exerted by astrocytes (Fernández-Ruiz et al., 2015 for review), by facilitating the transfer of microglial cells from M1 to M2 phenotypes (Mecha et al., 2016 for review) or by attenuating the generation of proinflammatory cytokines, chemokines, nitric oxide and reactive oxygen species by either astrocytes or microglial cells when they become activated (Fernández-Ruiz et al., 2015 for review). These possibilities place the receptor in a promising position for the development of novel therapies. In light of our present study, and given their preferential location in activated astrocytes, we will need to conduct additional research aimed at

investigating the consequences of selective CB₂ receptor activation in these glial cells during the progression of this canine disease.

In conclusion, our results demonstrated a marked upregulation of CB₂ receptors occurring in the spinal cord of dogs affected by DM. Such upregulation occurred in the absence of changes in other endocannabinoid elements and was concentrated in activated astrocytes, then becoming a potential target to enhance the protective effects exerted by these glial cells to improve neuronal homeostasis and integrity.

MATERIALS AND METHODS

Management of the post-mortem tissues

All experiments were conducted on post-mortem spinal cord tissues collected from DM-affected and unaffected dogs. All tissues (formalin-fixed tissues for routine histopathology and frozen tissues for qPCR and western blotting) were provided by Dr Joan R. Coates (Department of Veterinary Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, University of Missouri, Columbia, MO, USA). Protocols for tissue collection were approved by the University of Missouri Animal Care and Use Committee.

Tissues provided included those of DM-affected dogs and age-matched controls and accompanied by adequate clinical and genetic testing information (see details in Table 1). DM diagnoses were confirmed histopathologically by assessing the mid to lower thoracic spinal cord segment for evidence of myelinated axon loss and pronounced astrogliosis in the dorsal portion of the lateral funiculus (Averill, 1973; March et al., 2009). Dogs that had exhibited clinical signs of DM but did not show the typical histopathology were presumed to have another cause for the myelopathy and were excluded from the study. The spinal cord segments were examined for the presence of SOD1-immunoreactive aggregates within ventral horn motor neurons (Avano et al., 2009). Dogs that had not exhibited any clinical signs of DM prior to euthanasia and whose thoracic spinal cords were histologically normal were used as controls.

Tissues from DM-affected dogs were sorted by different stages of disease progression characterized at origin according to the following clinical and histopathological characteristics: (i) Stage 1 (upper motor neuron paraparesis): progressive general proprioceptive ataxia and asymmetric spastic paraparesis, but intact spinal reflexes; (ii) Stage 2 (non-ambulatory paraparesis to paraplegia): mild to moderate loss of muscle mass, reduced to absent spinal reflexes in pelvic limbs, and possible urinary and faecal incontinence; (iii) Stage 3 (lower motor neuron paraplegia to thoracic limb paresis): signs of thoracic limb paresis, flaccid paraplegia, severe loss of muscle mass in pelvic limbs, and urinary and faecal incontinence; and (iv) Stage 4 (lower motor neuron tetraplegia and brainstem signs): flaccid tetraplegia, difficulty with swallowing and tongue movements, reduced to absent cutaneous trunci reflex, generalized and severe loss of muscle mass, and urinary and faecal incontinence (see details in Coates and Wininger, 2010). All DM tissues were accompanied by details of symptoms, genotype

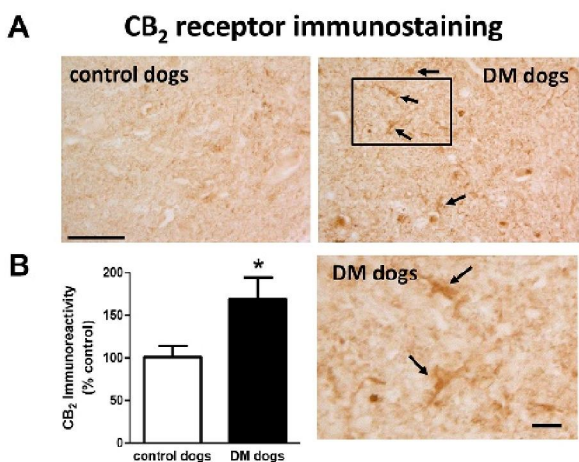


Fig. 5. CB₂ receptor immunostaining and quantification in DM-affected dogs. Representative photomicrographs for CB₂ receptor immunostaining using DAB (A) and its quantification (B) in the grey matter of the ventral horn in T7-T10 spinal cord sections of DM-affected and age-matched control dogs. Values are expressed as means±s.e.m. for 5-6 animals per group. Boxed region in DM dog image is shown enlarged in panel below. Data were analysed using the unpaired Student's *t*-test (**P*<0.05 compared with control animals). Scale bars: 150 μm and 50 μm (enlargement). Arrows indicate CB₂ receptor-positive cells.

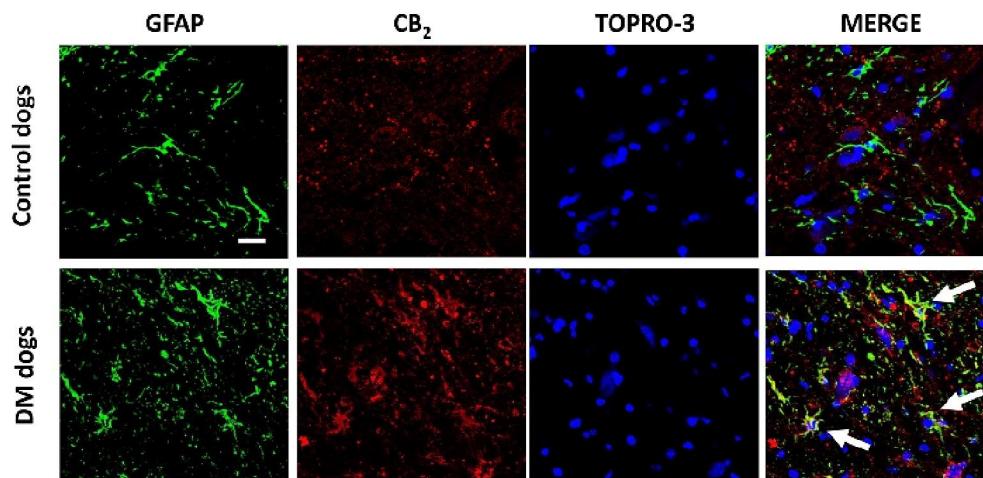


Fig. 6. Double immunofluorescence analysis for CB₂ receptor and GFAP in spinal cord sections of DM-affected dogs. Representative photomicrographs showing double immunofluorescence analysis for the CB₂ receptor and GFAP, using TOPRO-3 for labelling cell nuclei, in the grey matter of the ventral horn in T7-T10 spinal cord sections of DM-affected and age-matched control dogs (*n*=3/group). Scale bar: 50 μm. Arrows indicate cells labelled with the antibodies for the two markers.

and clinical diagnosis (see details in Table 1). Tissue studies confirm the loss of motor neurons using Nissl staining and accompanied by analysis of glial reactivity using GFAP and Iba-1 immunostaining. Next, we investigated the status of endocannabinoid receptors and enzymes using biochemical (qPCR, western blot) and, in some cases, immunostaining procedures, including double immunofluorescence staining to identify the cellular substrates in endocannabinoid elements (CB₂ receptors). For all measures, tissues used corresponded to 7-8 different animals per experimental group.

Real-time qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from spinal cord samples (from T7 to T10) using TRI Reagent (Sigma). The total amount of RNA extracted was quantified by spectrometry at 260 nm and its purity was evaluated by the ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm, whereas its integrity was confirmed in agarose gels. To prevent genomic DNA contamination, DNA was removed and single-stranded complementary DNA was synthesized from 0.6 μg total RNA using a commercial kit (RNeasy Mini Quantitect Reverse

Transcription, Qiagen). The reaction mixture was kept frozen at -80°C until enzymatic amplification. Quantitative real-time PCR assays were performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) to quantify mRNA levels for CB₁ receptor (Cf02716352_u1), CB₂ receptor (Cf02696139_s1), DAGL (Cf02705627_m1), FAAH (Cf02648944_m1) and MAGL (Cf02662432_m1). For NAPE-PLD, we used a custom-designed assay (Custom Plus TaqMan RNA Assay Design, Applied Biosystems). In all cases, we used GAPDH expression (Cf04419463_gH) as an endogenous control gene for normalization. The PCR assay was performed using the 7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and the threshold cycle (Ct) was calculated by the instrument's software (7300 Fast System, Applied Biosystems). Values were normalized as percentages over the control group.

Western blot analysis

Purified protein fractions were isolated using ice-cold RIPA buffer. Then, 20 μg protein was boiled for 5 min in Laemmli SDS loading buffer (10%

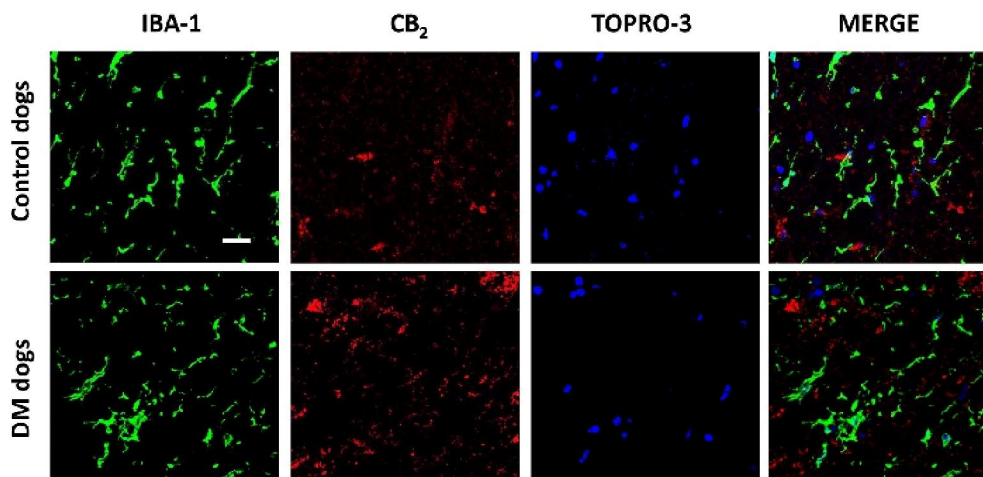


Fig. 7. Double immunofluorescence analysis for CB₂ receptor and Iba-1 in DM-affected dogs. Representative photomicrographs showing double immunofluorescence analysis for the CB₂ receptor and Iba-1, using TOPRO-3 for labelling cell nuclei, in the grey matter of the ventral horn in T7-T10 spinal cord sections of DM-affected and age-matched control dogs (*n*=3/group). Scale bar: 50 μm.

RESEARCH ARTICLE

Disease Models & Mechanisms (2017) 10, 551-558 doi:10.1242/dmm.028373

glycerol, 5% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 0.01% Bromophenol Blue and 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) and loaded onto a 12% acrylamide gel (Bio-Rad), and then transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore) using mini Trans-Blot Electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk and incubated overnight at 4°C with a mouse anti-CB₂ receptor antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology, SC-293188), followed by a second incubation during 2 h at room temperature with an ECL horseradish peroxidase-linked whole secondary antibody (GE Healthcare) at a 1:5000 dilution. Reactive bands were detected by chemiluminescence with the Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Images were analysed on a ChemiDoc station with Quantity One software (Bio-Rad). Data were calculated as the ratio between the optical densities of the specific protein band and the housekeeping protein GAPDH, and they were normalized as percentages over the control group.

Histological procedures

Tissue slicing

Fixed spinal cords were sliced with a cryostat at the thoracic level, always between T7-T10, which correspond to the spinal level in which the axonal degeneration was most severe (Coates and Winger, 2010). Coronal sections (20 μm thick) were collected on gelatin-coated slides. Sections were used for procedures of Nissl-staining, immunohistochemistry and immunofluorescence.

Nissl staining

Slices were used for Nissl staining using Cresyl Violet, as previously described (Alvarez et al., 2008). A Leica DMRB microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and a DFC300FX camera (Leica) were used for the observation and photography of the slides, respectively. For counting the number of Nissl-stained large motor neurons in the anterior horn, high-resolution photomicrographs were taken with the 20× objective under the same conditions of light, brightness and contrast. Four images coming from at least three sections per animal were analysed. The final value is the mean for all animals included in each experimental group.

Immunohistochemistry

Slices were pre-incubated for 20 min in 0.1 M PBS with 0.1% Triton X-100, pH 7.4, and subjected to endogenous peroxidase blockade by incubation for 1 h at room temperature in peroxidase blocking solution (Dako). Then, they were incubated in 0.1 M PBS with 0.01% Triton X-100, pH 7.4, with one of the following primary antibodies: (i) polyclonal anti-rabbit Iba-1 antibody (1:500; Wako Chemicals, #019-19741); (ii) polyclonal anti-rabbit CB₁ receptor (1:400; Thermo Fisher Scientific, PA1-743) and (iii) polyclonal anti-goat CB₂ receptor antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, SC10076). Samples were incubated overnight at 4°C, then sections were washed in 0.1 M PBS and incubated for 2 h at room temperature with the appropriate biotin-conjugated anti-goat or anti-rabbit (1:200; Vector Laboratories) secondary antibodies. The Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) and a DAB substrate-chromogen system (Dako) were used to obtain a visible reaction product. Negative control sections were obtained using the same protocol with omission of the primary antibody. All sections for each immunohistochemical procedure were processed at the same time and under the same conditions. A Leica DMRB microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and a DFC300FX camera (Leica) were used for slide observation and photography.

Immunofluorescence

Quantification of GFAP and Iba-1 immunoreactivity was also carried out using immunofluorescence, and this procedure was also used for double-labelling studies. Slices were preincubated for 1 h with Tris-buffered saline with 1% Triton X-100 (pH 7.5). Then, sections were sequentially incubated overnight at 4°C with a polyclonal anti-Iba-1 (1:500; Wako Chemicals, #019-19741) or polyclonal anti-GFAP (1:200; Dako, Z0334), followed by washing in Tris-buffered saline and a further incubation (at 37°C for 2 h) with an Alexa Fluor 488 anti-rabbit antibody conjugate made in donkey (1:200; Invitrogen), rendering green fluorescence for anti-Iba-1 or anti-

GFAP. Immunofluorescence was quantified using a SP5 Leica confocal microscope and ImageJ software (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). For double-labelling studies, sections were then washed again and incubated overnight at 4°C with a polyclonal anti-CB₂ receptor (1:100; Santa Cruz Biotechnology, SC-10076). This was followed by washing in Tris-buffered saline and a further incubation (at room temperature for 2 h) with a biotin-conjugated anti-goat (1:200; Vector Laboratories) secondary antibody, followed by a new washing and an incubation (at 37°C for 2 h) with red streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) rendering red fluorescence for anti-CB₂ receptor. Sections were counter-stained with nuclear stain TOPRO-3-iodide (Molecular Probes) to visualize cell nuclei. To quench endogenous autofluorescence, tissue sections were also treated with 0.5% Sudan Black (Merck, Darmstadt, Germany) in 70% ethanol for 1 min and differentiated with 70% ethanol (Schnell et al., 1999). A Leica TCS SP5 microscope was used for slide observation and photography. Differential visualization of the fluorophores was accomplished through the use of specific filter combinations. Samples were scanned sequentially to avoid any potential for bleed-through of fluorophores.

Statistics

Data were assessed by unpaired Student's *t*-test or one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test, as required.

This article is part of a special subject collection 'Neurodegeneration: from Models to Mechanisms to Therapies', which was launched in a dedicated issue guest edited by Aaron Gitler and James Shorter. See related articles in this collection at <http://dmm.biologists.org/collection/neurodegenerative-disorders>.

Acknowledgements

The authors are indebted to Yolanda Garcia-Movellán for administrative assistance.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Study design: E.d.L., C.P.-D. and J.F.-R. Sample collection and clinical/genetic characterization: J.R.C. Sample analysis: M.F.-T., F.E.-P. and C.R.-C. Data interpretation (including statistical assessment): E.d.L. and J.F.-R. Manuscript draft: J.F.-R. Revised, corrected and approved by all authors.

Funding

This work was supported by grants from Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED; CB06/05/0089), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO; SAF2012/39173 and SAF2015-68580-C2-1-R) and GW Pharmaceuticals. These agencies had no further role in study design, collection, analysis and interpretation of the data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. F.E.-P. is a predoctoral fellow supported by the MINECO (FPI Programme).

References

Al-Chalabi, A. and Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 617-628.

Alvarez, F. J., Lafuente, H., Rey-Santano, M. C., Mielgo, V. E., Gastiasoro, E., Rueda, M., Pertwee, R. G., Castillo, A. I., Romero, J. and Martínez-Orgado, J. (2008). Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr. Res.* **64**, 653-658.

Averill, D. R. Jr (1973). Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **162**, 1045-1051.

Awano, T., Johnson, G. S., Wade, C. M., Katz, M. L., Johnson, G. C., Taylor, J. F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S. et al. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 2794-2799.

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

Bisland, L. G. and Greensmith, L. (2008). The endocannabinoid system in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 2306-2316.

Bisland, L. G., Dick, J. R., Pryce, G., Petrosino, S., Di Marzo, V., Baker, D. and Greensmith, L. (2006). Increasing cannabinoid levels by pharmacological and

RESEARCH ARTICLE

Disease Models & Mechanisms (2017) 10, 551-558 doi:10.1242/dmm.028373

- genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice. *FASEB J.* **20**, 1003-1005.
- Buratti, E. and Baralle, F. E.** (2010). The multiple roles of TDP-43 in pre-mRNA processing and gene expression regulation. *RNA Biol.* **7**, 420-429.
- Coates, J. R. and Winger, F. A.** (2010). Canine degenerative myelopathy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **40**, 929-950.
- Cruts, M., Gijssels, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J. and Van Broeckhoven, C.** (2013). Current insights into the C9orf72 repeat expansion diseases of the FTD/ALS spectrum. *Trends Neurosci.* **36**, 450-459.
- de Lago, E., Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F. and Fernández-Ruiz, J.** (2015). Endocannabinoids and amyotrophic lateral sclerosis. In *Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease* (ed. L. Fattore), pp. 99-124. The Netherlands: Elsevier.
- Espejo-Porras, F., Piscitelli, F., Verde, R., Ramos, J. A., Di Marzo, V., de Lago, E. and Fernández-Ruiz, J.** (2015). Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **10**, 233-244.
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R. M., Ramos, J. A. and Guzmán, M.** (2007). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 39-45.
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J. and Ramos, J. A.** (2015). Endocannabinoids and neurodegenerative disorders: Parkinson's disease, Huntington's chorea, Alzheimer's disease, and others. *Handb. Exp. Pharmacol.* **231**, 233-259.
- Habib, A. A. and Mitsumoto, H.** (2011). Emerging drugs for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **16**, 537-558.
- Hardiman, O., van den Berg, L. H. and Kiernan, M. C.** (2011). Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 639-649.
- Iannotti, F. A., Di Marzo, V. and Petrosino, S.** (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog. Lipid Res.* **62**, 107-128.
- Kim, K., Moore, D. H., Makriyannis, A. and Abood, M. E.** (2006). AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **542**, 100-105.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. and Cleveland, D. W.** (2010). TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R46-R64.
- March, P. A., Coates, J. R., Abyad, R. J., Williams, D. A., O'Brien, D. P., Olby, N. J., Keating, J. H. and Oglesbee, M.** (2009). Degenerative myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. *Vet. Pathol.* **46**, 241-250.
- Mecha, M., Carrillo-Salinas, F. J., Feliú, A., Mestre, L. and Guaza, C.** (2016). Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **166**, 40-55.
- Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J. and de Lago, E.** (2014). Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mice and evaluation of a Sativex[®]-like combination of phytocannabinoids: interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurosci. Ther.* **20**, 809-815.
- Pacher, P. and Mechoulam, R.** (2011). Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? *Prog. Lipid Res.* **50**, 193-211.
- Pirone, A., Cantile, C., Miragliotta, V., Lenzi, C., Giannesi, E. and Cozzi, B.** (2016). Immunohistochemical distribution of the cannabinoid receptor 1 and fatty acid amide hydrolase in the dog claustrum. *J. Chem. Neuroanat.* **74**, 21-27.
- Raman, C., McAllister, S. D., Rizvi, G., Patel, S. G., Moore, D. H. and Abood, M. E.** (2004). Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **5**, 33-39.
- Renton, A. E., Chiò, A. and Traynor, B. J.** (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.* **17**, 17-23.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H.-X. et al.** (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62.
- Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M. R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J. P., Tolón, R. M., Mechoulam, R., Brouillet, E. et al.** (2009). Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* **57**, 1154-1167.
- Schnell, S. A., Staines, W. A. and Wessendorf, M. W.** (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 719-730.
- Shoemaker, J. L., Seely, K. A., Reed, R. L., Crow, J. P. and Prather, P. L.** (2007). The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J. Neurochem.* **101**, 87-98.
- Weydt, P., Hong, S., Witting, A., Möller, T., Stella, N. and Klot, M.** (2005). Cannabinol delays symptom onset in SOD1 (G93A) transgenic mice without affecting survival. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **6**, 182-184.
- Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I. P., Naylor, A., Bountra, C., Banati, R. R. and Anand, P.** (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol.* **6**, 12.

