

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Estudio del impacto y potencial terapéutico de la modulación
del sistema endocannabinoide en la ELA**

**Study of the Impact and Therapeutic Potential of Modulating
the Endocannabinoid System in ALS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marta Gómez Almería

DIRIGIDA POR

**Eva de Lago Femia
Carmen Rodríguez Cueto**

Madrid

© Marta Gómez Almería, 2024

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Estudio del impacto y potencial terapéutico de la modulación del sistema endocannabinoide en
la ELA
Study of the Impact and Therapeutic Potential of Modulating the Endocannabinoid System in
ALS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Marta Gómez Almería

DIRECTORAS

Eva de Lago Femia
Carmen Rodríguez Cueto

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

Instituto Universitario de Investigación Neuroquímica UCM

TESIS DOCTORAL

Estudio del Impacto y Potencial Terapéutico de la Modulación
del Sistema Endocannabinoide en la ELA

Study of the Impact and Therapeutic Potential of Modulating the
Endocannabinoid System in ALS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR:

Marta Gómez Almería

DIRECTORAS:

Eva de Lago Femia

Carmen Rodríguez Cueto

Madrid, 2024



ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	17
1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA	19
1.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ELA	20
1.2. DIAGNÓSTICO	23
1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA	25
1.3.1. <i>SOD1</i>	28
1.3.2. <i>TARDBP</i>	29
1.3.3. <i>C9ORF72</i>	30
1.3.4. <i>FUS</i>	31
1.4. MODELOS MURINOS DE ELA	32
1.4.1. <i>Modelos murinos basados en SOD1</i>	33
1.4.2. <i>Modelos murinos basados en TDP43</i>	33
1.5. MECANISMOS PATOGENICOS EN LA ELA	34
1.5.1. <i>Agregación proteica</i>	35
1.5.2. <i>Excitotoxicidad</i>	40
1.5.3. <i>Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial</i>	42
1.5.4. <i>Neuroinflamación</i>	44
1.5.5. <i>Transporte axonal</i>	52
1.5.6. <i>Mecanismos patogénicos en la ELA en el músculo esquelético</i>	53
1.6. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA ELA.....	59
2. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	61
2.1. RECEPTORES CANNABINOIDES	61
2.1.1. <i>Receptor CB₁</i>	61
2.1.2. <i>Receptor CB₂</i>	64
2.1.3. <i>Otros receptores cannabinoides</i>	65
2.2. ENDOCANNABINOIDES	66
2.3. METABOLISMO DE ENDOCANNABINOIDES	67
2.4. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL SEC	69
2.4.1. <i>Fitocannabinoides</i>	70
2.4.2. <i>Cannabinoides sintéticos</i>	71
2.5. PAPEL NEUROPROTECTOR DE SEC.....	73
2.5.1. <i>Efectos antiinflamatorios del SEC</i>	73
2.5.2. <i>Efectos antiexcitotóxicos del SEC</i>	74
2.5.3. <i>Efectos antioxidantes del SEC</i>	75

2.6.	EL SEC EN LA ELA	76
	OBJETIVOS	81
	MATERIALES Y MÉTODOS	85
1.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	87
1.1.	MODELO MURINO TDP43 ^{A315T}	87
1.2.	MODELO MURINO FAAH ^{-/-}	88
1.3.	MODELO MURINO SOD1 ^{G93A}	88
1.4.	MODELO MURINO BiP ^{+/-}	89
1.5.	GENOTIPADO.....	89
2.	PRUEBAS COMPORTAMENTALES.....	91
2.1.	TEST DE ROTAROD	91
2.2.	REFLEJO DE <i>CLASPING</i>	92
2.3.	ESCALA CLÍNICA.....	93
2.4.	<i>HANGING WIRE</i>	94
2.5.	TEST DE LA FUERZA DE AGARRE.....	94
3.	ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	95
4.	TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS	95
5.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	97
6.	TÉCNICAS HISTOLÓGICAS	98
6.1.	TINCIÓN DE NISSL	98
6.2.	INMUNOFLUORESCENCIA	99
6.2.1.	<i>Análisis de poblaciones celulares en la médula espinal.....</i>	<i>100</i>
6.2.2.	<i>Análisis de las uniones neuromusculares en el tibial anterior.....</i>	<i>100</i>
7.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	101
7.1.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-QPCR.....	101
8.	WESTERN BLOT	102
9.	ESTUDIOS HPLC-MS	103
10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	104
	RESULTADOS.....	107
1.	CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA ENZIMA FAAH EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL MODELO MURINO DE ELA TDP43^{A315T}	109
1.1.	ABLACIÓN GENÉTICA	110