J Neuroimmune Pharmacol (2015) 10:233–244
DOI 10.1007/s11481-015-9602-4

INVITED REVIEW

Changes in the endocannabinoid signaling system in CNS structures of TDP-43 transgenic mice: relevance for a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders

Francisco Espejo-Porras^{1,2,3} · Fabiana Piscitelli⁴ · Roberta Verde⁴ · José A. Ramos^{1,2,3} · Vincenzo Di Marzo⁴ · Eva de Lago^{1,2,3} · Javier Fernández-Ruiz^{1,2,3}

Received: 1 December 2014 / Accepted: 13 March 2015 / Published online: 29 March 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Because of their neuroprotective properties, cannabinoids are being investigated in neurodegenerative disorders, mainly in preclinical studies. These disorders also include amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a degenerative disease produced by the damage of the upper and lower motor neurons leading to muscle denervation, atrophy and paralysis. The studies with cannabinoids in ALS have been conducted exclusively in a transgenic mouse model bearing mutated

forms of human superoxide dismutase-1, the first gene that was identified in relation with ALS. The present study represents the first attempt to investigate the endocannabinoid system in an alternative model, the transgenic mouse model of TAR-DNA binding protein-43 (TDP-43), a protein related to ALS and also to frontotemporal dementia. We used these mice for behavioral and histological characterization at an early symptomatic phase (70–80 days of age) and at a post-symptomatic stage (100–110 days of age). TDP-43 transgenic mice exhibited a worsened rotarod performance at both disease stages. This was accompanied by a loss of motor neurons in the spinal cord (measured by Nissl staining) and by reactive microgliosis (measured by Iba-1 immunostaining) at the post-symptomatic stage. We also detected elevated levels of the CB₂ receptor (measured by qRT-PCR and western blotting) in the spinal cord of these animals. Double-staining studies confirmed that this up-regulation occurs in microglial cells in the post-symptomatic stage. Some trends towards an increase were noted also for the levels of endocannabinoids, which in part correlate with a small reduction of FAAH. Some of these parameters were also analyzed in the cerebral cortex of TDP-43 transgenic mice, but we did not observe any significant change, in agreement with the absence of anomalies in cognitive tests. In conclusion, our data support the idea that the endocannabinoid signaling system, in particular the CB₂ receptor, may serve for the development of a neuroprotective therapy in TDP-43-related disorders. We are presently engaged in pharmacological experiments to investigate this possibility.

Eva de Lago and Javier Fernández-Ruiz shared the senior authorship of this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11481-015-9602-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Eva de Lago
elagofem@med.ucm.es

✉ Javier Fernández-Ruiz
jjfr@med.ucm.es

¹ Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

³ Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

⁴ Endocannabinoid Research Group, Institute of Biomolecular Chemistry, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli, Naples, Italy

CAPÍTULO 2

Evaluar un potencial tratamiento en el modelo murino TDP43 (A315T) mediado por el receptor CB2.

Los resultados reflejados en los tres modelos, y de manera relevante en el ratón transgénico TDP43 (A315T), muestran un incremento del receptor CB₂ en la médula espinal. A partir de este dato, se realizaron diversos experimentos farmacológicos enfocados a este incremento. En el primero de ellos, se administró el cannabinoide sintético WIN 55,212 en el inicio de los síntomas. Este compuesto consiguió retrasar la afección motora que presentan estos ratones y mejorar la supervivencia de las motoneuronas. Debido a que WIN 55,212 es un agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂, se realizó un segundo experimento usando antagonistas de ambos receptores para elucidar por cuál de las vías estaba actuando el compuesto. En los dos casos, el retraso en la afección motora persistió, pero únicamente cuando se bloqueó el receptor CB₂, no se produjo la supervivencia de las motoneuronas. En este experimento se comprobó que los efectos positivos eran producidos mediante la modulación glial a través del receptor CB₂. Un hecho que se repitió en un tercer experimento en el que se usó un agonista completo de dicho receptor, el HU-308.

Los resultados que se concentran en este capítulo se hallan en la siguiente publicación (en revisión para su aceptación):

Espejo-Porras, F., García-Toscano, L., Rodríguez-Cueto, C., Santos-García, I., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J., (2018). Targeting glial CB2 receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice: a model of ALS. *Br. J. Pharmacol.*, (En revisión).

British Journal of Pharmacology



Targeting glial CB2 receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice: a model of ALS

Journal:	<i>British Journal of Pharmacology</i>
Manuscript ID	2017-BJP-1341-RPT-G.R1
Manuscript Type:	Research Paper Themed Issue
Date Submitted by the Author:	14-Feb-2018
Complete List of Authors:	Espejo-Porras, Francisco; Universidad Complutense de Madrid García-Toscano, Laura; Universidad Complutense de Madrid Rodríguez-Cueto, Carmen; Complutense University, Santos-García, Irene; Universidad Complutense de Madrid de Lago, Eva; Universidad Complutense, Bioquímica y Biología Molecular Fernandez-Ruiz, Javier; Complutense University, Biochemistry and Molecular Biology
Major area of pharmacology:	Neurodegeneration/neuroprotection
Cross-cutting area:	Inflammation
Additional area(s):	Cannabinoid

SCHOLARONE™
Manuscripts

British Pharmacological Society

Targeting glial CB₂ receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis

Francisco Espejo-Porras¹⁻³, Laura García-Toscano¹⁻³, Carmen Rodríguez-Cueto¹⁻³, Irene Santos-García¹⁻³, Eva de Lago^{1-3*} and Javier Fernández-Ruiz^{1-3*}

¹Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain; ³Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

*Both authors shared the senior authorship of this study

Running title: Targeting CB₂ receptors in TDP-43 transgenic mice

Correspondence:

Eva de Lago (e-mail: elagofem@med.ucm.es)

Javier Fernández-Ruiz (e-mail: jjfr@med.ucm.es)

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040-Madrid, Spain

Phone number: 34-913941450; Fax number: 34-913941691

Acknowledgements:

Authors are indebted to Yolanda García-Movellán for administrative assistance, and to Henar Suárez for her support and advice with confocal microscopy.

Abstract

Background and purpose. CB₂ receptors up-regulate in reactive microglia in the spinal cord of TDP-43(A315T) transgenic mice, an experimental model of ALS. To determine whether such up-regulation may be pharmacologically exploited, we investigated different treatments modulating the CB₂ receptor function.

Experimental approach. We treated TDP-43(A315T) transgenic mice with the non-selective agonist WIN55,212-2, alone or combined with selective CB₁ or CB₂ antagonists, as well as with the selective CB₂ agonist HU-308, and evaluated their effects on the pathological phenotype.

Key results. We found modest benefits after the treatment with WIN55,212-2 in the rotarod test, Nissl staining of motor neurons, and GFAP and Iba-1 immunostainings in the spinal cord, which were mediated in part by CB₂ activation. The treatment with HU-308 resulted in a significant improvement in the rotarod performance with a complete preservation of Nissl-stained motor neurons in the ventral horn. Reactive astrogliosis labelled with GFAP was also attenuated by HU-308 in the dorsal and ventral horns, in which CB₂ receptors colocalized with this astroglial marker. HU-308 also reduced the elevated Iba-1 immunostaining in the ventral horn of TDP-43(A315T) transgenic mice, but it did not affect such immunoreactivity in the white matter areas, in which CB₂ receptors also colocalized with this microglial marker.

Conclusions and implications. Our study shows an important role for glial CB₂ receptors in limiting the progression of the pathological phenotype in TDP-43(A315T) transgenic mice. Such benefits derived apparently from the activation of CB₂ receptors concentrated in astrocytes and reactive microglia located in spinal dorsal and ventral horns.

Key words: Cannabinoids, CB₂ receptors, astrocytes, reactive microglial cells, amyotrophic lateral sclerosis, TDP-43 (A315T) transgenic mice, spinal cord

Abbreviations

Amyotrophic lateral sclerosis, ALS

Cannabinoid receptor type-1, CB₁

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Uno de los principales retos que debe hacer frente la sociedad del primer mundo en el s. XXI es el auge de las enfermedades neurodegenerativas. En una población cada vez más envejecida en la que cada año se produce el incremento de casos de enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o mismamente la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), se hace imprescindible el desarrollo de estudios de investigación para comprender estas patologías posibilitando la creación de nuevas terapias ante la actual falta de medicamentos útiles.

Al comienzo de esta tesis, los datos existentes acerca del estado del SEC durante la patogénesis de la ELA eran escasos, por ello este trabajo doctoral se ha centrado en el estudio del sistema endocannabinoide (SEC), y más concretamente del receptor CB₂, como una diana terapéutica real para el tratamiento de la ELA (Fernández-Ruiz et al., 2007). Esta hipótesis va acorde a la existencia de las múltiples evidencias sobre considerar a diferentes elementos del SEC como dianas terapéuticas en diversos desórdenes patológicos, aparte de otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Fernández-Ruiz et al., 2010).

Esta tesis se puede dividir en dos bloques o capítulos. El primero de ellos, concentra los trabajos realizados sobre la caracterización del SEC en diferentes modelos de ELA. Y dentro del segundo bloque, se incluye el trabajo farmacológico centrado en la diana CB₂ en ratones transgénicos con la proteína mutada humana TDP43.

Discusión Capítulo 1

Debido a que el estudio del SEC en esta patología nunca ha sido abordado en profundidad ni a nivel clínico, ni preclínico, el primer objetivo marcado ha sido esclarecer posibles cambios del SEC en la patogénesis de la ELA. En este trabajo doctoral se aborda con detalle aspectos no considerados anteriormente en la patología humana usando tejidos corteza motora y médula espinal de pacientes; se describe con detalle la caracterización del SEC en la mielopatía degenerativa canina (MDC), una enfermedad espontánea en los perros con múltiples semejanzas a la ELA; y se describe el sistema endocannabinoide en un modelo murino diferente al SOD1 (G93A), al ratones transgénicos para la proteína TDP43 (A315T), los cuales han abierto una nueva vía para la comprensión de la patología *per se*.

La ELA en la mayoría de los casos se presenta en su forma esporádica (Renton et al., 2014) con un amplio espectro de mecanismos patológicos descritos que de manera directa provocan la muerte de las motoneuronas (Vicic et al., 2014). Existen evidencias de que en la ELA se produce una alteración del sistema inmunitario lo que provocaba la presencia de infiltrados en zonas como la corteza cerebral provocando una inflamación en la región (Kawamata et al., 1992). Este hecho concuerda con la detección de un incremento de la actividad glial dentro del cerebro, tanto en las zonas corticales de la sustancia gris como de la sustancia blanca, como apunta una mayor detección por PET al usar un radioligando específico de glía (Alshikho et al., 2016). E cualquier caso, anteriormente se había observado una presencia astrogliar en zonas de la sustancia blanca (Kushner et al., 1991). La investigación realizada en esta tesis con muestras de pacientes de ELA *post mortem*, es el primer trabajo que muestra en la corteza motora una activación glial de astrocitos y de microglía sin que haya una pérdida de neuronas. Este hecho podría sugerir que la activación glial va precedida de la muerte neuronal. Sin tener un historial clínico completo ni un estudio genético de los pacientes, no se puede eliminar la opción de que haya otras proteínas implicadas en estos casos de MND esporádicos.

Discusión

Respecto a la caracterización del SEC, que no se hayan encontrados cambios en la expresión y en la cuantificación del receptor CB₁ refuerza la idea de que las neuronas de la corteza motora permanecen inalteradas. Y lo mismo para otros elementos del SEC como FAAH o MAGL. En cambio, sí se ha encontrado un aumento de expresión del receptor CB₂. Este incremento se correlaciona con la activación glial encontrada, concretamente debido a la activación astrogliar (y no microglial) como se ha mostrado mediante las colocalizaciones realizadas. También es relevante haber detectado la presencia del receptor CB₂ en las neuronas corticales. Por un lado, porque al no haber muerte neuronal en los pacientes, el incremento de este receptor es consecuencia de la astrogliosis encontrada.

Por otro lado, que el receptor CB₂ sea detectado en neuronas corticales tanto en casos de pacientes como de controles, toma especial relevancia y es otro apoyo a la actual vertiente de aceptación de la presencia de CB₂ en poblaciones neuronales (Atwood et al., 2010). Una controversia que se ha mantenido durante los últimos años incentivada por la falta de anticuerpos específicos (Baek et al., 2013; Marchalant et al., 2014), pero en este caso el uso de un nuevo anticuerpo monoclonal (y los respectivos controles) afianza la detección mostrada. Es decir, que con la mejora de las técnicas y herramientas de detección, no es de extrañar la aparición de más trabajos que posicionan a CB₂ en diferentes poblaciones neuronales (Atwood et al., 2012; García et al., 2015; Savonenko et al., 2015; Sierra et al., 2015).

Además, también es novedosa la detección de CB₂ en las motoneuronas espinales. El único estudio anterior que muestra el receptor CB₂ en muestras de pacientes, fue realizado por Yiangou y colaboradores. En él, se mostraba la presencia de este receptor únicamente en células microgliales en la sustancia blanca de la médula espinal (Yiangou et al., 2006). Esto abre aún más la ventana terapéutica que posibilita la actuación sobre CB₂ no sólo por tener un efecto antiinflamatorio sobre la glía, sino que pudiera tener propiedades neuroprotectoras al actuar directamente sobre las neuronas. Respecto al resto de elementos del SEC en la médula espinal, no se encontraron diferencias en las enzimas FAAH y MAGL, no obstante sí se detectó una disminución del receptor CB₁. Este hecho se correlaciona con un menor número de motoneuronas en los casos afectados de la enfermedad.

Dentro de esta tesis, también se ha podido trabajar con muestras de perros afectados por la Mielopatía degenerativa canina (MDC), una patología pareja a la ELA que surge de forma espontánea en perros en la que también se produce la muerte de las motoneuronas. A día de hoy, se ha podido encontrar varias mutaciones que relacionan a SOD1 como causas de la enfermedad (Awano et al., 2009; Crisp et al., 2013). Y de la misma manera que ocurre con casos de ELA con SOD1 mutada, en la MDC la mutación de SOD1 provoca la aparición de agregados y una marcada respuesta astrogliar (Kobatake et al., 2017). El artículo de investigación presentado en esta tesis con muestras de perros afectados con MDC, también muestra una activación astrocitaria en la sustancia gris de la médula espinal. Una respuesta glial que también abarca a la microglía, ya que también aparece activada en estas regiones de los perros afectados. Esta característica patogénica que solapa con la ELA, surge en paralelo a la muerte de motoneuronas. De esta manera, validamos la MDC como un modelo de ELA esporádico como ya se había sugerido (Awano et al., 2009).

Además, es el primer estudio del SEC en muestras de perros con esta enfermedad, donde sin encontrar cambios en CB₁ a pesar de la muerte de motoneuronas, se muestra una elevada expresión del receptor CB₂ tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína. Una elevación del receptor que se colocaliza con GFAP (marcador de astrocitos) y no con IBA1 (marcador de microglía). Por lo tanto, el incremento de CB₂ se debe a la activación de los astrocitos y no de la microglía. Este hecho podría suponer a CB₂ como una diana en la regulación de la actividad astrocitaria como protección neuronal en el control de la excitotoxicidad, mantenimiento de la homeostasis y el control de especies reactivas de oxígeno. Eventos tóxicos que se encuentran desregulados en la MD y en la ELA de forma común. El resultado sobre el receptor CB₂ en la MDC no sólo constituye una diana terapéutica a nivel veterinario sino que además sirve de ejemplo de modelo

espontáneo de ELA, es decir, los resultados obtenidos en este trabajo toman una doble finalidad, tanto por la parte veterinaria como por la clínica (Coates et al., 2010).

Como se ha comentado anteriormente en la introducción de esta tesis, a la hora de trabajar con modelos animales de ELA, la mayoría de los estudios han utilizado el ratón transgénico SOD1 (G93A), incluido los estudios que se centran en el SEC (Kim et al., 2006; Shoemaker et al., 2007). Con ello, no se podía hacer una investigación de aspectos patológicos de la ELA que no sólo sean debidos a la mutación en SOD1. Así que, la aparición de nuevos modelos como el ratón transgénico TDP43 (A315T) ofrecía nuevos aspectos a estudiar tanto por la parte patológica de la ELA como por el SEC (Tsao et al., 2012). La investigación realizada con ratones mutantes para TDP43, se ha hecho con el uso de uno de los primeros modelos murinos surgidos en los que se manifestaba la aparición de déficits motores y cognitivos (Wegorzewska et al., 2009). Pero no existe modelo perfecto de ninguna enfermedad, y este caso no es una excepción. Los ratones transgénicos TDP43 (A315T) sufren una obstrucción intestinal que provoca una muerte prematura sin que se produzca todo el desarrollo patológico referido a la ELA (Esmaeili et al., 2013). Y aunque haya grupos de investigación que ven a este animal un modelo no válido para el estudio de la ELA (Hatzipetros et al., 2014), otros reflejan que es un modelo válido si se tiene especial cuidado en la alimentación del animal, lo que alarga la vida del mismo y permite que los signos patológicos propios de la ELA aparezcan (Herdewyn et al., 2014).

Así, en el primer trabajo presentado en esta tesis usando este modelo murino se ha realizado la caracterización del SEC en una etapa inicial de la enfermedad y en otra plenamente sintomática (70 y 105 días respectivamente) como reflejan los datos del Rota-Rod y la muerte de motoneuronas. Dicha caracterización también se ha realizado teniendo en cuenta la diferencia sexual. En ambos casos, el estudio de la médula espinal ya mostró cambios significativos en un único elemento del SEC desde la etapa inicial, el receptor CB₂. Es decir, que en ambas edades y ambos géneros, el único cambio relevante del SEC fue el incremento en la expresión del ARN mensajero de este receptor. Este incremento también fue confirmado a nivel proteico en machos y hembras en la edad sintomática. En cambio, no se detectaron cambios ni en el receptor CB₁, ni en la enzima de degradación MAGL. Únicamente se detectó un leve descenso en la enzima FAAH en las hembras en la etapa sintomática. Es posible que la falta de cambios en estas enzimas de degradación sea la causa de no ver cambios en los niveles de los endocannabinoides 2AG y AEA. Aunque no se puede descartar la posibilidad de que las hembras posean menos presencia de FAAH, de una manera u otra pueda influir en que las hembras tengan más esperanza de vida (Bargsted et al., 2017).

Es remarcable que se logró identificar la presencia del receptor CB₂ en células de microglía activada en el asta ventral dejando la posibilidad de que la expresión del receptor también abarcara a otros tipos celulares. El aumento de expresión de este receptor en el animal transgénico contrasta con el incremento de CB₂ en otras patologías neurodegenerativas que cursan con eventos inflamatorios y activación glial.

Hay que añadir que también se exploró la vía de que estos ratones presentaran déficits cognitivos por la relación existente de TDP43 con la demencia frontotemporal (DFT) (Neumann et al., 2006). Pero los resultados obtenidos en la ventana temporal de estudio no reflejaron cambios *in vivo* ni tampoco *in vitro*. Queda la incertidumbre de saber si estos ratones pudieran desarrollar estos esos déficits si no murieran prematuramente por la obstrucción intestinal.

En cualquier caso, los datos obtenidos en esta tesis sobre la caracterización del modelo murino TDP43 (A315T) reflejan daños progresivos a nivel motor hasta la edad de 105 días con la consecuente muerte de motoneuronas y sin que la obstrucción intestinal afectara a los resultados. De esta manera, el modelo con el ratón TDP43 (A315) sí es válido en las primeras fases de la patología motora aunque no sirva para seguir una progresión de la misma. El hecho de tener que trabajar únicamente en una edad temprana de la patología con estos ratones no debe tomarse como algo negativo, ya que precisamente el entender los mecanismos patogénicos en el inicio, y el poder tener resultados farmacológicos positivos desde etapas tempranas

Discusión

posiblemente sea lo más relevante en su traslación a una clínica procurando una atención temprana en los pacientes.

Hasta este punto se han presentado tres artículos de investigación sobre la ELA con tres modelos diferentes de la enfermedad: muestras de pacientes con MND, perros que padecen MDC y el modelo murino con TDP43 (A315T). Patológicamente hablando, todas cursan con una muerte de motoneuronas con mecanismos inflamatorios en los que se ve implicado una activación glial. En el caso de los humanos, incluso se muestra una gliosis presente en la corteza motora que se suma a la ya descrita de la médula espinal de enfermos de ELA (Hall et al., 1995). De manera similar, demostramos que perros afectados por MDC cursan la enfermedad paralelamente a la ELA presentando también esa gliosis en la médula espinal. Una gliosis que a priori, está representada en los ratones TDP43 (A315T) por la microglía, teniendo en cuenta que ha sido detectada en los inicios patológicos y no en etapas tardías como el caso de los pacientes o de los perros con MDC. En cualquier caso, los tres modelos presentan una única alteración del SEC, y es el incremento de expresión del receptor CB₂, el cual se correlaciona con el incremento glial.