1.1.1.	<i>Análisis de la supervivencia</i>	110
1.1.2.	<i>Análisis del fenotipo patológico</i>	111
1.1.3.	<i>Análisis histopatológicos en el asta ventral de la médula espinal</i>	113
1.2.	INHIBICIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ENZIMA FAAH.....	115
1.2.1.	<i>Análisis del fenotipo patológico</i>	116
1.2.2.	<i>Análisis histopatológicos en el asta ventral de la médula espinal</i>	117
1.2.3.	<i>Análisis bioquímico en la médula espinal</i>	119
2.	CAPÍTULO 2: ESTUDIO DEL PAPEL DE RECEPTORES CB2 PERIFÉRICOS EN EL MODELO MURINO DE ELA SOD1G93A	123
2.1.	ANÁLISIS COMPORTAMENTAL DEL FENOTIPO PATOLÓGICO	124
2.2.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO EN LA MÉDULA ESPINAL	126
2.3.	ANÁLISIS BIOQUÍMICO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	129
2.4.	ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO.	131
2.5.	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS: HPLC-MS.....	132
3.	CAPÍTULO 3: ESTUDIO DEL PAPEL NEUROPROTECTOR DE UN NUEVO INTERACTOR DEL RECEPTOR CB₁, BIP, EN EL MODELO MURINO DE ELA SOD1^{G93A}	135
3.1.	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA.....	136
3.2.	ANÁLISIS DEL FENOTIPO PATOLÓGICO	137
3.3.	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS EN EL ASTA VENTRAL DE LA MÉDULA ESPINAL	138
3.4.	ANÁLISIS BIOQUÍMICOS EN EL ASTA VENTRAL DE LA MÉDULA ESPINAL	142
	DISCUSIÓN	145
	CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	169
	BIBLIOGRAFÍA	175



RESUMEN/ABSTRACT

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores, responsables de la transmisión de los impulsos nerviosos a las fibras musculares. La degeneración de estas neuronas produce síntomas de debilidad muscular progresiva, atrofia muscular y, en etapas finales, parálisis de los músculos. Esto conduce a la muerte de los pacientes entre 3 a 5 años tras el inicio de los síntomas, generalmente por la parálisis de los músculos del diafragma.

La ELA tiene una etiología variada con un importante componente genético. Se han identificado mutaciones en más de 30 genes que son causantes o confieren un mayor riesgo de desarrollar ELA, entre los cuales destacan *C9orf72*, *SOD1*, *TARDBP* y *FUS*. Los genes relacionados con la enfermedad participan en una variedad de funciones celulares. En este sentido, la degeneración neuronal en la ELA resulta de la alteración de múltiples mecanismos patogénicos interrelacionados, incluyendo excitotoxicidad, estrés oxidativo, daño mitocondrial, fallos en el transporte axonal, agregación proteica, neuroinflamación y alteraciones musculares.

A pesar de la intensa investigación en los últimos años, las opciones terapéuticas disponibles para la ELA son todavía limitadas y poco efectivas. Por tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar tratamientos efectivos que modifiquen la progresión de la enfermedad. En este contexto, la modulación del sistema endocannabinoide ha emergido como una posible diana terapéutica prometedora. El sistema endocannabinoide, compuesto por receptores cannabinoides, endocannabinoides y enzimas metabólicas, juega un papel crucial en la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo la modulación de la inflamación y la excitotoxicidad, factores relevantes en la patogénesis de la ELA. Diversos estudios han descrito alteraciones en los elementos del sistema endocannabinoide durante la progresión de la enfermedad, que pueden reflejar respuestas endógenas protectoras o el resultado del avance de la patología. Por tanto, la potenciación o inhibición farmacológica, respectivamente, de estos cambios representa una potencial estrategia para modificar la progresión de la enfermedad.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es profundizar en el estudio del potencial terapéutico de la modulación del sistema endocannabinoide en la esclerosis lateral amiotrófica. Para ello, se establecieron tres objetivos específicos, abordados en tres capítulos diferentes de la tesis:

- **Objetivo 1:** Investigar el efecto de la activación de los receptores CB₂ periféricos en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}.
- **Objetivo 2:** Evaluar el potencial neuroprotector de la ablación genética y la inhibición farmacológica de la enzima FAAH (del inglés, *fatty acid amide hydrolase*) responsable de la degradación de cannabinoides, en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T}.

- **Objetivo 3:** Examinar los efectos de la eliminación parcial de la proteína chaperona BiP, un nuevo interactador del receptor CB₁, en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}.

Con el fin de alcanzar estos objetivos específicos, en el primer capítulo de esta tesis nos centramos en el primer objetivo profundizando en el impacto de los receptores CB₂ en la ELA. Aunque se ha descrito ampliamente el efecto neuroprotector de los receptores CB₂ en la ELA, aún se desconoce la contribución específica de los receptores CB₂ periféricos a este efecto. Dado que estos receptores se expresan en tejidos periféricos, como el músculo esquelético, que desempeñan un papel crucial en la patología de la ELA, en el **capítulo 1**, de nuestra investigación decidimos explorar el posible efecto neuroprotector de la activación de los receptores CB₂ periféricos en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}. Para ello, comparamos en el modelo clásico de ELA SOD1^{G93A}, el efecto de la administración de un agonista CB₂ que no atraviesa la barrera hematoencefálica (BHE) y, por lo tanto, se une exclusivamente a los receptores CB₂ periféricos, con el de un agonista capaz de atravesar la barrera y unirse a receptores CB₂ tanto periféricos como centrales. Nuestros datos demostraron que la activación de receptores CB₂ periféricos produjo mejoras significativas en el fenotipo patológico en el modelo SOD1^{G93A}, similares a las observadas con la activación de receptores CB₂ periféricos y centrales. Además, el análisis de la médula espinal mostró que el tratamiento con el agonista periférico preservó la supervivencia de las motoneuronas y produjo efectos antiinflamatorios, efectos que son similares a los observados con el agonista capaz de atravesar la BHE. Nuestros estudios demostraron que la neuroprotección observada no fue consecuencia del paso del compuesto periférico al sistema nervioso central (SNC) debido a una posible alteración de la BHE, confirmando así el efecto neuroprotector de la activación de receptores CB₂ periféricos en nuestro modelo de ELA. Además, los tratamientos con ambos agonistas CB₂ también mostraron efectos beneficiosos en el músculo esquelético, preservando las uniones neuromusculares en la enfermedad y disminuyendo la expresión de genes marcadores de alteración muscular. Estos hallazgos demuestran que tanto la activación conjunta como la activación de receptores CB₂ periféricos son neuroprotectoras en el modelo de ELA SOD1^{G93A}. Estos efectos beneficiosos podrían ser atribuibles a la activación específica de los receptores CB₂ en el músculo esquelético.

En el **capítulo 2**, buscamos analizar el efecto neuroprotector de aumentar los niveles de endocannabinoides mediante la ablación genética y la inhibición farmacológica de la enzima de degradación FAAH en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T}. Para ello, por un lado, cruzamos ratones transgénicos TDP43^{A315T} con ratones que carecían de la enzima FAAH (FAAH^{-/-}) para generar ratones dobles mutantes TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}, y, por otro lado, administramos URB597, un inhibidor selectivo de la FAAH, en ratones TDP43^{A315T}. Observamos, alternativamente, que el aumento del tono cannabinoide mediante la delección genética de la enzima FAAH redujo la progresión agresiva de la enfermedad con respecto a lo observado en los animales TDP43^{A315T}, aunque no se observaron efectos significativos en el comportamiento con la inhibición farmacológica de esta enzima. Sin embargo, ambas estrategias de inhibición de FAAH mostraron un aumento en la supervivencia de