Con estos resultados se enfoca el artículo de investigación que estaría dentro del segundo bloque, que es abordar farmacológicamente el incremento del receptor CB₂ en los ratones transgénicos TDP43 (A315T).

Discusión Capítulo 2

Acorde a los resultados obtenidos anteriormente, y más concretamente en el modelo murino TDP43 (A315T), decidimos realizar una serie de experimentos farmacológicos centrando al receptor CB₂ como una potencial diana terapéutica. Hay que remarcar que este es el primer trabajo de investigación farmacológico en el que se usan cannabinoides para el tratamiento de la ELA en un modelo diferente al SOD (G93A). Los tratamientos fueron realizados en un estadio inicial de la patología con el fin de obtener una evolución positiva de la misma.

En primer lugar, escogimos el compuesto sintético WIN 55,212, cuyo perfil farmacológico es un agonismo parcial del receptor CB₂, y también de CB₁. Aunque nuestra principal diana fuese CB₂, no quisimos obviar el hecho de que la activación del receptor CB₁ promueve la neuroprotección de motoneuronas (de Lago et al., 2012). La administración del compuesto WIN 55,212 promovió una menor caída en la respuesta motora de los ratones correlacionada con una mayor supervivencia de las motoneuronas. Asumimos que el efecto neuroprotector de WIN 55,212 es debido a su efecto sobre la activación glial. En un estudio más detallado que en el trabajo anterior, observamos una activación astrocitaria en los animales enfermos, tanto en el asta ventral de la sustancia gris, como en el asta dorsal. Esta activación es un reflejo del daño neuronal que se está produciendo en las motoneuronas que determinan el movimiento (asta ventral), y en las neuronas sensoriales que proyectan al encéfalo en la vía somatosensorial (asta dorsal) (Díaz et al., 2016). En cambio, el marcaje de GFAP se encuentra disminuido cuando se administra WIN 55,212. Además, también apreciamos diferentes patrones en el marcaje de IBA1. La microgliosis presente en el asta ventral en los animales enfermos se ve disminuida con el tratamiento de WIN 55,212 en paralelo a una menor muerte de las motoneuronas. Esta disminución de la activación microglial por la administración del cannabinoide sintético, vuelve a darse en la zona dorsal de la sustancia blanca, donde se localizan los axones aferentes de las vías sensoriales. No obstante, la acción de WIN 55,212 promueve aún más la activación microglial en la zona dorsal de la sustancia blanca, área de los axones eferentes de las vías motoras.

Dos cuestiones surgen de este experimento. La primera, elucidar si WIN 55,212 está provocando los efectos positivos mediante la activación del receptor CB₂ o del receptor CB₁. La segunda, entender cómo es modulada la activación glial de manera que se produce una supervivencia neuronal.

Atendiendo a la primera cuestión se realizaron dos experimentos farmacológicos adicionales. Por un lado, se repite el tratamiento de WIN 55,212, pero añadiendo dos grupos experimentales, cada uno con la

administración previa de un antagonista selectivo: SR141716 para bloquear el receptor CB₁ o AM630 para bloquear el receptor CB₂. Por otro, se escogió la administración del agonista completo del receptor CB₂, el cannabinoide sintético HU308.

Únicamente el antagonista AM630 previno la supervivencia parcial de motoneuronas que ofrecía WIN 55,212. Mientras que la preadministración del bloqueante del receptor CB₁ SR141716 no varió el efector neuroprotector de WIN 55,212. Estos diferentes tratamientos también modularon la activación glial como se refleja de los marcajes de astrocitos (GFAP) y microglía (IBA1). Aunque ambos antagonistas no modificasen la expresión astrocitaria en el asta ventral, sí revertieron parcialmente el efecto de WIN 55,212 en los astrocitos del asta dorsal. En cambio, la microglía del asta ventral sí se vio afectada con los pretratamientos. En el caso del antagonista del receptor CB₁, la reducción de la microgliosis ofrecida por WIN 55,212 se revertió a los niveles del grupo control con la mutación. En cambio, el uso del antagonista del receptor CB₂ incluso exacerbó esta activación microglial. Ambos tratamientos afectaron de la misma manera a la microglía de la sustancia blanca, es decir, el uso de SR141716 no ofreció cambios al tratamiento asilado de WIN 55,212, pero el antagonista del receptor CB₂ incrementó la activación microglial en la zona dorsal y la ventral. Estos resultados ponen de manifiesto que sin negar la capacidad neuroprotectora que tiene el receptor CB₁, es el receptor CB₂ quien tiene la relevancia en cuanto a la modulación glial y el consecuente efecto neuroprotector.

Además, la administración de HU308, agonista completo del receptor CB₂, obtuvo unos resultados similares a los ofrecidos por WIN 55,212; retraso de la afección motora, aumento de número de motoneuronas, y modulación glial (teniendo una disminución glial en las dos astas de la sustancia gris, y una mayor presencia microglial en la zona dorsal de la sustancia blanca).

Para poder entender la modulación de la glía con los diferentes tratamientos, hay que tener presente la importancia en este artículo de investigación de presentar colocalizaciones del receptor CB₂ en astrocitos y también en la microglía de la sustancia blanca, ya que en el anterior artículo (Espejo-Porras et al., 2015) sólo se mostraba CB₂ en microglía de la zona ventral de la sustancia gris.

El hecho de tener una presencia del receptor CB₂ en la glía activada, y de que los diversos tratamientos modulan esa activación en favor de una mejora patogénica son pruebas irrefutables de la relevancia de este receptor. Otros estudios ya se habían centrado en CB₂ para obtener efectos positivos en la ELA, pero hasta esta tesis solamente se había trabajado con el modelo murino SOD1 (G93A) (Kim et al., 2006; Shoemaker et al., 2007).

Los beneficios terapéuticos mostrados acordes a una modulación glial mediante el receptor CB₂, son otra prueba del ya conocido rol de la propia glía en la ELA y en otras enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz, 2009, et al., 2015; de Lago et al., 2015). No obstante, la modulación glial en función de la actividad del receptor CB₂ parece condicionada al tipo celular. La activación de este receptor de los astrocitos disminuye la activación de los mismos en el asta ventral mejorando la supervivencia de las motoneuronas. De igual manera ocurre en el asta dorsal, donde la actividad de los astrocitos en el mantenimiento de la homeostasis puede estar relacionado con un aspecto de la patología que no suele ser abordado, el dolor. Siendo las neuronas del asta dorsal las que controlan las vías somatosensoriales, los astrocitos podrían modular la transmisión del dolor a través de CB₂. Este hecho estaría en la línea de considerar el agonismo del receptor CB₂ un potencial tratamiento para el dolor (Niu et al., 2017). Es cierto que no se debe obviar el efecto del receptor CB₁ a la hora de mitigar el dolor mediante el control de las interneuronas, pero cuando ya una inflamación, el receptor CB₂ toma relevancia (Alkaitis et al., 2010; Li et al., 2017). Evidenciando este hecho se encuentra el trabajo de Racz y colaboradores, en el que muestran una mayor activación glial en ratones knock-out para el receptor CB₂ con signos de hiperalgesia (Racz et al., 2008). No hay que olvidar que el dolor ha estado siempre en un segundo plano en la ELA cuando es una afección muy común entre los pacientes (Hanisch et al., 2015).

Discusión

El grupo de Bargsted y colaboradores describieron la degeneración axonal que sufre la sustancia blanca de estos ratones (Bargsted et al., 2017). En el trabajo que aquí se defiende, se evidencia este hecho indirectamente con la activación microglial de las zonas dorsales y ventrales (las aferentes y sensoriales, y las eferentes y motoras). Respecto a esta activación de la microglía, no queda clara la modulación a través del receptor CB₂. Especialmente en la microglía que se encuentra en el área ventral de la sustancia blanca, la cual se activa con agonistas CB₂, pero aún más cuando se bloquea el receptor. Este efecto dual, puede ser otra consecuencia del propio estado microglial, en el que este tipo celular puede modificar sus características de un estado M1 proinflamatorio al estado M2 antiinflamatorio (Tang et al., 2016).

En cualquier caso, los resultados de este artículo de investigación son un reflejo del actual pensamiento de considerar a la ELA una enfermedad que cursa con una muerte “no autónoma” de las motoneuronas. Es decir, que a pesar de que la muerte de estas neuronas desencadene la patología, éstas no mueren por mecanismos intrínsecos sino que degeneran por afecciones de otro tipo celular, en este caso por la glía (Lee et al., 2016). A partir de este punto, quedaría entender la relación patogénica que se da entre los diferentes tipos celulares. No sólo la interacción de la glía con la neurona, sino la propia interacción glial en cuanto que los astrocitos se pueden activar por la microglía o viceversa (Yamanaka et al., 2008; Liddelow et al., 2017). De la misma manera que habría que abordar cómo el receptor CB₂ modula con exactitud esas interacciones, sea por la regulación glial o por el posible nuevo rol neuronal.

En esta tesis se ha mencionado la existencia de una gran heterogeneidad entre pacientes con ELA. Una heterogeneidad que viene de la multitud de mecanismos tóxicos que están envueltos, lo que llevado a enfocar los diversos tratamientos hacia una sola diana con una escasa o nula efectividad. Por este motivo no se puede negar que sea necesario una mejor estrategia a la hora de enfocar un nuevo tratamiento sin perder de vista consideraciones como el factor genético o el estado del paciente (Beeldman et al., 2016; Morello et al., 2017; van Eijk et al., 2017). Incluso hay casos en los que tratamientos que en la fase pre-clínica han tenido un efecto positivo, luego una vez llevado a la clínica han fallado, como sería el caso del uso de stem cells (Moura et al., 2016). Aparte, se ha puesto de manifiesto que el SEC es una potencial diana terapéutica para la ELA, de la misma manera que lo es para otras enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz, 2009, et al 2015). Este manuscrito en una vía de unión entre la necesidad de encontrar nuevas dianas farmacológicas para la ELA, y mostrar al SEC como una posible solución al problema. Además, deja patente que dentro de la patología, es la glía quien asume el rol patogénico como evidenciamos en diversos modelos de la enfermedad (esporádicos y transgénicos). Y con ello, es el receptor CB₂ quien toma especial relevancia como modulador de esa glía, mostrando que la vía de actuación sobre este receptor supone una vía real para el tratamiento de la ELA.

CONCLUSIONES
/
CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se obtienen del Capítulo 1 son:

- 1.-** Pacientes con MND, perros con MDC y ratones transgénicos TDP43 (A315T) son modelos válidos de ELA ya que presentan una muerte de motoneuronas en las astas ventrales de la médula espinal.
- 2.-** La glía está implicada de manera directa en la patogénesis de los diversos modelos en un proceso de muerte celular no autónoma.
- 3.-** El único cambio que se produce en el SEC es el incremento del receptor CB₂.
- 4.-** El receptor CB₂ se encuentra implicado en la respuesta glial.

Las conclusiones que se obtienen del Capítulo 2 son:

- 5.-** La activación del receptor CB₂ permite una mayor supervivencia de motoneuronas de los ratones transgénicos TDP43 (A315T).
- 6.-** La modulación glial del receptor CB₂ puede tener un papel diferente dependiendo del tipo celular en el que se encuentre.

Se puede concluir que:

El receptor CB₂ es una diana terapéutica real en la patología de la ELA debido a que su activación permite un retraso de los déficits motores y una supervivencia neuronal.

CONCLUSIONS

The conclusions obtained from **Chapter 1** are:

- 1.-** Patients with MND, dogs with MDC and transgenic mice TDP43 (A315T) are valid models of ALS since they present a death of motor neurons in the ventral spines of the spinal cord.
- 2.-** Glia is directly involved in the pathogenesis of the diverse models in a non-autonomous cell death process.
- 3.-** The only change that occurs in the ECS is the increase of the CB₂ receptor.
- 4.-** The CB₂ receptor is involved in the glial response.

The conclusions obtained from **Chapter 2** are:

- 5.-** The activation of the CB₂ receptor allows a greater survival of motor neurons of the transgenic mice TDP43 (A315T).
- 6.-** The glial modulation of the CB₂ receptor can have a different role depending on the cell type in which it is.

It can be concluded that:

The CB₂ receptor is a real therapeutic target in the pathology of ALS because its activation allows a delay in motor deficits and neuronal survival.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Tanaka, M., Akimoto, M., Nakamura, K., Takahashi, F., Kondo, K., Yoshino, H., Abe, K., Aoki, M., Tsuji, S., Itoyama, Y., Sobue, G., Togo, M., Hamada, C., Sasaki, H., Yabe, I., Doi, S., Warita, H., Imai, T., Ito, H., Fukuchi, M., Osumi, E., Wada, M., Nakano, I., Morita, M., Ogata, K., Maruki, Y., Ito, K., Kano, O., Yamazaki, M., Takahashi, Y., Ishiura, H., Ogino, M., Koike, R., Ishida, C., Uchiyama, T., Mizoguchi, K., Obi, T., Watanabe, H., Atsuta, N., Aiba, I., Taniguchi, A., Sawada, H., Hazama, T., Fujimura, H., Kusaka, H., Kunieda, T., Kikuchi, H., Matsuo, H., Ueyama, H., Uekawa, K., Tanaka, M., Akimoto, M., Ueda, M., Murakami, A., Sumii, R., Kudou, T., Nakamura, K., Morimoto, K., Yoneoka, T., Hirai, M., Sasaki, K., Terai, H., Natori, T., Matsui, H., Kotani, K., Yoshida, K., Iwasaki, T., Takahashi, F., Kondo, K., Yoshino, H. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.*, **16**(7), 505-512.
- Abood, M.E., Rizvi, G., Sallapudi, N., McAllister, S.D. (2001). Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.*, **309**(3), 197-201.
- Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal. Chem.*, **406**(29), 7549-60.
- Al-Chalabi, A., Hardiman, O. (2013). The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat. Rev. Neurol.*, **9**(11), 617-28.
- Alkaitis, M.S., Solorzano, C., Landry, R.P., Piomelli, D., DeLeo, J.A., Romero-Sandoval, E.A. (2010). Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS One*, **5**(5), e10891.
- Al-Sarraj, S., King, A., Troakes, C., Smith, B., Maekawa, S., Bodi, I., Rogelj, B., Al-Chalabi, A., Hortobágyi, T., Shaw, C.E. (2011). p62 positive, TDP-43 negative, neuronal cytoplasmic and intranuclear inclusions in the cerebellum and hippocampus define the pathology of C9orf72-linked FTLD and MND/ALS. *Acta Neuropathol.*, **122**(6), 691-702.
- Alshikho, M.J., Zürcher, N.R., Loggia, M.L., Cernasov, P., Chonde, D.B., Izquierdo Garcia, D., Yasek, J.E., Akeju, O., Catana, C., Rosen, B.R., Cudkowicz, M.E., Hooker, J.M., Atassi, N. (2016). Glial activation colocalizes with structural abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, **87**(24), 2554-2561.
- Alt, K.W., Burger, J., Simons, A., Schoen, W., Grupe, G., Hummel, S., Grosskopf, B., Vache, W., Téllez, C.B., Fischerg, C.H., Möller-Wieringh, S., Shrestha, S.S., Pichler, S.L., von den Driesch, A. (2003) Climbing into the past: first Himalayan mummies discovered in Nepal. *Journal of Archaeological Science*, **30**, 1529–1535.
- Amadio, S., Apolloni, S., D'Ambrosi, N., Volonté, C. (2011). Purinergic signalling at the plasma membrane: a multipurpose and multidirectional mode to deal with amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. *J. Neurochem.*, **116**(5), 796-805.

Referencias

- Aman, P., Panagopoulos, I., Lassen, C., Fioretos, T., Mencinger, M., Toresson, H., Höglund, M., Forster, A., Rabbitts, T.H., Ron, D., Mandahl, N., Mitelman, F. (1996). Expression patterns of the human sarcoma-associated genes FUS and EWS and the genomic structure of FUS. *Genomics*, **37**(1), 1-8.
- Amtmann, D., Weydt, P., Johnson, K. L., Jensen, M. P., Carter, G. T. (2014). Survey of cannabis use in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hosp. Palliat. Care*, **21**(2), 95-10.
- Anavi-Goffer, S., Baillie, G., Irving, A.J., Gertsch, J., Greig, I.R., Pertwee, R.G., Ross, R.A. (2012). Modulation of L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling by cannabinoids. *J. Biol. Chem.*, **287**(1), 91-104.
- Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, **532**(7598), 195-200.
- Andersson, M.K., Ståhlberg, A., Arvidsson, Y., Olofsson, A., Semb, H., Stenman, G., Nilsson, O., Aman, P. (2008). The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol.*, **9**, 37.
- Andre, C.M., Hausman, J.F., Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant. Sci.*, **7**, 19.
- Andrus, P.K., Fleck, T.J., Gurney, M.E., Hall, E.D. (1998). Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.*, **71**, 2041-2048.
- Apolloni, S., Amadio, S., Parisi, C., Matteucci, A., Potenza, R.L., Armida, M., Popoli, P., D'Ambrosi, N., Volonté, C. (2014). Spinal cord pathology is ameliorated by P2X7 antagonism in a SOD1-mutant mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dis. Model. Mech.*, **7**(9), 1101-9.
- Aran, F. A. (1848). Research on an as yet undescribed disease of the muscular system (progressive muscular atrophy). *Arch. Gen. Med.*, **24**, 15-35.
- Armon, C. (2007). Sports and trauma in amyotrophic lateral sclerosis revisited. *J. Neurol. Sci.*, **262**(1-2), 45-53.
- Armon, C. (2009). SOD1 A4V familial ALS in North America: can understanding the past lead to a better future? *Neurology*, **72**(19), 1628-9.
- Arnold, E. S., Ling, S.-C., Huelga, S. C., Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz H.B., McAlonis-Downes M., Platoshyn O., Parone P.A., Da Cruz S., Clutario K.M., Swing D., Tessarollo L., Marsala M., Shaw C.E., Yeo G.W., Cleveland, D. W. (2013). ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(8), 736-45.
- Aronica, E., Baas, F., Iyer, A., ten Asbroek, A.L., Morello, G., Cavallaro, S. (2015). Molecular classification of amyotrophic lateral sclerosis by unsupervised clustering of gene expression in motor cortex. *Neurobiol. Dis.*, **74**, 359-76.
- Ash, P.E., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.L., DeJesus-Hernandez, M., van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W. 3rd, Rademakers, R., Boylan, K.B., Dickson, D.W., Petrucelli, L. (2013). Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron*, **77**(4), 639-46.
- Ashton, J.C., Glass, M. (2006). The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.*, **5**(2), 73-80.

- Aso, E., Ferrer, I. (2016). CB2 Cannabinoid Receptor As Potential Target against Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.*, **10**, 243.
- Atwood, B.K., Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.*, **160**(3), 467-79.
- Atwood, B.K., Straiker, A., Mackie, K. (2012). CB2 cannabinoid receptors inhibit synaptic transmission when expressed in cultured autaptic neurons. *Neuropharmacology*, **63**(4), 514-23.
- Averill, D. R. Jr. (1973). Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **162**, 1045-1051.
- Awano, T., Johnson, G.S., Wade, C.M., Katz, M.L., Johnson, G.C., Taylor, J.F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P.A., Olby, N.J., Shelton, G.D., Khan, S., O'Brien, D.P., Lindblad-Toh, K., Coates, J.R. (2009). Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerativemyelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 2794-2799.
- Ayala, Y.M., De Conti, L., Avendaño-Vázquez, S.E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., Tollervey, J., Ule, J., Baralle, M., Buratti, E., Baralle, F.E. (2011). TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.*, **30**(2), 277-88.
- Ayala, Y. M., Pantano, S., Ambrogio, A. D., Buratti, E., Brindisi, A., Marchetti, C., Baralle, F. E. (2005). Human, Drosophila, and C. elegans TDP43 : Nucleic Acid Binding Properties and Splicing Regulatory Function. *J. Mol. Biol.*, **348**, 575–588.
- Baborie, A., Griffiths, T.D., Jaros, E., Perry, R., McKeith, I.G., Burn, D.J., Masuda-Suzukake, M., Hasegawa, M., Rollinson, S., Pickering-Brown, S., Robinson, A.C., Davidson, Y.S., Mann, D.M. (2015). Accumulation of dipeptide repeat proteins predates that of TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration associated with hexanucleotide repeat expansions in C9ORF72 gene. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **41**(5), 601-12.
- Baek, J.H., Darlington, C.L., Smith, P.F., Ashton, J.C. (2013). Antibody testing for brain immunohistochemistry: brain immunolabeling for the cannabinoid CB₂ receptor. *J. Neurosci. Methods*, **216**(2), 87-95.
- Baek, S.H., Kim, Y.O., Kwag, J.S., Choi, K.E., Jung, W.Y., Han, D.S. (1998). Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Arch. Pharm. Res.* **21**(3), 353-6.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L., Hiley, C.R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **27**(1), 1-4.
- Bargsted, L., Medinas, D.B., Martínez Traub, F., Rozas, P., Muñoz, N., Nassif, M., Jerez, C., Catenaccio, A., Court, F.A., Hetz, C., Matus, S. (2017). Disulfide cross-linked multimers of TDP-43 and spinal motoneuron loss in a TDP-43A315T ALS/FTD mouse model. *Sci. Rep.*, **7**(1), 14266.
- Barmada, S.J., Serio, A., Arjun, A., Bilican, B., Daub, A., Ando, D.M., Tsvetkov, A., Pleiss, M., Li, X., Peisach, D., Shaw, C., Chandran, S., Finkbeiner, S. (2014). Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat. Chem. Biol.*, **10**(8), 677-85.