las motoneuronas espinales en comparación con los animales TDP43^{A315T} control. Además, tanto la inhibición genética como el tratamiento con URB597 disminuyeron la inmunorreactividad de GFAP. Sin embargo, aunque la ablación genética redujo los niveles de inmunorreactividad de Iba1, el tratamiento con URB597 no logró el mismo efecto. A pesar de esto, URB597 sí disminuyó los niveles de expresión de varios marcadores genéticos asociados con un fenotipo de microglía relacionado con la enfermedad. Estos hallazgos sugieren que la inhibición de FAAH, tiene un importante potencial neuroprotector en el modelo de ELA TDP43^{A315T}, lo que respalda la idea de que la modulación farmacológica de esta enzima puede tener un valor terapéutico en la ELA.

Por último, en el **capítulo 3**, nuestro objetivo ha sido investigar el papel de la proteína BiP (también conocida como GRP78 o Hspa5), en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}. BiP es una proteína chaperona recientemente identificada como un nuevo interactivo y modulador del receptor CB₁. Dado que la activación del receptor CB₁ ha mostrado efectos neuroprotectores en modelos de ELA, y que BiP ha demostrado un papel neuroprotector en la ELA, la interacción entre BiP y el receptor CB₁ podría tener un papel importante en la patología de esta enfermedad. Para desarrollar este objetivo, cruzamos ratones con una ablación parcial del gen BiP (ratones BiP^{+/-}) con ratones transgénicos SOD1^{G93A} para generar ratones mutantes dobles SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}. Los animales dobles mutantes presentaron un mayor deterioro neurológico y una muerte más temprana en comparación con los ratones transgénicos SOD1^{G93A}. Por otro lado, los animales SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} no mostraron diferencias en la supervivencia neuronal con respecto a los animales SOD1^{G93A}, pero sí presentaron mayores niveles de inmunorreactividad de marcadores de microglía y de astrocitos. Además, el análisis morfológico demostró una mayor activación de la microglía y los astrocitos, caracterizados por un mayor tamaño del cuerpo celular y procesos más cortos, en los mutantes dobles en comparación con los ratones SOD1^{G93A}. Nuestros datos indican que la ausencia parcial de BiP empeora la patología en el modelo de ELA SOD1^{G93A} y, por tanto, que la desregulación de la proteína BiP podría contribuir a la patogénesis de la ELA. Esta contribución a la patología podría deberse a una pérdida de los efectos beneficiosos de la activación del receptor CB₁ observados en modelos experimentales de ELA, ya que se hemos observados niveles significativamente reducidos del receptor CB₁ en ratones SOD1^{G93A} con delección parcial del gen BiP. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral aportan un mayor número de evidencias que demuestran que la modulación farmacológica de elementos del sistema endocannabinoide puede ser una estrategia terapéutica prometedora para la ELA.

ABSTRACT

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease marked by the progressive death of upper and lower motor neurons, which are responsible for transmitting nerve impulses to muscle fibers. The degeneration of these neurons results in symptoms of progressive muscle weakness, muscle atrophy, and, in the later stages, paralysis of the muscles. This leads to the death of patients within 3 to 5 years after the onset of symptoms, usually due to paralysis of the diaphragm muscles.

ALS has a varied etiology with a significant genetic component. Mutations have been identified in more than 30 genes that either cause or increase the risk of developing ALS, among which C9orf72, SOD1, TARDBP, and FUS are notable. The genes related to the disease participate in a variety of cellular functions. In this sense, neuronal degeneration in ALS results from the disruption of multiple interrelated pathogenic mechanisms, including excitotoxicity, oxidative stress, mitochondrial damage, axonal transport failure, protein aggregation, neuroinflammation, and muscular alterations.