Referencias

- Bash, R., Rubovitch, V., Gafni, M., Sarne, Y. (2003). The stimulatory effect of cannabinoids on calcium uptake is mediated by Gs GTP-binding proteins and cAMP formation. *Neurosignals*, **12**(1):39-44.
- Bátkai, S., Osei-Hyiaman, D., Pan, H., El-Assal, O., Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Hong, F., Harvey-White, J., Jafri, A., Haskó, G., Huffman, J.W., Gao, B., Kunos, G., Pacher, P. (2007). Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury. *FASEB J.*, **21**(8), 1788-800.
- Battistini, S., Ricci, C., Giannini, F., Calzavara, S., Greco, G., Del Corona, A., Mancuso, M., Battistini, N., Siciliano, G., Carrera, P. (2010). G41S SOD1 mutation: A common ancestor for six ALS Italian families with an aggressive phenotype. *Amyotroph Lateral Scler.* **11**(1-2), 210-5.
- Beeldman, E., Raaphorst, J., Klein Twennaar, M., de Visser, M., Schmand, B.A., de Haan, R.J. (2016). The cognitive profile of ALS: a systematic review and meta-analysis update. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **87**(6), 611-9.
- Becker, L.A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D.A., Jafar-Nejad, P., Messing, J., Kim, H.J., Soriano, A., Auburger, G., Pulst, S.M., Taylor, J.P., Rigo, F., Gitler, A.D. (2017). Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature*, **544**(7650), 367-371.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.*, **271**(5 Pt 1), C1424-37.
- Belsh, JM. (2000). ALS diagnostic criteria of El Escorial Revisited: do they meet the needs of clinicians as well as researchers? *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.*, **1** Suppl 1:S57-60.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., Hebert-Chatelain, E., Mülle, C., Ortega-Gutiérrez, S., Martín-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaouloff, F., López-Rodríguez, M.L., Grandes, P., Rossignol, R., Marsicano, G. (2012). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.*, **15**(4), 558-64.
- Benajiba, L., Ber, I. Le, Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., Brice, A. (2009). TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Annals of Neurology*, **65**, 470-474.
- Bendotti, C., Tortarolo, M., Suchak, S.K., Calvaresi, N., Carvelli, L., Bastone, A., Rizzi, M., Rattray, M., Mennini, T. (2001). Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J. Neurochem.*, **79**(4), 737-46.
- Benkler, C., Ben-Zur, T., Barhum, Y., Offen, D. (2013). Altered astrocytic response to activation in SOD1 (G93A) mice and its implications on amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Glia*, **61**(3), 312-26.
- Benninger, F., Glat, M.J., Offen, D., Steiner, I. (2017). Glial fibrillary acidic protein as a marker of astrocytic activation in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Clin. Neurosci.*, **26**, 75-8.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.*, **330**(9), 585-91.
- Berry, J.D., Shefner, J.M., Conwit, R., Schoenfeld, D., Keroack, M., Felsenstein, D., Krivickas, L., David, W.S., Vriesendorp, F., Pestronk, A., Caress, J.B., Katz, J., Simpson, E., Rosenfeld, J., Pascuzzi, R., Glass, J., Reznia, K., Rothstein, J.D., Greenblatt, D.J., Cudkovicz, M.E. (2013). Design and initial results of a multi-phase randomized trial of ceftriaxone in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, **8**(4), e61177.

- Bichsel, P., Vandeveld, M., Lang, J., Kull-Hächler, S. (1983). Degenerative myelopathy in a family of Siberian Husky dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **183**(9), 998-1000.
- Bilsland, L.G., Dick, J.R., Pryce, G., Petrosino, S., Di Marzo, V., Baker, D., Greensmith, L. (2006). Increasing cannabinoid levels by pharmacological and genetic manipulation delay disease progression in SOD1 mice. *FASEB J.*, **20**(7), 1003-5.
- Bíró, T., Tóth, B.I., Haskó, G., Paus, R., Pacher, P. (2009). The endocannabinoid system of the skin in health and disease: novel perspectives and therapeutic opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.*, **30**(8), 411-20.
- Bisogno, T., Berrendero, F., Ambrosino, G., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., Di Marzo, V. (1999). Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**(2), 377-80.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br. J. Pharmacol.* **134**(4), 845-52.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., Doherty, P. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell. Biol.*, **163**(3), 463-8.
- Blanchard, D.K., Newton, C., Klein, T.W., Stewart, W.E. 2nd, Friedman, H. (1986). In vitro and in vivo suppressive effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on interferon production by murine spleen cells. *Int. J. Immunopharmacol.*, **8**(7), 819-24.
- Blankman, J.L., Simon, G.M., Cravatt, B.F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.*, **14**(12), 1347-56.
- Bonifacino, T., Cattaneo, L., Gallia, E., Puliti, A., Melone, M., Provenzano, F., Bossi, S., Musante, I., Usai, C., Conti, F., Bonanno, G., Milanese, M. (2017). In-vivo effects of knocking-down metabotropic glutamate receptor 5 in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, **123**, 433-445.
- Borrelli, F., Pagano, E., Romano, B., Panzera, S., Maiello, F., Coppola, D., De Petrocellis, L., Buono, L., Orlando, P., Izzo, A.A. (2014). Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychotropic cannabinoid. *Carcinogenesis*, **35**(12), 2787-97.
- Bosier, B., Bellocchio, L., Metna-Laurent, M., Soria-Gomez, E., Matias, I., Hebert-Chatelain, E., Cannich, A., Maitre, M., Leste-Lasserre, T., Cardinal, P., Mendizabal-Zubiaga, J., Canduela, M.J., Reguero, L., Hermans, E., Grandes, P., Cota, D., Marsicano, G. (2013). Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol. Metab.*, **2**(4), 393-404.
- Bosier, B., Muccioli, G.G., Hermans, E., Lambert, D.M. (2010). Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem. Pharmacol.*, **80**(1), 1-12.
- Boston-Howes, W., Gibb, S.L., Williams, E.O., Pasinelli, P., Brown Jr., R.H., Trotti, D. (2006). Caspase-3 cleaves and inactivates the glutamate transporter EAAT2. *J. Biol. Chem.*, **281**, 14076-14084.
- Bradley, W. G. (1995). A phase I/II study of recombinant brain-derived neurotrophic in patients with ALS. *Ann. Neurol.*, **38**, 971.

Referencias

- Bradley, W.G., Miller, R.X., Levine, T.D., Stommel, E.W., Cox, P.A. (2017). Studies of Environmental Risk Factors in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and a Phase I Clinical Trial of L-Serine. *Neurotox. Res.*, **33**(1), 192-198.
- Braund, K.G., Vandeveld, M. (1978). German Shepherd dog myelopathy. A morphological and morphometric study. *Am. J. Vet. Res.* **39**(8), 1309-15.
- Brierley, D.I., Samuels, J., Duncan, M., Whalley, B.J., Williams, C.M. (2016). Cannabigerol is a novel, well-tolerated appetite stimulant in pre-satiated rats. *Psychopharmacology*, **233**(19-20), 3603-13.
- Brooks, B.R. (1994). El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci.*, **124**, 96-107.
- Brown A.J. (2005). Novel cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **152**(5), 567-75.
- Browne, S.E., Bowling, A.C., Baik, M.J., Gurney, M., Brown, R.H. Jr., Beal, M.F. (1998). Metabolic dysfunction in familial, but not sporadic, amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.*, **71**(1), 281-7.
- Brownjohn, P.W., Ashton, J.C. (2012). Spinal cannabinoid CB2 receptors as a target for neuropathic pain: an investigation using chronic constriction injury. *Neuroscience*, **203**, 180-93.
- Brujin, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, **281**(5384), 1851-4.
- Brusco, A., Tagliaferro, P.A., Saez, T., Onaivi, E.S. (2008). Ultrastructural localization of neuronal brain CB2 cannabinoid receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1139**, 450-7.
- Bunton-Stasyshyn, R.K., Saccon, R.A., Fratta, P., Fisher, E.M. (2015). SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes. *Neuroscientist.*, **21**(5), 519-29.
- Buratti, E., & Baralle, F. E. (2001a). Characterization and Functional Implications of the RNA Binding Properties of Nuclear Factor TDP-43, a Novel Splicing Regulator of CFTR Exon 9. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36337–36343.
- Buratti, E., Do, T., Zuccato, E., Pagani, F., Romano, M., & Baralle, F. E. (2001b). Nuclear Factor TDP-43 and SR Proteins Promote in vitro and in vivo CFTR exon 9 skipping. *EMBO J.*, **20**, 1774–1784.
- Burrell, J.R., Kiernan, M.C., Vucic, S., Hodges, J.R. (2011). Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain*, **134**(Pt 9), 2582-94.
- Burstein, S. (2005). PPAR-gamma: a nuclear receptor with affinity for cannabinoids. *Life Sci.*, **77**(14), 1674-84.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J.D., Ransohoff, R.M., Gygi, S.P., Antel, J.P., Weiner, H.L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.*, **17**(1), 131-43.
- Calvio, C., Neubauer, G., Mann, M., Lamond, A.I. (1995). Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry. *RNA*, **1**(7), 724-33.

- Campora, L., Miragliotta, V., Ricci, E., Cristino, L., Di Marzo, V., Albanese, F., Federica, Della Valle, M., Abramo, F. (2012). Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Am. J. Vet. Res.*, **73**(7), 988-95.
- Carletti, F., Gambino, G., Rizzo, V., Ferraro, G., Sardo, P. (2017). Neuronal nitric oxide synthase is involved in CB/TRPV1 signalling: Focus on control of hippocampal hyperexcitability. *Epilepsy Res.*, **138**, 18-25.
- Carlisle, S.J., Marciano-Cabral, F., Staab, A., Ludwick, C., Cabral, G. (2002). Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.*, **2**(1), 69-82.
- Carlsson, L., Nyström, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.*, **115**(3), 465-83.
- Carmo-Silva, S., Nobrega, C., Pereira de Almeida, L., Cavadas, C. (2017). Unraveling the Role of Ataxin-2 in Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**(4), 309-318.
- Carri, M.T., Battistoni, A., Polizio, F., Desideri, A., Rotilio, G. (1994). Impaired copper binding by the H46R mutant of human Cu,Zn superoxide dismutase, involved in amyotrophic lateral sclerosis. *FEBS Lett.*, **356**, 314-316.
- Carter, G. T., Abood, M. E., Aggarwal, S. K., Weiss, M. D., (2010). Cannabis and Amyotrophic Lateral Sclerosis: a Call for Clinical Trials. *Am. J. Hosp. Palliat. Care.*, **27**(5):347-5
- Cascio, M.G., Gauson, L.A., Stevenson, L.A., Ross, R.A., Pertwee, R.G. (2010). Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT1A receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **159**(1), 129-41.
- Cascio, M.G., Zamberletti, E., Marini, P., Parolaro, D., Pertwee, R.G. (2015). The phytocannabinoid, Δ^9 -tetrahydrocannabivarin, can act through 5-HT_{1A} receptors to produce antipsychotic effects. *Br. J. Pharmacol.* **172**(5), 1305-18.
- Cassina, P., Cassina, A., Pehar, M., Castellanos, R., Gandelman, M., de León, A., Robinson, K.M., Mason, R.P., Beckman, J.S., Barbeito, L., Radi, R. (2008). Mitochondrial dysfunction in SOD1G93A-bearing astrocytes promotes motor neuron degeneration: prevention by mitochondrial-targeted antioxidants. *J. Neurosci.*, **28**(16), 4115-22.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**(6653), 816-24.
- Ceprián, M., Jiménez-Sánchez, L., Vargas, C., Barata, L., Hind, W., Martínez-Orgado, J. (2017). Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery in a neonatal rat model of arterial ischemic stroke. *Neuropharmacology*, **116**, 151-159.
- Chanson, J., Echaniz-laguna, A., Vogel, T. (2010). TDP43-Positive Intraneuronal Inclusions in a Patient with Motor Neuron Disease and Parkinson's Disease. *Neurodegenerative Dis.*, **7**, 260-264.
- Charcot, J.M., & Joffroy, A. (1869). Deux cas d'atrophie musculaire progressive: avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch. Physiol. Norm. Pathol.*, **2**, 744-760.
- Charcot, J.M. (1865). Sclérose des cordons latéraux de la moelle épinière chez une femme hystérique atteinte de contracture permanente des quatre membres. *Bull Soc Med.* 24-35.
- Charcot, J.M. (1874) Amyotrophies spinales deuteropathiques sclérose latérale amyotrophique. *Oeuvres Complètes*. Paris: Bureaux du Progrès Médical, **2**, 234-248.

Referencias

- Chen, J., Hou, C., Chen, X., Wang, D., Yang, P., He, X., Zhou, J., Li, H. (2016). Protective effect of cannabidiol on hydrogen peroxide-induced apoptosis, inflammation and oxidative stress in nucleus pulposus cells. *Mol. Med. Rep.*, **14**(3), 2321-7.
- Chen, X.P., Yang, W., Fan, Y., Luo, J.S., Hong, K., Wang, Z., Yan, J.F., Chen, X., Lu, J.X., Benovic, J.L., Zhou, N.M. (2010). Structural determinants in the second intracellular loop of the human cannabinoid CB1 receptor mediate selective coupling to G(s) and G(i). *Br. J. Pharmacol.*, **161**(8), 1817-34.
- Chiarlone, A., Bellocchio, L., Blázquez, C., Resel, E., Soria-Gómez, E., Cannich, A., Ferrero, J.J., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Sánchez-Prieto, J., Lutz, B., Fernández-Ruiz, J., Galve-Roperh, I., Guzmán, M. (2014). A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **111**(22), 8257-62.
- Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S., Gertsch, J. (2012). Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J. Biol. Chem.*, **287**(41), 34660-82.
- Chiò, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R., Mora, G. (2005). Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain*, **128**(Pt 3), 472-6.
- Chiò, A., Logroscino, G., Traynor, B.J., Collins, J., Simeone, J.C., Goldstein, L.A., White, L.A. (2013). Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature. *Neuroepidemiology*, **41**(2), 118-30.
- Chiurchiù, V., Battistini, L., Maccarrone, M. (2015). Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology*, **144**(3), 352-364.
- Cicero, C.E., Mostile, G., Vasta, R., Rapisarda, V., Signorelli, S.S., Ferrante, M., Zappia, M., Nicoletti, A. (2017). Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environ. Res.*, **159**, 82-94.
- Coates, J.R., March, P.A., Oglesbee, M., Ruau, C.G., Olby, N.J., Berghaus, R.D., O'Brien, D.P., Keating, J.H., Johnson, G.S., Williams, D.A. (2007). Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **21**(6), 1323-31.
- Clarke, L.E., Barres, B.A. (2013). Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**(5), 311-21.
- Clarke, R.C. (2007). Traditional Cannabis cultivation in Darchula District, Nepal: seed, resin and textiles. *Journal of Industrial Hemp.*, **12**, 19-42.
- Clendinning, J. (1943). Observations on the medicinal properties of the Cannabis Sativa of India. *Med. Chir. Trans.*, **26**, 188-210.
- Cleveland, D.W., Rothstein, J.D. (2001). From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**(11), 806-19.
- Coates, J.R., Winger F.A. (2010). Canine degenerative myelopathy. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **40**(5), 929-50.
- Colangelo, A.M., Alberghina, L., Papa, M. (2014). Astroglial as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.*, **565**, 59-64.
- Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., Giagnoni, G. (2002). Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **135**(1), 181-7.
- Cooper-Knock, J., Hewitt, C., Highley, J.R., Brockington, A., Milano, A., Man, S., Martindale, J., Hartley, J., Walsh, T., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Fox, M., Bury, J., Mok, K., McDermott, C.J., Traynor, B.J., Kirby, J., Wharton, S.B., Ince, P.G., Hardy, J., Shaw, P.J. (2012). Clinico-pathological

- features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain*, **135**(Pt 3), 751-64.
- Correia, A.S., Patel, P., Dutta, K., Julien, J.P. (2015). Inflammation Induces TDP-43 Mislocalization and Aggregation. *PLoS One*. **10**(10), e0140248.
- Cortés-Vicente, E., Pradas, J., Marín-Lahoz, J., De Luna, N., Clarimón, J., Turon-Sans, J., Gelpí, E., Díaz-Manera, J., Illa, I., Rojas-García, R. (2017). Degeneration Early diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: pros and cons of current clinical diagnostic criteria. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.*, **18**(5-6):333-340.
- Costa, B. (2007). On the pharmacological properties of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem. Biodivers.*, **4**(8), 1664-77.
- Costessi, L., Porro, F., Iaconcig, A., Muro, A.F. (2014). TDP-43 regulates β -adducin (Add2) transcript stability. *RNA Biol.*, **11**(10), 1280-90.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, **384**(6604), 83-87.
- Crisp, M.J., Beckett, J., Coates, J.R., Miller, T.M. (2013). Canine degenerative myelopathy: biochemical characterization of superoxide dismutase 1 in the first naturally occurring non-human amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp. Neurol.*, **248**, 1-9.
- Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, **139**(4), 1405-15.
- Cruveilhier, J. (1852). Sur la paralysie musculaire, progressive, atrophique. *Bull. Acad. Med.*, **18**, 490-502, 546-583.
- Cudkowicz, M., Bozik, M.E., Ingersoll, E.W., Miller, R., Mitsumoto, H., Shefner, J., Moore, D.H., Schoenfeld, D., Mather, J.L., Archibald, D., Sullivan, M., Amburgey, C., Moritz, J., Gribkoff, V.K. (2011). The effects of dextramipexole (KNS-760704) in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.*, **17**(12), 1652-6.
- Cudkowicz, M.E., Shefner, J.M., Schoenfeld, D.A., Zhang, H., Andreasson, K.I., Rothstein, J.D., Drachman, D.B. (2006). Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **60**(1), 22-31.
- Dafinca, R., Scaber, J., Ababneh, N., Lalic, T., Weir, G., Christian, H., Vowles, J., Douglas, A.G., Fletcher-Jones, A., Browne, C., Nakanishi, M., Turner, M.R., Wade-Martins, R., Cowley, S.A., Talbot, K. (2016). C9orf72 Hexanucleotide Expansions Are Associated with Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Stress Granule Formation in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons from Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Stem Cells*, **34**(8), 2063-78.
- Dal Canto, M.C., Gurney, M.E., (1995). Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.*, **676**, 25-40.
- de Carvalho, M., Dengler, R., Eisen, A., England, J. D., Kaji, R., Kimura, J., Mils, K., Mitsumoto, H., Nodera, H., Shefner, J., Swash, M. (2008). Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clinical Neurophysiology*, **119**, 497-503.
- de Carvalho, M., Pinto, S., Costa, J., Evangelista, T., Ohana, B., Pinto, A. (2010). A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral. Scler.*, **11**(5), 456-60.
- De Filippis, D., Esposito, G., Cirillo, C., Cipriano, M., De Winter, B.Y., Scuderi, C., Sarnelli, G.,

Referencias

- Cuomo, R., Steardo, L., De Man, J.G., Iuvone, T. (2011). Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One*, **6**(12), e28159.
- de Lago, E., Moreno-Martet, M., Cabranes, A., Ramos, J.A., Fernández-Ruiz, J. (2012). Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology*, **62**, 2299-2308.
- de Lago, E., Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J. (2015). Endocannabinoids and amyotrophic lateral sclerosis. In *Cannabinoids in Neurologic and Mental Disease* (Fattore L, Ed.) Elsevier, The Netherlands, pp. 99-124.
- De Petrocellis, L., Nabissi, M., Santoni, G., Ligresti, A. (2017). Actions and Regulation of Ionotropic Cannabinoid Receptors. *Adv. Pharmacol.*, **80**, 249-289.
- Deiana, S., Watanabe, A., Yamasaki, Y., Amada, N., Arthur, M., Fleming, S., Woodcock, H., Dorward, P., Pigliacampo, B., Close, S., Platt, B., Riedel, G. (2012). Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behaviour. *Psychopharmacology*, **219**(3), 859-73.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.Y., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Miller, B.L., Dickson, D.W., Boylan, K.B., Graff-Radford, N.R., Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, **72**(2), 245-56.
- Deng, H.X., Chen, W., Hong, S.T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., Jiang, H., Hirano, M., Rampersaud, E., Jansen, G.H., Donkervoort, S., Bigio, E.H., Brooks, B.R., Ajroud, K., Sufit, R.L., Haines, J.L., Mugnaini, E., Pericak-Vance, M.A., Siddique, T. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature*, **477**(7363), 211-5.
- Deng, H.X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H.E., Ahmed, A., Roses, A.D., Hallewell, R.A., Pericak-Vance, M.A., Siddique, T. (1993). Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, **261**, 1047-51.
- Devane, W. A., Dysarz F. A. 3rd, Johnson M. R., Melvin L. S., Howlett A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**(5090), 1946-9.
- Dewey, W. L. (1986). Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **38**, 151-178.
- Diaz, E., Morales, H. (2016). Spinal cord anatomy and clinical syndromes. *Semin, Ultrasound, CT MR*, **37**, 360-371.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**(16), 10819-24.
- Docagne, F., Muñetón, V., Clemente, D., Ali, C., Loria, F., Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Vivien, D., Guaza, C. (2007). Excitotoxicity in a chronic model of multiple

- sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol. Cell Neurosci.*, **34**(4), 551-61.
- Domschke, K., Dannlowski, U., Ohrmann, P., Lawford, B., Bauer, J., Kugel, H., Heindel, W., Young, R., Morris, P., Arolt, V., Deckert, J., Suslow, T., Baune, B.T. (2008). Cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene: impact on antidepressant treatment response and emotion processing in major depression. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **18**(10), 751-9.
- Donnelly, C.J., Zhang, P.W., Pham, J.T., Haeusler, A.R., Mistry, N.A., Vidensky, S., Daley, E.L., Poth, E.M., Hoover, B., Fines, D.M., Maragakis, N., Tienari, P.J., Petrucelli, L., Traynor, B.J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C.F., Blackshaw, S., Sattler, R., Rothstein, J.D. (2013). RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*, **80**(2), 415-28.
- Dubreuil, P., Letard, S., Ciufolini, M., Gros, L., Humbert, M., Castéran, N., Borge, L., Hajem, B., Lermet, A., Sippl, W., Voisset, E., Arock, M., Auclair, C., Leventhal, P.S., Mansfield, C.D., Moussy, A., Hermine, O. (2009). Masitinib (AB1010), a potent and selective tyrosine kinase inhibitor targeting KIT. *PLoS One*, **4**(9), e7258.
- Durham, H.D., Roy, J., Dong, L., Figlewicz, D.A. (1997). Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **56**(5), 523-30.
- Drukarch, B., Schepens, E., Stoof, J.C., Langeveld, C.H., Van Muiswinkel, F.L. (1998). Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, **25**(2), 217-20.
- Dupuis, L., Dengler, R., Heneka, M.T., Meyer, T., Zierz, S., Kassubek, J., Fischer, W., Steiner, F., Lindauer, E., Otto, M., Dreyhaupt, J., Grehl, T., Hermann, A., Winkler, A.S., Bogdahn, U., Benecke, R., Schrank, B., Wessig, C., Grosskreutz, J., Ludolph, A.C. (2014). A randomized, double blind, placebo-controlled trial of pioglitazone in combination with riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, **7**(6), e37885.
- Egertová, M., Cravatt, B.F., Elphick, M.R. (2003). Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*, **119**(2), 481-96.
- El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., Ross, S. (2010). Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **95**(4), 434-42.
- Elden, A.C., Kim, H.J., Hart, M.P., Chen-Plotkin, A.S., Johnson, B.S., Fang, X., Armarkola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M.M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Juhr, D., Gruber, P.J., Rüb, U., Auburger, G., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., Van Deerlin, V.M., Bonini, N.M., Gitler, A.D. (2010). Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions are associated with increased risk for ALS. *Nature.*, **466**(7310), 1069-75.
- Elphick, M.R. (2012). The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **367**(1607), 3201-15.
- ElSohly, M.A., Radwan, M.M., Gul, W., Chandra, S., Galal, A. (2017). Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **103**, 1-36.
- Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., Sobue, G., Dezawa, M., Wyss-Coray, T., Yamanaka, K. (2015). Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. *Cell Rep.*, **11**(4), 592-604.
- Englund, A., Atakan, Z., Kralj, A., Tunstall, N., Murray, R., Morrison, P. (2016). The effect of five day dosing with THCV on THC-induced

Referencias

- cognitive, psychological and physiological effects in healthy male human volunteers: A placebo-controlled, double-blind, crossover pilot trial. *J. Psychopharmacol.* **30**(2), 140-51.
- Esmaeili, M.A., Panahi, M., Yadav, S., Hennings, L., Kiaei, M. (2013). Premature death of TDP-43 (A315T) transgenic mice due to gastrointestinal complications prior to development of full neurological symptoms of amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Exp. Pathol.*, **94**(1), 56-64.
- Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., Pertwee, R.G., Mechoulam, R., García, C. (2013). Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology*, **75**, 155-63.
- Fabrizio, P., Amadio, S., Apolloni, S., Volonté, C. (2017). P2X7 Receptor Activation Modulates Autophagy in SOD1-G93A Mouse Microglia. *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 249.
- Falasca, M., Ferro, R. (2016). Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Adv. Biol. Regul.*, **60**, 88-93.
- Fallon, M.T., Albert Lux, E., McQuade, R., Rossetti, S., Sanchez, R., Sun, W., Wright, S., Lichtman, A.H., Korniyeva, E. (2017). Sativex oromucosal spray as adjunctive therapy in advanced cancer patients with chronic pain unalleviated by optimized opioid therapy: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase 3 studies. *Br. J. Pain.*, **11**(3), 119-133.
- Farg, M.A., Soo, K.Y., Warraich, S.T., Sundaramoorthy, V., Blair, I.P., Atkin, J.D. (2013). Ataxin-2 interacts with FUS and intermediate-length polyglutamine expansions enhance FUS-related pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.*, **22**(4), 717-28.
- Feigenbaum, J.J., Bergmann, F., Richmond, S.A., Mechoulam, R., Nadler, V., Kloog, Y., Sokolovsky, M. (1989). Nonpsychotropic cannabinoid acts as a functional N-methyl-D-aspartate receptor blocker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **86**(23), 9584-7.
- Felce, J.H., Latty, S.L., Knox, R.G., Mattick, S.R., Lui, Y., Lee, S.F., Klenerman, D., Davis, S.J. (2017). Receptor Quaternary Organization Explains G Protein-Coupled Receptor Family Structure. *Cell. Rep.*, **20**(11), 2654-2665.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A.L., Mitchell, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol.*, **48**(3), 443-50.
- Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggan, R.M., Koppel, G.A., Paul, S.M., Becker, G.W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.*, **393**(2-3), 231-5.
- Fernández-Ruiz, J. (2009). The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br. J. Pharmacol.*, **156**(7), 1029-40.
- Fernández-Ruiz, J., Moro, M.A., Martínez-Orgado, J. (2015). Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: from preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics*, **12**, 793-806.
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R.M., Ramos, J.A., Guzmán, M. (2007). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**(1), 39-45.
- Ferrante, K.L., Shefner, J., Zhang, H., Betensky, R., O'Brien, M., Yu, H., Fantasia, M., Taft, J., Beal, M.F., Traynor, B., Newhall, K., Donofrio, P., Caress, J., Ashburn, C., Freiberg, B., O'Neill, C., Paladenech, C., Walker, T., Pestronk, A., Abrams, B., Florence, J., Renna, R., Schierbecker, J., Malkus, B., Cudkovicz, M. (2005). Tolerance of high-dose (3,000

- mg/day) coenzyme Q10 in ALS. *Neurology*, **65**(11), 1834-6.
- Ferrante, R.J., Shinobu, L.A., Schulz, J.B., Matthews, R.T., Thomas, C.E., Kowall, N.W., Gurney, M.E., Beal, M.F. (1998). Increased 3-nitrotyrosine and oxidative damage in mice with a human copper/zinc superoxide dismutase mutation. *Ann. Neurol.*, **42**, 326–334.
- Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A., Glass, J.D., 2004. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.*, **185**, 232–240.
- Fornai, F., Longone, P., Cafaro, L., Kastsuichenka, O., Ferrucci, M., Manca, M.L., Lazzeri, G., Spalloni, A., Bellio, N., Lenzi, P., Modugno, N., Siciliano, G., Isidoro, C., Murri, L., Ruggieri, S., Paparelli, A. (2008). Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**(6), 2052-7.
- Frakes, A.E., Ferraiuolo, L., Haidet-Phillips, A.M., Schmelzer, L., Braun, L., Miranda, C.J., Ladner, K.J., Bevan, A.K., Foust, K.D., Godbout, J.P., Popovich, P.G., Guttridge, D.C., Kaspar, B.K. (2011). Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*, **81**(5), 1009-1023.
- Franco, R., Fernández-Suárez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **131**, 65-86.
- Freundt-Revilla, J., Kegler, K., Baumgärtner, W., Tipold, A. (2017). Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system. *PLoS One*. **12**(7), e0181064.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 97-112.
- Fujiwara, M., Egashira, N. (2004). New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: abnormal behaviors associate with CB1 cannabinoid receptor and development of therapeutic application. *J. Pharmacol. Sci.*, **96**(4), 362-6.
- Gabrielli, M., Battista, N., Riganti, L., Prada, I., Antonucci, F., Cantone, L., Matteoli, M., Maccarrone, M., Verderio, C. (2015). Active endocannabinoids are secreted on extracellular membrane vesicles. *EMBO Rep.*, **16**(2), 213-20.
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P. (1995). Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.*, **232**(1), 54-61.
- Gantz, I., Muraoka, A., Yang, Y.K., Samuelson, L.C., Zimmerman, E.M., Cook, H., Yamada, T. (1997). Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18) encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis. *Genomics*, **42**(3), 462-6.
- Gaoni, Y. & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 1646–1647.
- García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J.A., Mechoulam, R., Fernández-Ruiz, J. (2007). 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**(1), 162-70.
- García, M.C., Cinquina, V., Palomo-Garo, C., Rábano, A., Fernández-Ruiz, J. (2015). Identification of CB₂ receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, **587**, 1-4.
- García, M.C., Gómez-Cañas, M., Burgaz, S., Palomares, B., Gómez-Gálvez, Y., Palomo-Garo, C., Campo, S., Ferrer-Hernández, J., Pavicic, C., Navarrete, C., Luz Bellido, M.,

Referencias

- García-Arencibia, M., Ruth Pazos, M., Muñoz, E., Fernández-Ruiz, J. (2018). Benefits of VCE-003.2, a cannabigerol quinone derivative, against inflammation-driven neuronal deterioration in experimental Parkinson's disease: possible involvement of different binding sites at the PPAR γ receptor. *J. Neuroinflammation*, **15**(1), 19.
- Gaffal, E., Cron, M., Glodde, N., Tüting, T. (2013). Anti-inflammatory activity of topical THC in DNFB-mediated mouse allergic contact dermatitis independent of CB1 and CB2 receptors. *Allergy*, **68**(8), 994-1000.
- Geevasinga, N., Loy, C. T., Menon, P., Carvalho, M. De, Swash, M., Schrooten, M., Van Damme, P., Gawelg, M., Sonoo, H., Higashihara, M., Noto, Y., Kuwabaraj, S., Kiernan, M.C., Macaskill, P., Vucic, S. (2016). Clinical Neurophysiology Awaji criteria improves the diagnostic sensitivity in amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review using individual patient data. *Clinical Neurophysiology*, **127**(7), 2684–2691.
- Gérard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.*, **279** (Pt 1), 129-34.
- Giacoppo, S., Bramanti, P., Mazzon, E. (2017). Sativex in the management of multiple sclerosis-related spasticity: An overview of the last decade of clinical evaluation. *Mult. Scler. Relat. Disord.*, **17**, 22-31.
- Giacoppo, S., Mazzon, E. (2016). Can cannabinoids be a potential therapeutic tool in amyotrophic lateral sclerosis? *Neural Regen. Res.*, **11**(12), 1896-1899.
- Giribaldi, F., Milanese, M., Bonifacino, T., Anna Rossi, P.I., Di Prisco, S., Pittaluga, A., Tacchetti, C., Puliti, A., Usai, C., Bonanno, G. (2013). Group I metabotropic glutamate autoreceptors induce abnormal glutamate exocytosis in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropharmacology*, **66**, 253-63.
- Gitcho, M. A., Baloh, R. H., Chakraverty, S., Mayo, K., Norton, J. B., Levitch, D., Cairns, N. J. (2008). TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Annals of Neurology*, **63**, 535–538.
- Glass, M., Felder, C.C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J. Neurosci.*, **17**(14), 5327-33.
- Goetz, C.G. (2000). Amyotrophic lateral sclerosis: early contributions of Jean-Martin Charcot. *Muscle Nerve*, **23**, 336-43.
- Gomes, C., Escrevente, C., Costa, J. (2010). Mutant superoxide dismutase 1 overexpression in NSC-34 cells: effect of trehalose on aggregation, TDP-43 localization and levels of co-expressed glycoproteins. *Neurosci. Lett.*, **475**(3), 145-9.
- Gong, J.P., Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Liu, Q.R., Tagliaferro, P.A., Brusco, A., Uhl, G.R. (2006). Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.*, **1071**(1), 10-23.
- Gonsiorek, W., Lunn, C., Fan, X., Narula, S., Lundell, D., Hipkin, R.W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol. Pharmacol.*, **57**(5), 1045-50.
- Gordon, P.H., Doorish, C., Montes, J., Mosley, R.L., Diamond, B., Macarthur, R.B., Weimer, L.H., Kaufmann, P., Hays, A.P., Rowland, L.P., Gendelman, H.E., Przedborski, S., Mitsumoto, H. (2006). Randomized controlled phase II trial of glatiramer acetate in ALS. *Neurology*, **66**(7), 1117-9.
- Gordon, P.H., Moore, D.H., Gelinas, D.F., Qualls, C., Meister, M.E., Werner, J., Mendoza, M., Mass, J., Kushner, G., Miller, R.G. (2004). Placebo-controlled phase I/II studies of minocycline in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, **62**(10), 1845-7.

- Gorshkov, K., Aguisanda, F., Thorne, N., Zheng, W. (2018). Astrocytes as targets for drug discovery. *Drug Discov. Today.*, **S1359-6446**(17), 30472-5.
- Griffin, G., Tao, Q., Abood, M.E. (2010). Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**(3), 886-94.
- Gulyas, A.I., Cravatt, B.F., Bracey, M.H., Dinh, T.P., Piomelli, D., Boschia, F., Freund, T.F. (2004). Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.*, **20**(2), 441-58.
- Gunnarsson, L.G., Dahlbom, K., Strandman, E. (1991). Motor neuron disease and dementia reported among 13 members of a single family. *Acta Neurol. Scand.*, **84**(5), 429-33.
- Gurney, M.E. (1997). Transgenic animal models of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* **244** Suppl 2, 15-20.
- Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., Deng, H.X., Chen, W., Zhai, P., Sufit, R.L, Siddique, T. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, **264**(5166), 1772-5.
- Gupta, R., Lan, M., Mojsilovic-Petrovic, J., Choi, W.H., Safren, N., Barmada, S., Lee, M.J., Kalb, R. (2017). The Proline/Arginine Dipeptide from Hexanucleotide Repeat Expanded C9ORF72 Inhibits the Proteasome. *eNeuro*, **4**(1)pii, ENEURO.0249-16.2017.
- Haidet-Phillips, A.M., Gross, S.K., Williams, T., Tuteja, A., Sherman, A., Ko, M., Jeong, Y.H., Wong, P.C., Maragakis, N.J. (2013). Altered astrocytic expression of TDP-43 does not influence motor neuron survival. *Exp. Neurol.*, **250**, 250-9.
- Hall, E.D., Oostveen, J.A., Gurney, M.E. (1998). Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia*, **23**, 249–256.
- Han, D., Li, X., Fan, W.S., Chen, J.W., Gou, T.T., Su, T., Fan, M.M., Xu, M.Q., Wang, Y.B., Ma, S., Qiu, Y., Cao, F. (2017). Activation of cannabinoid receptor type II by AM1241 protects adipose-derived mesenchymal stem cells from oxidative damage and enhances their therapeutic efficacy in myocardial infarction mice via Stat3 activation. *Oncotarget*, **8**(39), 64853-64866.
- Handschin, C. (2009). The biology of PGC-1 α and its therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.*, **30**(6), 322-9.
- Hanisch, U.K., Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.*, **10**(11), 1387-94.
- Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T.G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., Nakano, I., Oda, T., Tsuchiya, K., Akiyama, H. (2008). Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **64**, 60-70.
- Hatzipetros, T., Bogdanik, L.P., Tassinari, V.R., Kidd, J.D., Moreno, A.J., Davis, C., Osborne, M., Austin, A., Vieira, F.G., Lutz, C., Perrin, S. (2014). C57BL/6J congenic Prp-TDP43A315T mice develop progressive neurodegeneration in the myenteric plexus of the colon without exhibiting key features of ALS. *Brain Res.*, **1584**, 59-72.
- He, M., Dong, H., Huang, Y., Lu, S., Zhang, S., Qian, Y., Jin, W. (2016). Astrocyte-Derived CCL2 is Associated with M1 Activation and Recruitment of Cultured Microglial Cells. *Cell Physiol. Biochem.*, **38**(3), 859-70.
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., Pagano Zottola, A.C., Delamarre, A., Cannich, A., Vincent, P., Varilh, M., Robin, L.M., Terral, G., García-Fernández, M.D.,

Referencias

- Colavita, M., Mazier, W., Drago, F., Puente, N., Reguero, L., Elezgarai, I., Dupuy, J.W., Cota, D., Lopez-Rodriguez, M.L., Barreda-Gómez, G., Massa, F., Grandes, P., Bénard, G., Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, **539**(7630), 555-559.
- Henkel, J.S., Beers, D.R., Zhao, W., Appel, S.H. (2009). Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **4**(4), 389-98.
- Han, S., Thatte, J., Buzard, D.J., Jones, R.M. (2013). Therapeutic utility of cannabinoid receptor type 2 (CB₂) selective agonists. *J. Med. Chem.*, **56**(21), 8224-56.
- Herdewyn, S., Cirillo, C., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Vanden Berghe, P., Van Damme, P. (2014). Prevention of intestinal obstruction reveals progressive neurodegeneration in mutant TDP-43 (A315T) mice. *Mol. Neurodegener.*, **9**, 24.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.*, **11**(2), 563-83.
- Hiley, C.R. (2009). Endocannabinoids and the heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **53**(4), 267-76.
- Howlett, A.C. (2005). Cannabinoid receptor signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **168**, 53-79.
- Howlett, A.C., Blume, L.C., Dalton, G.D. (2010). CB₁ cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr. Med. Chem.*, **17**(14), 1382-93.
- Hu, Y., Cao, C., Qin, X.Y., Yu, Y., Yuan, J., Zhao, Y., Cheng, Y. (2017). Increased peripheral blood inflammatory cytokine levels in amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis study. *Sci. Rep.*, **7**(1), 9094.
- Hua, T., Vemuri, K., Pu, M., Qu, L., Han, G.W., Wu, Y., Zhao, S., Shui, W., Li, S., Korde, A., Laprairie, R.B., Stahl, E.L., Ho, J.H., Zvonok, N., Zhou, H., Kufareva, I., Wu, B., Zhao, Q., Hanson, M.A., Bohn, L.M., Makriyannis, A., Stevens, R.C., Liu, Z.J. (2016). Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB₁. *Cell*, **167**(3), 750-762.e14.
- Huang, C.C., Bose, J.K., Majumder, P., Lee, K.H., Huang, J.T., Huang, J.K., Shen, C.K. (2014). Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43. *J. Cell. Sci.*, **127**(Pt 14), 3024-38.
- Hurst, K., Badgley, C., Ellsworth, T., Bell, S., Friend, L., Prince, B., Welch, J., Cowan, Z., Williamson, R., Lyon, C., Anderson, B., Poole, B., Christensen, M., McNeil, M., Call, J., Edwards, J.G. (2017). A putative lysophosphatidylinositol receptor GPR55 modulates hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, **27**(9), 985-998.
- Ibrahim, M.M., Rude, M.L., Stagg, N.J., Mata, H.P., Lai, J., Vanderah, T.W., Porreca, F., Buckley, N.E., Makriyannis, A., Malan, T.P. Jr. (2006). CB₂ cannabinoid receptor mediation of antinociception. *Pain*, **122**(1-2), 36-42.
- Idris, Al. (2008). Role of cannabinoid receptors in bone disorders: alternatives for treatment. *Drug News Perspect.*, **21**(10), 533-40.
- Ilieva, H., Polymenidou, M., Cleveland, D.W. (2009). Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *J. Cell. Biol.*, **187**(6), 761-72.
- Irving, A., Abdulrazzaq, G., Chan, S.L.F., Penman, J., Harvey, J., Alexander, S.P.H. (2017). Cannabinoid Receptor-Related Orphan G Protein-Coupled Receptors. *Adv. Pharmacol.*, **80**, 223-247.
- Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J. Clin. Invest.*, **111**(2), 163-9.