Despite intense research in recent years, therapeutic options for ALS remain limited and ineffective. Therefore, there is an urgent need to develop effective treatments that can modify the disease's progression. In this context, modulation of the endocannabinoid system has emerged as a promising therapeutic target. The endocannabinoid system, comprising cannabinoid receptors, endocannabinoids, and metabolic enzymes, plays a crucial role in regulating various physiological processes, including modulation of inflammation and excitotoxicity—factors relevant to ALS pathogenesis. Several studies have described alterations in the elements of the endocannabinoid system during disease progression, which may reflect endogenous protective responses or result from the disease's advancement. Therefore, enhancing or inhibiting these changes pharmacologically represents a potential strategy for modifying disease progression.

The primary objective of this Doctoral Thesis is to delve into the therapeutic potential of modulating the endocannabinoid system in amyotrophic lateral sclerosis. To achieve this, three specific objectives were established, addressed in three different chapters of the thesis:

Objective 1: Investigate the effect of activating peripheral CB₂ receptors in the murine model of ALS SOD1^{G93A}.

Objective 2: Evaluate the neuroprotective potential of genetic ablation and pharmacological inhibition of the FAAH enzyme, responsible for cannabinoid degradation, in the murine model of ALS TDP43^{A315T}.

Objective 3: Examine the effects of partial deletion of the chaperone protein BiP, a new interactor of the CB₁ receptor, in the murine model of ALS SOD1^{G93A}.

To achieve these specific objectives, the first chapter of this Doctoral Thesis focuses on the first objective by exploring the impact of CB₂ receptors on ALS. Although the neuroprotective effect of CB₂ receptors in ALS has been extensively described, the specific contribution of peripheral CB₂ receptors to this effect is still unknown. Since these receptors are expressed in peripheral tissues, such as skeletal muscle, which play a crucial role in ALS pathology, **Chapter 1** of our research explores the potential neuroprotective effect of activating peripheral CB₂ receptors in the murine model of ALS SOD1^{G93A}. To this aim, we compared in the classic ALS SOD1^{G93A} model the effect of administering a CB₂ agonist that does not cross the blood-brain barrier (BBB) and, therefore, binds exclusively to peripheral CB₂ receptors, with that of an agonist capable of crossing the barrier and binding to both peripheral and central CB₂ receptors. Our data demonstrated that activation of peripheral CB₂ receptors produced significant improvements in the pathological phenotype in the SOD1^{G93A} model, like those observed with the activation of both peripheral and central CB₂ receptors. Additionally, spinal cord analysis showed that treatment with the peripheral agonist preserved the survival of motor neurons and produced anti-inflammatory effects, similar to those observed with the agonist capable of crossing the BBB. Our studies confirmed that the observed neuroprotection was not due to the peripheral compound crossing into the central nervous system (CNS) due to possible BBB alteration, thus confirming the neuroprotective effect of peripheral CB₂ receptor activation in our ALS model. Furthermore, treatments with both CB₂ agonists also showed beneficial effects on skeletal muscle, preserving neuromuscular junctions in the disease and reducing the expression of genes marking muscular alteration. These findings demonstrate that both combined and isolated activation of peripheral CB₂ receptors are neuroprotective in the SOD1^{G93A} ALS model. These beneficial effects might be attributed to the specific activation of CB₂ receptors in the skeletal muscle.

In **Chapter 2**, we aimed to analyze the neuroprotective effect of increasing endocannabinoid levels through genetic deletion and pharmacological inhibition of the FAAH enzyme in the TDP43^{A315T} mouse model of ALS. To achieve this, we crossed TDP43^{A315T} transgenic mice with FAAH knockout mice (FAAH^{-/-}) to generate double mutant TDP43^{A315T} FAAH^{-/-} mice, and administered URB597, a selective FAAH inhibitor, to TDP43^{A315T} mice. We observed that increasing cannabinoid tone through genetic deletion of FAAH reduced the aggressive progression of the disease compared to what was observed in TDP43^{A315T} animals. However, no significant effects were observed on behavior with the pharmacological inhibition of this enzyme. Nonetheless, both FAAH inhibition strategies showed an increase in the survival of spinal motor neurons compared to control TDP43^{A315T} animals. Additionally, both genetic inhibition and treatment with URB597 reduced GFAP immunoreactivity. However, while genetic deletion reduced Iba1 immunoreactivity levels, URB597 did not achieve the same effect. Despite this, URB597 did decrease the expression levels of several genetic markers associated with a disease-related microglial phenotype. These findings suggest that FAAH inhibition has significant neuroprotective potential in the TDP43^{A315T} ALS model, supporting the idea that pharmacological modulation of this enzyme could have therapeutic value in ALS.