- Ishigaki, S., Masuda, A., Fujioka, Y., Iguchi, Y., Katsuno, M., Shibata, A., Urano, F., Sobue, G., Ohno, K. (2013). Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci. Rep.*, **2**, 529.
- Izumikawa, K., Nobe, Y., Yoshikawa, H., Ishikawa, H., Miura, Y., Nakayama, H., Nonaka, T., Hasegawa, M., Egawa, N., Inoue, H., Nishikawa, K., Yamano, K., Simpson, R.J., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Takahashi, N. (2017). TDP-43 stabilises the processing intermediates of mitochondrial transcripts. *Sci. Rep.*, **7**(1), 7709.
- James, P.A., Talbot, K. (2006). The molecular genetics of non-ALS motor neuron diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**(11-12), 986-1000.
- Jadoon, K.A., Ratcliffe, S.H., Barrett, D.A., Thomas, E.L., Stott, C., Bell, J.D., O'Sullivan, S.E., Tan, G.D. (2016). Efficacy and Safety of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol on Glycemic and Lipid Parameters in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Pilot Study. *Diabetes Care*, **39**(10), 1777-86.
- Jiang, L., Xue, W., Hon, J., Zhang, J., Li, M., & Yu, S. (2017). The N-terminal dimerization is required for TDP-43 splicing activity. *Scientific Reports*, **7**, 1–12.
- Joerger, M., Wilkins, J., Fagnini, S., Baldinger, R., Brenneisen, R., Schneider, U., Goldman, B., Weber, M. (2012). Single-dose pharmacokinetics and tolerability of oral delta-9-tetrahydrocannabinol in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Drug Metab. Lett.*, **6**(2), 102-8.
- Johns, D.G., Behm, D.J., Walker, D.J., Ao, Z., Shapland, E.M., Daniels, D.A., Riddick, M., Dowell, S., Staton, P.C., Green, P., Shabon, U., Bao, W., Aiyar, N., Yue, T.L., Brown, A.J., Morrison, A.D., Douglas, S.A. (2007). The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. *Br. J. Pharmacol.*, **152**(5), 825-31.
- Johnston, J.A., Dalton, M.J., Gurney, M.E., Kopito, R.R. (2000). Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 12571–12576.
- Josephs, K.A., Dickson, D.W., Tosakulwong, N., Weigand, S.D., Murray, M.E., Petrucelli, L., Liesinger, A.M., Senjem, M.L., Spychalla, A.J., Knopman, D.S., Parisi, J.E., Petersen, R.C., Jack, C.R. Jr., Whitwell, J.L. (2017). Rates of hippocampal atrophy and presence of post-mortem TDP-43 in patients with Alzheimer's disease: a longitudinal retrospective study. *Lancet Neurol.*, **16**(11), 917-924.
- Josephs, K. A., Whitwell, J. L., Weigand, S. D., Murray, M. E., Tosakulwong, N., Liesinger, A. M., Dickson, D. W. (2015). TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, **127**, 811-824.
- Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., Pradat, P.F., Camu, W., Meininger, V., Dupre, N., Rouleau, G.A. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.*, **40**(5), 572-4.
- Kabir, M., Iyer, M.S., Richey, J.M., Woolcott, O.O., Asare Bediako, I., Wu, Q., Kim, S.P., Stefanovski, D., Kolka, C.M., Hsu, I.R., Catalano, K.J., Chiu, J.D., Ionut, V., Bergman, R.N. (2015). CB1R antagonist increases hepatic insulin clearance in fat-fed dogs likely via upregulation of liver adiponectin receptors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **309**(8), E747-58.
- Katona, I., Freund, T.F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **35**, 529-58.
- Kaur, S.J., McKeown, S.R., Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, **577**(2), 109-18.

Referencias

- Kawamata, T., Akiyama, H., Yamada, T., McGeer, P.L. (1992). Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *Am. J. Pathol.*, **140**(3), 691-707.
- Khaksar, S., Bigdeli, M.R. (2017). Anti-excitotoxic effects of cannabidiol are partly mediated by enhancement of NCX2 and NCX3 expression in animal model of cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **794**, 270-279.
- Kim, K., Moore, D.H., Makriyannis, A., Abood, M.E. (2006). AM1241, a cannabinoid CB2 receptor selective compound, delays disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* **542**(1-3), 100-5.
- Kim, S.P., Woolcott, O.O., Hsu, I.R., Stefanoski, D., Harrison, L.N., Zheng, D., Lottati, M., Kolka, C., Catalano, K.J., Chiu, J.D., Kabir, M., Ionut, V., Bergman, R.N., Richey, J.M. (2012). CB1 antagonism restores hepatic insulin sensitivity without normalization of adiposity in diet-induced obese dogs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **302**(10), E1261-8.
- Kitamura, A., Nakayama, Y., Shibasaki, A., Taki, A., Yuno, S., Takeda, K., Yahara, M., Tanabe, N., Kinjo, M. (2016). Interaction of RNA with a C-terminal fragment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP43 reduces cytotoxicity. *Sci. Rep.*, **6**, 19230.
- Klegeris, A., Bissonnette, C., McGeer, P.L. (2003). Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **139**(4), 775-86.
- Kobatake, Y., Sakai, H., Tsukui, T., Yamato, O., Kohyama, M., Sasaki, J., Kato, S., Urushitani, M., Maeda, S., Kamishina, H. (2017). Localization of a mutant SOD1 protein in E40K-heterozygous dogs: Implications for non-cell-autonomous pathogenesis of degenerative myelopathy. *J. Neurol. Sci.*, **15**, 372, 369-378.
- Kocic, I., Kowianski, P., Rusiecka, I., Lietzau, G., Mansfield, C., Moussy, A., Hermine, O., Dubreuil, P. (2015). Neuroprotective effect of masitinib in rats with postischemic stroke. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **388**(1), 79-86.
- Koerner, D.R. (1952). Amyotrophic lateral sclerosis on Guam. *Ann. Intern. Med.*, **37**(6), 1204-20.
- Kohno, M., Hasegawa, H., Inoue, A., Muraoka, M., Miyazaki, T., Oka, K., Yasukawa, M. (2006). Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**(3), 827-32.
- Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., Sugiura, T. (1998). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.*, **429**(2), 152-6.
- Kozak, K.R., Rowlinson, S.W., Marnett, L.J. (2000). Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **275**(43), 33744-9.
- Kramar, C., Loureiro, M., Renard, J., Laviolette, S.R. (2017). Palmitoylethanolamide Modulates GPR55 Receptor Signaling in the Ventral Hippocampus to Regulate Mesolimbic Dopamine Activity, Social Interaction, and Memory Processing. *Cannabis Cannabinoid Res.*, **2**(1), 8-20.
- Kreitzer, A.C., Regehr, W.G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*, **29**(3), 717-27.
- Kuo, P., Doudeva, L. G., Wang, Y., Shen, C. J., & Yuan, H. S. (2009). Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic Acids Research*, **37**, 1799–1808.

- Kushner, P.D., Stephenson, D.T., Wright, S. (1991). Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **50**(3), 263-77.
- Khurana, L., Mackie, K., Piomelli, D., Kendall, D.A. (2017). Modulation of CB1 cannabinoid receptor by allosteric ligands: Pharmacology and therapeutic opportunities. *Neuropharmacology*, **124**, 3-12.
- Kwiatkowski, T.J. Jr., Bosco, D.A., Leclerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G.A., Hosler, B.A., Cortelli, P., de Jong, P.J., Yoshinaga, Y., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Yan, J., Ticozzi, N., Siddique, T., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Landers, J.E., Brown, R.H. Jr. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, **323**(5918), 1205-8.
- Lacomblez, L., Bensimon, G., Duillet, P., Doppler, V., Salachas, F., Meininger, V. (2004). Xaliproden in amyotrophic lateral sclerosis: early clinical trials. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, **5**(2), 99-106.
- Lai, E.C., Felice, K.J., Festoff, B.W., Gawel, M.J., Gelinas, D.F., Kratz, R., Murphy, M.F., Natter, H.M., Norris, F.H., Rudnicki, S.A. (1997). Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology*, **49**(6), 1621-30.
- Lansbury, P.T., Lashuel, H.A. (2006). A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic. *Nature*, **443**(7113), 774-9.
- Lashley, T., Rohrer, J.D., Mead, S., Revesz, T. (2015). Review: an update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **41**(7), 858-81.
- Lauckner, J.E., Hille, B., Mackie, K. (2005). The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **102**(52), 19144-9.
- Lauckner, J.E., Jensen, J.B., Chen, H.Y., Lu, H.C., Hille, B., Mackie, K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**(7), 2699-704.
- Lauria, G., Campanella, A., Filippini, G., Martini, A., Penza, P., Maggi, L., Antozzi, C., Ciano, C., Beretta, P., Caldiroli, D., Ghelma, F., Ferrara, G., Ghezzi, P., Mantegazza, R. (2009). Erythropoietin in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and tolerability. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **10**(5-6), 410-5.
- Lawrence, D.K., Gill, E.W. (1975). The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol. Pharmacol.* **11**(5), 595-602.
- Lee, E.B., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2011). Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.*, **13**(1), 38-50.
- Lee, J., Hyeon, S.J., Im, H., Ryu, H., Kim, Y., Ryu, H. (2016). Astrocytes and Microglia as Non-cell Autonomous Players in the Pathogenesis of ALS. *Exp. Neurobiol.*, **25**(5), 233-240.
- Lemmon, M.E., Grados, M., Kline, T., Thompson, C.B., Ali, S.F., Singer, H.S. (2015). Efficacy of glutamate modulators in tic suppression: A double-blind, randomized control trial of D-serine and Riluzole in Tourette syndrome. *Pediatr. Neurol.*, **52**(6), 629-34.
- Lenglet, T., Lacomblez, L., Abitbol, J.L., Ludolph, A., Mora, J.S., Robberecht, W., Shaw, P.J., Pruss, R.M., Cuvier, V., Meininger, V. (2014). A phase II-III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurol.*, **21**(3), 529-36.

Referencias

- Leung, D., Saghatelian, A., Simon, G.M., Cravatt, B.F. (2006). Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry*, **45**(15), 4720-6.
- Lewis, M., & Gordon, P. H. (2007). Lou Gehrig, Rawhide, and 1938. *Neurology*, **68**, 615-8.
- Li, B., Chen, M., Guo, L., Yun, Y., Li, G., Sang, N. (2015). Endogenous 2-Arachidonoylglycerol Alleviates Cyclooxygenases-2 Elevation-Mediated Neuronal Injury From SO₂ Inhalation via PPAR γ Pathway. *Toxicol. Sci.*, **147**(2), 535-48.
- Li, D., Liu, M., Cui, B., Fang, J., Guan, Y., Ding, Q., Li X., Cui, L. (2017). The Awaji criteria increases the diagnostic sensitivity of the revised El Escorial criteria for amyotrophic lateral sclerosis diagnosis in a Chinese population. *PLoS One*. **1**, 12(3).
- Liao, S., Ruiz, Y., Gulzar, H., Yelskaya, Z., Ait, Taouit, L., Houssou, M., Jaikaran, T., Schvarts, Y., Kozlitina, K., Basu-Roy, U., Mansukhani, A., Mahajan, S.S. (2017). Osteosarcoma cell proliferation and survival requires mGluR5 receptor activity and is blocked by Riluzole. *PLoS One*. **12**(2).
- Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., Wilton, D.K., Frouin, A., Napier, B.A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M.S., Rowitch, D.H., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Stevens, B., Barres, B.A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, **541**(7638), 481-487.
- Lichtman, A.H., Lux, E.A., McQuade, R., Rossetti, S., Sanchez, R., Sun, W., Wright, S., Korniyeva, E., Fallon, M.T. (2017). Results of a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study of Nabiximols Oromucosal Spray as Adjunctive Therapy in Advanced Cancer Patients With Chronic Uncontrolled Pain. *J Pain Symptom Manage*, [Epub ahead of print].
- Ligresti, A., De Petrocellis, L., Di Marzo, V. (2016). From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. *Physiol. Rev*, **96**(4), 1593-659.
- Ling, S.C., Polymenidou, M., Cleveland, D.W. (2015). Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron*. **79**(3), 416-38.
- Lipina, C., Hundal, H.S. (2016). Modulation of cellular redox homeostasis by the endocannabinoid system. *Open Biol.*, **6**(4), 150276.
- Liu, R., Althaus, J.S., Ellerbrock, B.R., Becker, D.A., Gurney, M.E. (1998). Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **44**, 763-770.
- Liu, Y., Pattamatta, A., Zu, T., Reid, T., Bardhi, O., Borchelt, D.R., Yachnis, A.T., Ranum, L.P. (2016). C9orf72 BAC Mouse Model with Motor Deficits and Neurodegenerative Features of ALS/FTD. *Neuron*. **90**(3), 521-34.
- Lomen-Hoerth, C., Murphy, J., Langmore, S., Kramer, J.H., Olney, R.K., Miller, B. (2003). Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal? *Neurology*, **60**(7), 1094-7.
- Lopez-Gonzalez, R., Lu, Y., Gendron, T.F., Karydas, A., Tran, H., Yang, D., Petrucelli, L., Miller, B.L., Almeida, S., Gao, F.B. (2016). Poly(GR) in C9ORF72-Related ALS/FTD Compromises Mitochondrial Function and Increases Oxidative Stress and DNA Damage in iPSC-Derived Motor Neurons. *Neuron*, **92**(2), 383-391.
- López-Sendón, Moreno, J.L., García Caldentey, J., Trigo Cubillo, P., Ruiz Romero, C., García Ribas, G., Alonso Arias, M.A., García de Yébenes, M.J., Tolón, R.M., Galve-Roperh, I., Sagredo, O., Valdeolivas, S., Resel, E., Ortega-

- Gutierrez, S., García-Bermejo, M.L., Fernández Ruiz, J., Guzmán, M., García de Yébenes Prous, J. (2016). A double-blind, randomized, cross-over, placebo-controlled, pilot trial with Sativex in Huntington's disease. *J. Neurol.*, **263**(7), 1390-400.
- Lotan, I., Treves, T.A., Roditi, Y., Djaldetti, R. (2014). Cannabis (medical marijuana) treatment for motor and non-motor symptoms of Parkinson disease: an open-label observational study. *Clin. Neuropharmacol.*, **37**(2), 41-4.
- Lunn, C.A., Reich, E.P., Bober, L. (2006). Targeting the CB2 receptor for immune modulation. *Expert. Opin. Ther. Targets*, **10**(5), 653-63.
- Lutz, B. (2007). The endocannabinoid system and extinction learning. *Mol. Neurobiol.*, **36**(1), 92-101.
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., Hillard, C.J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**(12), 705-18.
- Lyman, W.D., Sonett, J.R., Brosnan, C.F., Elkin, R., Bornstein, M.B. (1989). Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.*, **23**(1), 73-81.
- Maccarrone M. (2017). Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 166.
- Mackenzie, I.R., Bigio, E.H., Ince, P.G., Geser, F., Neumann, M., Cairns, N.J., Kwong, L.K., Forman, M.S., Ravits, J., Stewart, H., Eisen, A., McClusky, L., Kretschmar, H.A., Monoranu, C.M., Highley, J.R., Kirby, J., Siddique, T., Shaw, P.J., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol.*, **61**(5), 427-34.
- Mackenzie, I.R.A., Rademakers, R., & Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *The Lancet Neurology*, **9**, 995–1007.
- MacVicar, B.A., Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**(5) pii: a020388.
- Magrané, J., Cortez, C., Gan, W.B., Manfredi, G. (2014). Abnormal mitochondrial transport and morphology are common pathological denominators in SOD1 and TDP43 ALS mouse models. *Hum. Mol. Genet.*, **23**(6), 1413-24.
- Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., van Swieten, J.C., Abramzon, Y., Johnson, J.O., Sendtner, M., Pampillet, R., Orrell, R.W., Mead, S., Sidle, K.C., Houlden, H., Rohrer, J.D., Morrison, K.E., Pall, H., Talbot, K., Ansorge, O. et al. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.*, **11**(4), 323-30.
- Mallory, J.P., Mair, V.H. (2000). The Tarim mummies: ancient China and the mystery of the earliest peoples from the West. New York: Thames & Hudson.
- Manev, H., Favaron, M., Guidotti, A., Costa, E. (1989). Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol. Pharmacol.*, **36**(1), 106-12.
- Manjaly, Z.R., Scott, K.M., Abhinav, K., Wijesekera, L., Ganesalingam, J., Goldstein, L.H., Janssen, A., Dougherty, A., Willey, E., Stanton, B.R., Turner, M.R., Ampong, M.A., Sakel, M., Orrell, R.W., Howard, R., Shaw, C.E., Leigh, P.N., Al-Chalabi, A. (2010). The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **11**(5), 439-42.
- March, P.A., Coates, J.R., Abyad, R.J., Williams, D.A., O'Brien, D.P., Olby, N.J., Keating, J.H., Oglesbee, M. (2009). Degenerative

Referencias

- myelopathy in 18 Pembroke Welsh Corgi dogs. *Vet. Pathol.* **46**(2), 241-50.
- Marchalant, Y., Brownjohn, P.W., Bonnet, A., Kleffmann, T., Ashton, J.C. (2014). Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody Specificity. *J. Histochem. Cytochem.* **62**(6), 395-404.
- Marech, I., Patruno, R., Zizzo, N., Gadaleta, C., Introna, M., Zito, A.F., Gadaleta, C.D., Ranieri, G. (2014). Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **91**(1), 98-111.
- Marin, B., Boumédiène, F., Logroscino, G., Couratier, P., Babron, M.C., Leutenegger, A.L., Copetti, M., Preux, P.M., Beghi, E. (2017). Variation in worldwide incidence of amyotrophic lateral sclerosis: a meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.*, **46**(1), 57-74.
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C., Seibert, K. (1994). Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **91**(8), 3228-32.
- Mathew, S.J., Gueorguieva, R., Brandt, C., Fava, M., Sanacora, G. (2017). A randomized, double-blind, placebo-controlled, sequential parallel comparison design trial of adjunctive Riluzole for treatment-resistant major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology*, [Epub ahead of print].
- Mattiazzi, M., D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Martushova, K., Kiaei, M., Beal, M.F., Manfredi, G. (2002). Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J. Biol. Chem.*, **277**(33), 29626-33.
- Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561-564.
- Mátyás, F., Yanovsky, Y., Mackie, K., Kelsch, W., Misgeld, U., Freund, T.F. (2006). Subcellular localization of type 1 cannabinoid receptors in the rat basal ganglia. *Neuroscience*, **137**(1), 337-61.
- McCoy, K.L., Matveyeva, M., Carlisle, S.J., Cabral, G.A. (1999). Cannabinoid inhibition of the processing of intact lysozyme by macrophages: evidence for CB2 receptor participation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**(3), 1620-5.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., Kawamata, T., Yamada, T., Akiyama, H. (1991). Reactions of the immune system in chronic degenerative neurological diseases. *Can. J. Neurol. Sci.*, **18**(3 Suppl), 376-9.
- McHugh, D., Page, J., Dunn, E., Bradshaw, H.B. (2010). $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br. J. Pharmacol.*, **165**(8), 2414-24.
- McPartland, J., Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Mercer, A., Glass, M. (2001). Cannabinoid receptors are absent in insects. *J. Comp. Neurol.*, **436**(4), 423-9.
- McPartland, J.M., Duncan, M., Di Marzo, V., Pertwee, R.G. (2015). Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* **172**(3), 737-53.
- Mecha, M., Feliú, A., Iñigo, P.M., Mestre, L., Carrillo-Salinas, F.J., Guaza, C. (2013). Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiol. Dis.*, **59**, 141-50.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton,

- D.R., G.Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J., Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **50**(1), 83-90.
- Mechoulam, R., Hanuš, L.O., Pertwee, R., Howlett, A.C. (2014). Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.*, **15**(11), 757-64.
- Mechoulam, R., McCallum, N. K. & Burstein, S. (1976). Recent advances in the chemistry and biochemistry of cannabis. *Chem. Rev.*, **76**, 75–112.
- Mechoulam, R. & Shvo, Y. (1963). The structure of cannabidiol. *Tetrahedron.*, **19**, 2073–2078.
- Mesci, P., Zaïdi, S., Lobsiger, C.S., Millecamps, S., Escartin, C., Seilhean, D., Sato, H., Mallat, M., Boillée, S. (2015). System xC- is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain*, **138**(Pt 1), 53-68.
- Micale, V., Cristino, L., Tamburella, A., Petrosino, S., Leggio, G.M., Drago, F., Di Marzo, V. (2009). Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology*, **34**(3), 593-606.
- Milanese, M., Giribaldi, F., Melone, M., Bonifacino, T., Musante, I., Carminati, E., Rossi, P.I., Vergani, L., Voci, A., Conti, F., Puliti, A., Bonanno, G. (2014). Knocking down metabotropic glutamate receptor 1 improves survival and disease progression in the SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.*, **64**, 48-59.
- Miller, R., Bradley, W., Cudkowicz, M., Hubble, J., Meininger, V., Mitsumoto, H., Moore, D., Pohlmann, H., Sauer, D., Silani, V., Strong, M., Swash, M., Vernotica, E. (2007). *Neurology*, **69**(8), 776-84.
- Miller, R., Bryan, W., Munsat, T. (1993). Safety, tolerability and pharmacokinetics of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Ann. Neurol.*, **34**, 241.
- Miller, R.G., Mitchell, J.D., Lyon, M, Moore, D.H. (2007b). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst. Rev.* **24**(1).
- Miller, R.G., Zhang, R., Block, G., Katz, J., Barohn, R., Kasarskis, E., Forshew, D., Gopalakrishnan, V., McGrath, M.S. (2014). NP001 regulation of macrophage activation markers in ALS: a phase I clinical and biomarker study. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **15**(7-8), 601-9.
- Mishima, T., Koga, S., Lin, W.L., Kasanuki, K., Castanedes-Casey, M., Wszolek, Z.K., Oh, S.J., Tsuboi Y., Dickson, D.W. (2017). Perry Syndrome: A Distinctive Type of TDP-43 Proteinopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **76**(8), 676-682.
- Mitsumoto, H. (1997). Diagnosis and progression of ALS. *Neurology*. **48**(S4), 2S-8S.
- Mnich, K., Finn, D.P., Dowd, E., Gorman, A.M. (2010). Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells. *Int. J. Cell. Biol.*, 2010, 818497.
- Mompeán, M., Romano, V., Pantoja-uceda, X. D., Stuaní, C., Baralle, X. F. E., Buratti, X. E., & Laurents, X. D. V. (2017). Point mutations in the N-terminal domain of transactive response DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) compromise its stability, dimerization, and functions. *J. Biol. Chem.*, **292**, 11992–12006.
- Montero, C., Campillo, N.E., Goya, P., Páez, J.A. (2005). Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *Eur. J. Med. Chem.*, **40**(1), 75-83.
- Morello, G., Spampinato, A.G., Cavallaro, S. (2017). Neuroinflammation and ALS: Transcriptomic Insights into Molecular Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Mediators Inflamm.*, **2017**, 7070469.

Referencias

- Morello, G., Spampinato, A.G., Conforti, F.L., D'Agata, V., Cavallaro, S. (2017). Selection and Prioritization of Candidate Drug Targets for Amyotrophic Lateral Sclerosis Through a Meta-Analysis Approach. *J. Mol. Neurosci.*, **61**(4), 563-580.
- Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., de Lago, E. (2014). Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of SOD1 (G93A) transgenic mice and evaluation of a Sativex®-like combination of phytocannabinoids: interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurosci. Ther.*, **20**(9), 809-15.
- Moretti, S., Castelli, M., Franchi, S., Raggi, M.A., Micolini, L., Protti, M., Somaini, L., Panerai, A.E., Sacerdote, P. (2014). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-induced anti-inflammatory responses in adolescent mice switch to proinflammatory in adulthood. *J. Leukoc. Biol.*, **96**(4), 523-34.
- Mori, K., Arzberger, T., Grässer, F.A., Gijssels, I., May, S., Rentzsch, K., Weng, S.M., Schludi, M.H., van der Zee, J., Cruys, M., Van Broeckhoven, C., Kremmer, E., Kretschmar, H.A., Haass, C., Edbauer, D. (2013). Bidirectional transcripts of the expanded C9orf72 hexanucleotide repeat are translated into aggregating dipeptide repeat proteins. *Acta Neuropathol*, **126**(6), 881-93.
- Moura, M.C., Novaes, M.R., Zago, Y.S., Eduardo, E.J., Casulari, L.A. (2016). Efficacy of Stem Cell Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med. Res.*, **8**(4), 317-24.
- Mourelatos, Z., Gonatas, N.K., Stieber, A., Gurney, M.E., Dal Canto, M.C. (1996). The Golgi apparatus of spinal cord motor neurons in transgenic mice expressing mutant Cu, Zn superoxide dismutase becomes fragmented in early, preclinical stages of the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 5472-5477.
- Munro, S., Thomas, K. L., Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61-65.
- Murataeva, N., Straiker, A., Mackie, K. (2014). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* **171**(6), 1379-91.
- Nagai, M., Re, D.B., Nagata, T., Chalazonitis, A., Jessell, T.M., Wichterle, H., Przedborski, S. (2007). Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat. Neurosci.*, **10**(5), 615-22.
- Nardone, R., Höller, Y., Taylor, A.C., Lochner, P., Tezzon, F., Golaszewski, S., Brigo, F., Trinka, E. (2016). Canine degenerative myelopathy: a model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Zoology (Jena)*, **119**(1), 64-73.
- Nascimento, C., Di Lorenzo Alho, A.T., Bazan, Conceição Amaral, C., Leite, R.E.P., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., Pasqualucci, C.A., Hokkanen, S.R.K., Hunter, S., Keage, H., Kovacs, G.G., Grinberg, L.T., Suemoto, C.K. (2017). Prevalence of transactive response DNA-binding protein 43 (TDP-43) proteinopathy in cognitively normal older adults: systematic review and meta-analysis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, [Epub ahead of print]
- Navarria, A., Tamburella, A., Iannotti, F.A., Micale, V., Camillieri, G., Gozzo, L., Verde, R., Imperatore, R., Leggio, G.M., Drago, F., Di Marzo, V. (2014). The dual blocker of FAAH/TRPV1 N-arachidonoylserotonin reverses the behavioral despair induced by stress in rats and modulates the HPA-axis. *Pharmacol. Res.*, **87**, 151-9.
- Ndong, C., O'Donnell, D., Ahmad, S., Groblewski, T. (2011). Cloning and pharmacological characterization of the dog cannabinoid CB₂receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **669**(1-3), 24-31.
- Neumann, M. (2009). Molecular neuropathology of TDP-43 proteinopathies. *Int. J. Mol. Sci.*, **10**(1), 232-46.

- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretschmar, H.A., Mackenzie, I.R. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain*, **132**(Pt 11), 2922-31.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, **314**, 130–133.
- Niikura, T., Kita, Y., Abe, Y. (2014). SUMO3 modification accelerates the aggregation of ALS-linked SOD1 mutants. *PLoS One*, **9**(6), 101080.
- Niu, J., Huang, D., Zhou, R., Yue, M., Xu, T., Yang, J., He, L., Tian, H., Liu, X., Zeng, J. (2017). Activation of dorsal horn cannabinoid CB2 receptor suppresses the expression of P2Y12 and P2Y13 receptors in neuropathic pain rats. *J. Neuroinflammation*, **14**(1), 185.
- Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D.M., Akiyama, H., Hasegawa, M. (2013). Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains. *Cell Rep.*, **4**(1), 124-34.
- Norrod, A.G., Puffenbarger, R.A. (2007). Genetic polymorphisms of the endocannabinoid system. *Chem. Biodivers.*, **4**(8), 1926-32.
- Nortley, R., Attwell, D. (2017). Control of brain energy supply by astrocytes. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **47**, 80-85.
- Núñez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., González, S., Tolón, R.M., Romero, J. (2004). Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*, **53**(4), 208-13.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol. Biol.*, **814**, 23-45.
- Oddi, S., Fezza, F., Pasquariello, N., De Simone, C., Rapino, C., Dainese, E., Finazzi-Agrò, A., Maccarrone, M. (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**(5), 840-50.
- Oh, U., Hwang, S.W., Kim, D. (1996). Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, **16**(5), 1659-67.
- Oka, S., Nakajima, K., Yamashita, A., Kishimoto, S., Sugiura, T. (2007). Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **362**(4), 928-34.
- Okamoto, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J. Biol. Chem.*, **279**(7), 5298-305.
- Onaivi, E.S., Ishiguro, H., Gong, J.P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P.A., Myers, L., Mora, Z., Tagliaferro, P., Gardner, E., Brusco, A., Akinshola, B.E., Liu, Q.R., Hope, B., Iwasaki, S., Arinami, T., Teasent, L., Uhl, G.R. (2006). Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1074**, 514-36.
- Onesto, E., Rusmini, P., Crippa, V., Ferri, N., Zito, A., Galbiati, M., Poletti, A. (2011). Muscle cells and motoneurons differentially remove mutant SOD1 causing familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.*, **118**(2), 266-80.
- Orihuela, R., McPherson, C.A., Harry, G.J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* **173**(4), 649-65.
- O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Muhammad, A.K.M.G., Gendron, T.F., Kim, K.J., Austin, A., Cady, J., Liu, E.Y., Zarrow, J., Grant, S., Ho, R., Bell, S., Carmona, S., Simpkinson, M., Lall, D., Wu, K., Daugherty, L., Dickson, D.W., Harms, M.B., Petrucelli, L., Lee, E.B., Lutz, C.M., Baloh, R.H. (2015). C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron*, **88**(5), 892-901.

Referencias

- O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A.J., Muhammad, A.K., Ho, R., Carmona, S., Vit, J.P., Zarrow, J., Kim, K.J., Bell, S., Harms, M.B., Miller, T.M., Dangler, C.A., Underhill, D.M., Goodridge, H.S., Lutz, C.M., Baloh, R.H. (2016). C9orf72 is required for proper macrophage and microglial function in mice. *Science*, **351**(6279), 1324-9.
- O'Sullivan, S.E., Tarling, E.J., Bennett, A.J., Kendall, D.A., Randall, M.D. (2006). Novel time-dependent vascular actions of Delta9-tetrahydrocannabinol mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**(3), 824-31.
- Ou, S. I., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L. F., & Gaynor, R. B. (1995). Cloning and Characterization of a Novel Cellular Protein, TDP-43, that Binds to Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol*, **69**, 3584–3596.
- Pacifico, D., Miselli, F., Carboni, A., Moschella, A., Mandolino, G. (2008). Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L. *Euphytica*, **160**, 231–240.
- Pacher, P., Bátkai, S., Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.*, **58**(3), 389-462.
- Park, L.T., Lener, M.S., Hopkins, M., Iadorola, N., Machado-Vieira, R., Ballard, E., Nugent, A., Zarate, C.A. Jr. (2017). A double-blind, placebo-controlled, pilot study of Riluzole monotherapy for acute bipolar depression. *J. Clin. Psychopharmacol.*, **37**(3), 355-358.
- Pascuzzi, R.M., Shefner, J., Chappell, A.S., Bjerke, J.S., Tamura, R., Chaudhry, V., Clawson, L., Haas, L., Rothstein, J.D. (2010). A phase II trial of talampanel in subjects with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral. Scler.*, **11**(3), 266-71.
- Pasquarelli, N., Engelskirchen, M., Hanselmann, J., Endres, S., Porazik, C., Bayer, H., Buck, E., Karsak, M., Weydt, P., Ferger, B., Witting, A. (2017). Evaluation of monoacylglycerol lipase as a therapeutic target in a transgenic mouse model of ALS. *Neuropharmacology*, **124**, 157-169.
- Persson, M., Sandberg, M., Hansson, E., Rönnbäck, L. (2006). Microglial glutamate uptake is coupled to glutathione synthesis and glutamate release. *Eur. J. Neurosci.* **24**(4), 1063-70.
- Pertwee R.G. (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.*, **153**(2), 199-215.
- Peters, O.M., Cabrera, G.T., Tran, H., Gendron, T.F., McKeon, J.E., Metterville, J., Weiss, A., Wightman, N., Salameh, J., Kim, J., Sun, H., Boylan, K.B., Dickson, D., Kennedy, Z., Lin, Z., Zhang, Y.J., Daugherty, L., Jung, C., Gao, F.B., Sapp, P.C., Horvitz, H.R., Bosco, D.A., Brown, S.P., de Jong, P., Petrucelli, L., Mueller, C., Brown, R.H. Jr. (2015). Human C9ORF72 Hexanucleotide Expansion Reproduces RNA Foci and Dipeptide Repeat Proteins but Not Neurodegeneration in BAC Transgenic Mice. *Neuron*. **88**(5), 902-909.
- Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., & Hermine, O. (2017). ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment? *Front. Aging Neurosci.*, **9**, 68.
- Piepers, S., Veldink, J.H., de Jong, S.W., van der Tweel, I., van der Pol, W.L., Uijtendaal, E.V., Schelhaas, H.J., Scheffer, H., de Visser, M., de Jong, J.M., Wokke, J.H., Groeneveld, G.J., van den Berg, L.H. (2009). Randomized sequential trial of valproic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **66**(2), 227-34.
- Pietr, M., Kozela, E., Levy, R., Rimmerman, N., Lin, Y.H., Stella, N., Vogel, Z., Juknat, A. (2009). Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett.*, **583**(12), 2071-6.

- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**(11), 873-84.
- Pirhan, D., Yüksel, N., Emre, E., Cengiz, A., Kürşat Yıldız, D. (2015). Riluzole- and Resveratrol-induced delay of retinal ganglion cell death in an experimental model of glaucoma. *Curr. Eye Res.*, **41**(1), 59-69.
- Pirone, A., Cantile, C., Miragliotta, V., Lenzi, C., Giannessi, E., Cozzi, B. (2016). Immunohistochemical distribution of the cannabinoid receptor 1 and fatty acid amide hydrolase in the dog claustrum. *J. Chem. Neuroanat.* **74**, 21-7.
- Pirone, A., Lenzi, C., Coli, A., Giannessi, E., Stornelli, M.R., Miragliotta, V. (2015). Preferential epithelial expression of type-1 cannabinoid receptor (CB1R) in the developing canine embryo. *Springerplus.*, **22**(4), 804.
- Pisanti, S., Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., Abate, M., Faggiana, G., Proto, M.C., Fiore, D., Laezza, C., Bifulco, M. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol. Ther.*, **175**, 133-150.
- Pokrishevsky, E., Hong, R.H., Mackenzie, I.R., Cashman, N.R. (2017). Spinal cord homogenates from SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis induce SOD1 aggregation in living cells. *PLoS One*, **12**(9), e0184384.
- Porojan, C., Mitrovic, S.M., Yeo, D.C., Furey, A. (2016). Overview of the potent cyanobacterial neurotoxin β -methylamino-L-alanine (BMAA) and its analytical determination. *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal Control Expo. Risk Assess.*, **33**(10), 1570-1586.
- Racz, I., Nadal, X., Alferink, J., Baños, J.E., Rehnelt, J., Martín, M., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A., Sanguino, E., Manzanares, J., Zimmer, A., Maldonado, R. (2008). Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. *J. Neurosci.*, **28**(46), 12125-35.
- Raman, C., McAllister, S.D., Rizvi, G., Patel, S.G., Moore, D.H., Abood, M.E. (2004). Amyotrophic lateral sclerosis: delayed disease progression in mice by treatment with a cannabinoid. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord.*, **5**(1), 33-9.
- Ramírez-Jarquín, U.N., Rojas, F., van Zundert, B., Tapia, R. (2017). Chronic infusion of SOD1G93A astrocyte-secreted factors induces spinal motoneuron degeneration and neuromuscular dysfunction in healthy rats. *J. Cell. Physiol.*, **232**(10), 2610-2615.
- Ranieri, R., Laezza, C., Bifulco, M., Marasco, D., Malfitano, A.M. (2016). Endocannabinoid System in Neurological Disorders. *Recent Pat. CNS Drug Discov.*, **10**(2), 90-112.
- Ranieri, R., Laezza, C., Bifulco, M., Marasco, D., Malfitano, A.M. (2016b). Cannabinoids and Neuro-Inflammation: Regulation of Brain Immune Response. *Recent Pat. CNS Drug Discov.*, **10**(2), 178-203.
- Ratti, A., Buratti, E. (2016). TDP-43 physiological functions and pathobiology. *J. Neurochemistry*, **138**, 95–111.
- Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, Jr., R.H., Scott, R.W., Snider, W.D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.*, **13**, 43–47.
- Reber, L., Da Silva, C.A., Frossard, N. (2006). Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur. J. Pharmacol.*, **533**(1-3), 327-40.
- Renton, A.E., Chiò, A., Traynor, B.J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nat. Neurosci.*, **17**(1), 17-23.

Referencias

- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., Abramzon, Y., Remes, A.M., Kaganovich, A., Scholz, S.W., Duckworth, J., Ding, J., Harmer, D.W., Hernandez, D.G., Johnson, J.O., Mok, K., Ryten, M., Trabzuni, D., Guerreiro, R.J., Orrell, R.W., Neal, J., Murray, A., Pearson, J., Jansen, I.E., Sondervan, D., Seelaar, H., Blake, D., Young, K., Halliwell, N., Callister, J.B., Toulson, G., Richardson, A., Gerhard, A., Snowden, J., Mann, D., Neary, D., Nalls, M.A., Peuralinna, T., Jansson, L., Isoviita, V.M., Kaivorinne, A.L., Hölttä-Vuori, M., Ikonen, E., Sulkava, R., Benatar, M., Wu, J., Chiò, A., Restagno, G., Borghero, G., Sabatelli, M.; ITALSGEN Consortium, Heckerman, D., Rogaeva, E., Zinman, L., Rothstein, J.D., Sendtner, M., Drepper, C., Eichler, E.E., Alkan, C., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Dutra, A., Pak, E., Hardy, J., Singleton, A., Williams, N.M., Heutink, P., Pickering-Brown, S., Morris, H.R., Tienari, P.J., Traynor, B.J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, **72**(2), 257-68.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Héaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Néliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubri, P., Breliker, J.C., Le Fur, G. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett.*, **350**(2-3), 240-4.
- Ringholz, G.M., Appel, S.H., Bradshaw, M., Cooke, N.A., Mosnik, D.M., Schulz, P.E. (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*, **65**(4), 586-90.
- Rockwell, C.E., Snider, N.T., Thompson, J.T., Vanden Heuvel, J.P., Kaminski, N.E. (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol. Pharmacol.*, **70**(1), 101-11.
- Rojas, F., Cortes, N., Abarzua, S., Dyrda, A., van Zundert, B. (2014). Astrocytes expressing mutant SOD1 and TDP43 trigger motoneuron death that is mediated via sodium channels and nitroxidative stress. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 8, 24.
- Romano, B., Pagano, E., Orlando, P., Capasso, R., Cascio, M.G., Pertwee, R., Marzo, V.D., Izzo, A.A., Borrelli, F. (2016).
- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X., et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **362**(6415), 59-62.
- Rosenfeld, J., King, R.M., Jackson, C.E., Bedlack, R.S., Barohn, R.J., Dick, A., Phillips, L.H., Chapin, J., Gelinas, D.F., Lou, J.S. (2008). Creatine monohydrate in ALS: effects on strength, fatigue, respiratory status and ALSFRS. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **9**(5), 266-72.
- Ross, S.A., ElSohly, M.A., Sultana, G.N., Mehmedic, Z., Hossain, C.F., Chandra, S. (2005). Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochem. Anal.*, **16**(1), 45-8.
- Rothstein, J.D. (2017). Edaravone: A new drug approved for ALS. *Cell*, **171**(4), 725.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **38**(1), 73-84.
- Rudenko, S.I. (1970). Frozen tombs of Siberia; the Pazyryk burials of Iron Age horsemen. Berkeley: University of California Press.
- Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., Parker, K.K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT1a receptors. *Neurochem. Res.*, **30**(8), 1037-43.

- Rzepa, E., Tudge, L., McCabe, C. (2015). The CB1 Neutral Antagonist Tetrahydrocannabinol Reduces Default Mode Network and Increases Executive Control Network Resting State Functional Connectivity in Healthy Volunteers. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**(2).
- Russo, E.B., Jiang, H.E., Li, X., Sutton, A., Carboni, A., Del Bianco, F., Mandolino, G., Potter, D.J., Zhao, Y.X., Bera, S., Zhang, Y.B., Lü, E.G., Ferguson, D.K., Hueber, F., Zhao, L.C., Liu, C.J., Wang, Y.F., Li, C.S. (2008). Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *J. Exp. Bot.*, **59**(15), 4171-82.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **152**(7), 1092-101.
- Saccon, R.A., Bunton-Stasyshyn, R.K., Fisher, E.M., Fratta, P. (2013). Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*, **136**(Pt 8), 2342-58.
- Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P., Guzmán, M. (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.*, **436**(1), 6-10.
- Sánchez-Ramos, C., Tierrez, A., Fabregat-Andrés, O., Wild, B., Sánchez-Cabo, F., Arduini, A., Dopazo, A., Monsalve, M. (2011). PGC-1 α regulates translocated in liposarcoma activity: role in oxidative stress gene expression. *Antioxid. Redox Signal*, **15**(2), 325-37.
- Sang, N., Zhang, J., Chen, C. (2006). PGE2 glycerol ester, a COX-2 oxidative metabolite of 2-arachidonoyl glycerol, modulates inhibitory synaptic transmission in mouse hippocampal neurons. *J. Physiol.*, **572**(Pt 3), 735-45.
- Savage, S.A., Lillo, P., Kumfor, F., Kiernan, M.C., Piguet, O., Hodges, J.R. (2014). Emotion processing deficits distinguish pure amyotrophic lateral sclerosis from frontotemporal dementia. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.*, **15**(1-2), 39-46.
- Savonenko, A.V., Melnikova, T., Wang, Y., Ravert, H., Gao, Y., Koppel, J., Lee, D., Pletnikova, O., Cho, E., Sayyida, N., Hiatt, A., Troncoso, J., Davies, P., Dannals, R.F., Pomper, M.G., Horti, A.G. (2015). Cannabinoid CB2 Receptors in a Mouse Model of A β Amyloidosis: Immunohistochemical Analysis and Suitability as a PET Biomarker of Neuroinflammation. *PLoS One*, **10**(6), e0129618.
- Sawzdargo, M., Nguyen, T., Lee, D.K., Lynch, K.R., Cheng, R., Heng, H.H., George, S.R., O'Dowd, B.F. (1998). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain. Res. Mol. Brain Res.*, **64**(2), 193-8.
- Scekic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., Drenner, K., Birling, M.C., Qiu, J., Zhou, Y., Li, H., Fu, X.D., Rouaux, C., Shelkovnikova, T., Witting, A., Ludolph, A.C., Kiefer, F., Storkebaum, E., Lagier-Tourenne, C., Dupuis, L. (2016). Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss. *EMBO J.*, **35**(10), 1077-97.
- Schatz, A.R., Lee, M., Condie, R.B., Pulaski, J.T., Kaminski, N.E. (1997). Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**(2), 278-87.
- Schipper, L.J., Raaphorst, J., Aronica, E., Baas, F., de Haan, R., de Visser, M., Troost, D. (2016). Prevalence of brain and spinal cord inclusions, including dipeptide repeat proteins, in patients with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: a systematic neuropathological review. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **42**(6), 547-60.