ABSTRACT

Finally, **Chapter 3** aimed to investigate the role of the BiP protein (also known as GRP78 or Hspa5) in the SOD1^{G93A} mouse model of ALS. BiP is a chaperone protein recently identified as a new interactor and modulator of the CB₁ receptor. Given that activation of the CB₁ receptor has shown neuroprotective effects in ALS models, the interaction between BiP and the CB₁ receptor could play an important role in the pathology of this disease. To address this objective, we crossed mice with a partial deletion of the BiP gene (BiP^{+/-}) with SOD1^{G93A} transgenic mice to generate double mutant SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} mice. The double mutant animals exhibited greater neurological impairment and earlier death compared to SOD1^{G93A} transgenic mice. On the other hand, SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} animals did not show differences in neuronal survival compared to control animals but did present higher levels of immunoreactivity for microglial and astrocyte markers. Furthermore, morphological analysis showed increased activation of microglia and astrocytes, characterized by larger cell bodies and shorter processes, in the double mutants compared to objective mice. Our data indicate that partial BiP absence worsens pathology in the SOD1^{G93A} model of ALS, suggesting that BiP dysregulation could contribute to ALS pathogenesis. This contribution to pathology could be due to a loss of the beneficial effects of CB₁ receptor activation observed in experimental ALS models, as significantly reduced levels of the CB₁ receptor were observed in SOD1^{G93A} mice with partial BiP gene deletion. However, additional studies are needed to confirm this hypothesis.

Overall, the results obtained in this Doctoral Thesis provide substantial evidence that pharmacological modulation of endocannabinoid system elements may be a promising therapeutic strategy for ALS.



ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoil glicerol
Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
γ-AChR	Receptores de acetil colina formados por subunidades γ
ABHD6	Enzima hidrolasa alfa/beta 6
ABHD12	Enzima hidrolasa alfa/beta 12
AC	Adenilato ciclase
AEA	Anandamida
AChR	Receptor de acetilcolina (<i>acetylcholine receptor</i>)
ADNc	ADN complementario
AKT	Proteína quinasa B
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	AMP cíclico
APOE	Apolipoproteína E
Ara-G	N-araquidonoil glicina
Ara-S	N-araquidonoil serina
ARE	Elemento de respuesta antioxidante (<i>antioxidant response element</i>)
ARNm	ARN mensajero
ASO	Oligonucleótido antisentido (antisense oligonucleotide)
ATP	Adenosín trifosfato
ATF6	Factor de transcripción activador 6 (<i>activating transcription factor 6</i>)
BiP	Chaperona molecular de unión a inmunoglobulinas (<i>binding immunoglobulin protein</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
BTX	Bungarotoxina
CALM1	Calmodulina-1
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBG	Cannabigerol
CBC	Cannabicromeno
CBN	Cannabinol
CD44	Clúster de diferenciación 44
CD68	Clúster de diferenciación 68
ChAT	Acetilcolintransferasa (<i>choline acetyltransferase</i>)
CHI3L1	Quitinasa 3 similar a las proteínas 1 (<i>chitinase 3-like protein 1</i>)
CHI3L2	Quitinasa 3 similar a las proteínas 2 (<i>chitinase 3-like protein 2</i>)
COL19A1	Colágeno tipo XIX alfa 1
COX	Ciclooxigenasa
Ct	Ciclo umbral
DAA	Astroцитos asociados a enfermedad (<i>disease-associated astrocytes</i>)
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
DAM	Microglía asociada a enfermedad (<i>disease-associated microglia</i>)
DENN	Expresados diferencialmente en células normales y neoplásicas (<i>differentially expressed in normal and neoplastic cells</i>)
DFT	Demencia frontotemporal
DPR	Acumulación de proteínas de dipéptidos repetidos (dipeptide repeat proteins)
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatorios de tipo 2 (<i>excitatory amino acid transporter 2</i>)
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELAF	Esclerosis lateral amiotrófica de tipo familiar