Referencias

- Schmidt, J., Schmidt, T., Golla, M., Lehmann, L., Weber, J.J., Hübener-Schmid, J., Riess, O., (2016). In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *J. Neurochem.* **138**(1), 150-62.
- Schousboe, A., Bak, L.K., Waagepetersen, H.S. (2013). Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front. Endocrinol.*, **15**(4), 102.
- Senoo, Y., Katoh, K., Nakai, Y., Hashimoto, Y., Bando, K., Teramoto, S. (1988). Activity and stability of recombinant human superoxide dismutase in buffer solutions and hypothermic perfusates. *Acta Med.*, **49**, 169-174.
- Seol, H.S., Lee, S.E., Song, J.S., Lee, H.Y., Park, S., Kim, I., Singh, S.R., Chang, S., Jang, S.J. (2016). Glutamate release inhibitor, Riluzole, inhibited proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by elevated ROS production. *Cancer Lett.*, **382**(2), 157-165.
- Shang, V.C., Kendall, D.A., Roberts, R.E. (2016). Δ 9-Tetrahydrocannabinol reverses TNF α -induced increase in airway epithelial cell permeability through CB2 receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **120**, 63-71.
- Shearer, B.G., Hoekstra, W.J. (2003). Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science. *Curr. Med. Chem.*, **10**(4), 267-80.
- Shefner, J., Cedarbaum, J.M., Cudkowicz, M.E., Maragakis, N., Lee, J., Jones, D., Watson, M.L., Mahoney, K., Chen, M., Saikali, K., Mao, J., Russell, A.J., Hansen, R.L., Malik, F., Wolff, A.A. (2012). Safety, tolerability and pharmacodynamics of a skeletal muscle activator in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **13**(5), 430-8.
- Shelton, G.D., Johnson, G.C., O'Brien, D.P., Katz, M.L., Pesayco, J.P., Chang, B.J., Mizisin, A.P., Coates, J.R. (2012). Degenerative myelopathy associated with a missense mutation in the superoxide dismutase 1 (SOD1) gene progresses to peripheral neuropathy in Pembroke Welsh corgis and boxers. *J. Neurol. Sci.* **318**(1-2), 55-64.
- Sheng, W.S., Hu, S., Feng, A., Rock, R.B. (2013). Reactive oxygen species from human astrocytes induced functional impairment and oxidative damage. *Neurochem. Res.*, **38**(10), 2148-59.
- Shi, Q.X., Yang, L.K., Shi, W.L., Wang, L., Zhou, S.M., Guan, S.Y., Zhao, M.G., Yang, Q. (2017). The novel cannabinoid receptor GPR55 mediates anxiolytic-like effects in the medial orbital cortex of mice with acute stress. *Mol. Brain.*, **10**(1), 38.
- Shibata, N., Kakita, A., Takahashi, H., Ihara, Y., Nobukuni, K., Fujimura, H., Sakoda, S., Sasaki, S., Iwata, M., Morikawa, S., Hirano, A., Kobayashi, M. (2009). Activation of signal transducer and activator of transcription-3 in the spinal cord of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurodegener. Dis.*, **6**(3), 118-26.
- Shire, D., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Oustric, D., Pessègue, B., Bonnin-Cabanne, O., Le Fur, G., Caput, D., Ferrara, P. (1996). Molecular cloning, expression and function of the murine CB2 peripheral cannabinoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1307**(2), 132-6.
- Shoemaker, J. L., Seely, K. A., Reed, R. L., Crow, J. P., & Prather, P. L. (2007). The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *Journal of Neurochemistry*, **101**(1), 87–98.
- Sierra, S., Luquin, N., Rico, A.J., Gómez-Bautista, V., Roda, E., Dopeso-Reyes, I.G., Vázquez, A., Martínez-Pinilla, E., Labandeira-García, J.L., Franco, R., Lanciego, J.L. (2015). Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques:

- changes following experimental parkinsonism. *Brain Struct, Funct.*, **220**(5), 2721-38.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*, **4**, 180-3.
- Sims, K.D., Robinson, M.B. (1999). Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.*, **13**(2), 169-97.
- Silvestri, C., Paris, D., Martella, A., Melck, D., Guadagnino, I., Cawthorne, M., Motta, A., Di Marzo, V. (2015). Two non-psychoactive cannabinoids reduce intracellular lipid levels and inhibit hepatosteatosis. *J. Hepatol.* **62**(6), 1382-90.
- Slipetz, D.M., O'Neill, G.P., Favreau, L., Dufresne, C., Gallant, M., Gareau, Y., Guay, D., Labelle, M., Metters, K.M. (1995). Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.*, **48**(2), 352-61.
- Smethurst, P., Newcombe, J., Troakes, C., Simone, R., Chen, Y.R., Patani, R., Sidle, K. (2016). In vitro prion-like behaviour of TDP-43 in ALS. *Neurobiol. Dis.*, **96**, 236-247.
- Smith, E.F., Shaw, P.J., De Vos, K.J. (2017). The role of mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.*, In press.
- Sreedharan, J., Ian P. Blair, Tripathi, V. B., Hu, Xun Vance, C., Rogelj, Boris Steven Ackerley, Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Christopher C. Miller, Garth Nicholson, Shaw, C. E. (2008). TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, **319**, 1668–1672.
- Song, J., Huang, C., Nagata, K., Yeh, J. A., Narahashi, T. (1997). Differential Action of Riluzole on Tetrodotoxin-Sensitive and tetrodotoxin-Resistant Sodium Channels. *JPET*, **282**, 707–714.
- Sousa-Valente, J., Varga, A., Ananthan, K., Khajuria, A., Nagy, I. (2014). Anandamide in primary sensory neurons: too much of a good thing?. *Eur. J. Neurosci.*, **39**(3), 409-18.
- Speyer C.L., Nassar M.A., Hachem A.H., Bukhsh M.A., Jafry W., Khansa R.M., Gorski D.H. (2016). Riluzole mediates anti-tumor properties in breast cancer cells independent of metabotropic glutamate receptor-1. *Breast Cancer Res. Treat.*, **157**(2), 217-228.
- Stempel, A.V., Stumpf, A., Zhang, H.Y., Özdoğan, T., Pannasch, U., Theis, A.K., Otte, D.M., Wojtalla, A., Rácz, I., Ponomarenko, A., Xi, Z.X., Zimmer, A., Schmitz, D. (2016). Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus. *Neuron*, **90**(4), 795-809.
- Tada, S., Okuno, T., Hitoshi, Y., Yasui, T., Honorat, J.A., Takata, K., Koda, T., Shimagami, H., Chi-Jing, C., Namba, A., Sugimoto, T., Sakoda, S., Mochizuki, H., Kikutani, H., Nakatsuji, Y. (2014). Partial suppression of M1 microglia by Janus kinase 2 inhibitor does not protect against neurodegeneration in animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation*, **11**, 179.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 335-76.
- Talwar, R., Potluri, V.K. (2011). Cannabinoid 1 (CB1) receptor--pharmacology, role in pain and recent developments in emerging CB1 agonists. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **10**(5), 536-44.
- Tanaka, Y., Hasegawa, M. (2016). Profilin 1 mutants form aggregates that induce accumulation of prion-like TDP-43. *Prion*, **10**(4), 283-9.
- Tang, Y., Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol. Neurobiol.*, **53**(2), 1181-94.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an

Referencias

- antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **150**(5), 613-23.
- Trias, E., Ibarburu, S., Barreto-Núñez, R., Babbdor, J., Maciel, T.T., Guillo, M., Gros, L., Dubreuil, P., Díaz-Amarilla, P., Cassina, P., Martínez-Palma, L., Moura, I.C., Beckman, J.S., Hermine, O., Barbeito, L. (2016). Post-paralysis tyrosine kinase inhibition with masitinib abrogates neuroinflammation and slows disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroinflammation*, **13**(1), 177.
- Trotti, D., Rolfs, A., Danbolt, N.C., Brown, R.H. Jr., Hediger, M.A. (1999). SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat. Neurosci.*, **2**(5), 427-33.
- Tsang, C.K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., Zheng, X.F. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat. Commun.*, **5**, 3446.
- Tsao, W., Jeong, Y.H., Lin, S., Ling, J., Price, D.L., Chiang, P.M., Wong, P.C. (2012). Rodent models of TDP-43: recent advances. *Brain Res.*, **1462**, 26-39.
- Tummala, H., Jung, C., Tiwari, A., Higgins, C.M., Hayward, L.J., Xu, Z. (2005). Inhibition of chaperone activity is a shared property of several Cu,Zn-superoxide dismutase mutants that cause amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.*, **280**(18), 17725-31.
- Turcotte, C., Blanchet, M.R., Laviolette, M., Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol. Life Sci.*, **73**(23), 4449-4470.
- Turner, B.J., Talbot, K. (2008). Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog. Neurobiol.*, **85**(1), 94-134.
- Turner, M.R., Scaber, J., Goodfellow, J.A., Lord, M.E., Marsden, R., Talbot, K. (2010). The diagnostic pathway and prognosis in bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, **294**(1-2), 81-5.
- Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T. (2013). Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *FEBS J.*, **280**(9), 1874-94.
- Valdeolivas, S., Sagredo, O., Delgado, M., Pozo, M.A., Fernández-Ruiz, J. (2017). Effects of a Sativex-Like Combination of Phytocannabinoids on Disease Progression in R6/2 Mice, an Experimental Model of Huntington's Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(4), pii: E684.
- Valdeolivas, S., Satta, V., Pertwee, R.G., Fernández-Ruiz, J., Sagredo, O. (2012). Sativex-like combination of phytocannabinoids is neuroprotective in malonate-lesioned rats, an inflammatory model of Huntington's disease: role of CB1 and CB2 receptors. *ACS Chem. Neurosci.*, **3**(5), 400-6.
- Van Eijk, R.P.A., Jones, A.R., Sproviero, W., Shatunov, A., Shaw, P.J., Leigh, P.N., Young, C.A., Shaw, C.E., Mora, G., Mandrioli, J., Borghero, G., Volanti, P., Diekstra, F.P., van Rheenen, W., Verstraete, E., Eijkemans, M.J.C., Veldink, J.H., Chio, A., Al-Chalabi, A., van den Berg, L.H., van Es, M.A.; For UKMND-LiCALS and LITALS Study Group. (2017). Meta-analysis of pharmacogenetic interactions in amyotrophic lateral sclerosis clinical trials. *Neurology*, **89**(18), 1915-1922.
- Van Sickle, M.D., Duncan, M., Kingsley, P.J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., Stella, N., Makriyannis, A., Piomelli, D., Davison, J.S., Marnett, L.J., Di Marzo, V., Pittman, Q.J., Patel, K.D., Sharkey, K.A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, **310**(5746), 329-32.
- Varma, N., Carlson, G.C., Ledent, C., Alger, B.E. (2001). Metabotropic glutamate receptors drive the endocannabinoid system in hippocampus. *J. Neurosci.*, **21**(24):RC188.

- Villapol, S. (2018). Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **38**(1), 121-132.
- Vinceti, M., Filippini, T., Violi, F., Rothman, K.J., Costanzini, S., Malagoli, C., Wise, L.A., Odone, A., Signorelli, C., Iacuzio, L., Arcolin, E., Mandrioli, J., Fini, N., Patti, F., Lo Fermo, S., Pietrini, V., Teggi, S., Ghermandi, G., Scillieri, R., Ledda, C., Mauceri, C., Sclacca, S., Fiore, M., Ferrante, M. (2017). Pesticide exposure assessed through agricultural crop proximity and risk of amyotrophic lateral sclerosis. *Environ. Health*, **16**(1), 91.
- Vucic, S., Rothstein, J.D., Kiernan, M.C. (2014). Advances in treating amyotrophic lateral sclerosis: insights from pathophysiological studies. *Trends. Neurosci.*, **37**(8), 433-42.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., Stella, N. (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.*, **23**(4), 1398-405.
- Wang, H., Wang, I., Bose, J., & Shen, C. J. (2004). Structural Diversity and Functional Implications of the Eukaryotic TDP Gene Family. *Genomics*, **83**, 130–139.
- Wang, W.Y., Pan, L., Su, S.C., Quinn, E.J., Sasaki, M., Jimenez, J.C., Mackenzie, I.R., Huang, E.J., Tsai, L.H. (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat. Neurosci.*, **16**(10), 1383-91.
- Watanabe, T., Yuki, S., Egawa, M., Nishi, H. (1994). Protective effects of MCI-186 on cerebral ischemia: possible involvement of free radical scavenging and antioxidant actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**(3), 1597-604.
- Weber, M., Goldman, B., Truniger, S. (2010). Tetrahydrocannabinol (THC) for cramps in amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind crossover trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **81**(10), 1135-40.
- Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M., Baloh, R.H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**(44), 18809-14.
- Wei, Y., Lim, L., Wang, L., Song, J. (2017). ALS-causing cleavages of TDP-43 abolish its RRM2 structure and unlock CTD for enhanced aggregation and toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**(4), 826-831.
- Weydt, P., Hong, S., Witting, A., Möller, T., Stella, N., Kliot, M. (2005). Cannabinol delays symptom onset in SOD1 (G93A) transgenic mice without affecting survival. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **6**(3), 182-4.
- Whyte, L.S., Ryberg, E., Sims, N.A., Ridge, S.A., Mackie, K., Greasley, P.J., Ross, R.A., Rogers, M.J. (2009). The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **106**(38), 16511-6.
- Williams, J.C., Klein, T.W., Goldberger, B.A., Sleasman, J.W., Mackman, N., Goodenow, M.M. (2015). Δ (9)-Tetrahydrocannabinol (THC) enhances lipopolysaccharide-stimulated tissue factor in human monocytes and monocyte-derived microvesicles. *J. Inflamm.*, **12**, 39.
- Williams, K.L., Warraich, S.T., Yang, S., Solski, J.A., Fernando, R., Rouleau, G.A., Nicholson, G.A., Blair, I.P. (2012). UBQLN2/ubiquilin 2 mutation and pathology in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Aging.*, **33**(10), 2527.e3-10.
- Williamson, T.L., Cleveland, D.W. (1999). Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat. Neurosci.*, **2**(1), 50-6.
- Winton, M. J., Igaz, L. M., Wong, M. M., Kwong, L. K., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2008). Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-binding Protein (TDP-43) Induces Disease-like Redistribution, Sequestration,

Referencias

- and Aggregate Formation. *J. Biol. Chem.*, **283**, 13302–13309.
- Wokke, J. (1996). Drug profile Riluzole. *Lancet*, **348**, 795–799.
- Woodhams, S.G., Sagar, D.R., Burston, J.J., Chapman, V. (2015). The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **227**, 119-43.
- Wu, C.H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P.J., Sapp, P.C., Piotrowska, K., Lowe, P., Koppers, M., McKenna-Yasek, D., Baron, D.M., Kost, J.E., Gonzalez-Perez, P., Fox, A.D., Adams, J., Taroni, F., Tiloca, C., Leclerc, A.L., Chafe, S.C., Mangroo, D., Moore, M.J., Zitzewitz, J.A., Xu, Z.S., van den Berg, L.H., Glass, J.D., Siciliano, G., Cirulli, E.T., Goldstein, D.B., Salachas, F., Meininger, V., Rossoll, W., Ratti, A., Gellera, C., Bosco, D.A., Bassell, G.J., Silani, V., Drory, V.E., Brown, R.H. Jr., Landers, J.E. (2012). Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, **488**(7412), 499-503.
- Yamanaka, K., Chun, S.J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D.H., Takahashi, R., Misawa, H., Cleveland, D.W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Neurosci.*, **11**(3), 251-3.
- Yamashita, A., Oka, S., Tanikawa, T., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Sugiura, T. (2013). The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR55. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **107**, 103-16.
- Yang, H., Zhou, J., Lehmann, C. (2016). GPR55 - a putative "type 3" cannabinoid receptor in inflammation. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **27**(3), 297-302.
- Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I.P., Naylor, A., Bountra, C., Banati, R.R., Anand, P. (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol.*, **6**, 12.
- Yokoseki, A., & Shiga, A. (2008). TDP-43 Mutation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann. Neurol.*, **63**, 538–542.
- Zettl, U.K., Rommer, P., Hipp, P., Patejdl, R. (2016). Evidence for the efficacy and effectiveness of THC-CBD oromucosal spray in symptom management of patients with spasticity due to multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, **9**(1), 9-30.
- Zang, D.W., Cheema, S.S. (2002). Degeneration of corticospinal and bulbospinal systems in the superoxide dismutase 1(G93A G1H) transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.*, **332**, 99–102.
- Zhang, B., Tu, P., Abtahian, F., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (1997). Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J. Cell Biol.*, **139**(5), 1307-15.
- Zhang, J., Hoffert, C., Vu, H.K., Groblewski, T., Ahmad, S., O'Donnell, D. (2003). Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur. J. Neurosci.*, **17**(12), 2750-4.
- Zhang, J., Shi, X.Q., Echeverry, S., Mogil, J.S., De Koninck, Y., Rivest, S. (2007). Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain. *J. Neurosci.*, **27**(45), 12396-406.
- Zhang, R., Gascon, R., Miller, R.G., Gelinas, D.F., Mass, J., Hadlock, K., Jin, X., Reis, J., Narvaez, A., McGrath, M.S. (2005). Evidence for systemic immune system alterations in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J. Neuroimmunol.*, **159**(1-2), 215-24.
- Zhang, R., Hadlock, K.G., Do, H., Yu, S., Honrada, R., Champion, S., Forshew, D., Madison, C., Katz, J., Miller, R.G., McGrath, M.S. (2011). Gene

- expression profiling in peripheral blood mononuclear cells from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS). *J. Neuroimmunol.*, **230**(1-2), 114-23.
- Zhang, Y.J., Xu, Y.F., Cook, C., Gendron, T.F., Roettges, P., Link, C.D., Lin, W.L., Tong, J., Castanedes-Casey, M., Ash, P., Gass, J., Rangachari, V., Buratti, E., Baralle, F., Golde T.E., Dickson, D.W., Petrucelli, L. (2009). Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **106**(18), 7607-12.
- Zhou, J., Burkovskiy, I., Yang, H., Sardinha, J., Lehmann, C. (2016). CB2 and GPR55 Receptors as Therapeutic Targets for Systemic Immune Dysregulation. *Front. Pharmacol.*, **7**, 264.
- Zondler, L., Müller, K., Khalaji, S., Bliedehäuser, C., Ruf, W.P., Grozdanov, V., Thiemann, M., Fundel-Clemes, K., Freischmidt, A., Holzmann, K., Strobel, B., Weydt, P., Witting, A., Thal, D.R., Hefnerich, A.M., Hengerer, B., Gottschalk, K.E., Hill, O., Kluge, M., Ludolph, A.C., Danzer, K.M., Weishaupt, J.H. (2016). Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol.*, **132**(3), 391-411.
- Zoratti, C., Kipmen-Korgun, D., Osibow, K., Malli, R., Graier, W.F. (2003). Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **140**(8), 1351-62.
- Zou, Z.Y., Zhou, Z.R., Che, C.H., Liu, C.Y., He, R.L., Huang, H.P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **88**(7), 540-549.
- Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Hallak, J.E., Moreira, F.A., Guimarães, F.S. (2006). Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **39**(4), 421-9.
- Zygmunt, P.M., Ermund, A., Movahed, P., Andersson, D.A., Simonsen, C., Jönsson, B.A., Blomgren, A., Birnir, B., Bevan, S., Eschalier, A., Mallet, C., Gomis, A., Högestätt, E.D. (2013). Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One.*, **8**(12), e81618.
- Zygmunt, P.M., Andersson, D.A., Hogestatt, E.D. (2002). Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabinol activate capsaicin-sensitive sensory nerves via a CB1 and CB2 cannabinoid receptor-independent mechanism. *J. Neurosci.*, **22**(11), 4720-7.
- Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, **400**(6743), 452-7.