ABREVIATURAS

ELAe	Esclerosis lateral amiotrófica de tipo esporádico
EMA	European Medicine Agency
EMG	Electromiografía
EMT	Estimulación magnética transcraneal
FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos (<i>fatty acid amide hydrolase</i>)
FDA	Food and Drug Administration
FUS	Fusionada en sarcoma (<i>fused in sarcoma</i>)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (<i>gamma-aminobutyric acid</i>)
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G (<i>G protein-coupled receptors</i>)
GRP78	Proteína regulada por glucosa de 78 kDa (<i>glucose-regulated protein 78</i>)
GST	Glutation S-transferasa
GSH	Glutación reducido
GSR	Glutación Reductasa
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo (<i>genome-wide association studies</i>)
hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>)
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas (<i>high-performance liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
Hspa5	Proteína de choque térmico de 70 kDa 5 (<i>heat shock protein family A member 5</i>)
HDAC6	Histona desacetilasa 6
Iba1	Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>)
IFN-γ	Interferón γ
iNOS	Inhibidor de la sintasa de óxido nítrico inducible (<i>inducible nitric oxide synthase inhibitor</i>)
iPSC	Células madre pluripotentes inducidas (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
IL	Interleucina
IRE1	Enzima 1 que requiere inositol (<i>inositol-requiring enzyme 1</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (<i>insulin-like growth factor 1</i>)
IP3R	Receptores de inositol-1,4,5-trifosfato
LEA	Linoleoiletanolamida
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPI	Lisofosfatidilinositol
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MEF2C	Factor de Mejora de Miocitos 2c (<i>myocyte enhancer factor 2C</i>)
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
mSOD1	SOD1 mutada
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAPE-PLD	NAPE fosfolipasa D
NAPE	N-acilfosfatidiletanolamina
NAAA	N-aciletanolamina ácido amidasa
NAEs	N-aciletanolaminas
NAT	N-aciltransferasa
NfL	Neurofilamento de cadena ligera
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRF2	Factor nuclear eritroide similar al factor 2 (<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
NO	Óxido nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NOX2	NADPH oxidasa 2

OEA	N-oleoiletanolamina
p75^{NTR}	Receptor de neurotrofina (<i>p75 neurotrophin receptor</i>)
PPARs	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PEA	N-palmitoiletanolamina
PB	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PERK	Quinasa similar a la proteína quinasa del retículo endoplásmico (<i>protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>)
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PN	Día post natal
PrP	Promotor de la proteína priónica
qPCR	PCR cuantitativa (<i>quantitative PCR</i>)
RAN	Asociada a repeticiones no iniciada por ATG (<i>repeat-associated non-ATG</i>)
RE	Reticulo endoplásmico
RIPA	Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEC	Sistema endocannabinoide
SOD1	Superóxido dismutasa 1
SNC	Sistema nervioso central
SNX10	Nexina 10
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	Tampón salino Tris
TARDBP	Gen para la proteína de unión al ADN TAR (<i>TAR DNA-binding protein</i>)
TDP43	Proteína 43 de unión a ADN TAR (<i>TAR DNA-binding protein 43</i>)
TDP43h	TDP43 humano
TGFβ	Factor de crecimiento transformante β (<i>transforming growth factor β</i>)
THCV	Tetrahidrocannabivarina
TLR	Receptor tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TRP	Receptores de potencial transitorio (<i>transient receptor potential receptors</i>)
TRPV1	Receptores vanilloides de tipo 1
TREM2	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 2 (<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>)
TX	Triton
UPS	Sistema de ubiquitina-proteasoma (<i>ubiquitin-proteasome system</i>)
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>unfolded protein response</i>)



INTRODUCCIÓN

1. ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa crónica sin cura, descrita por primera vez en 1869 por el médico Jean-Martin Charcot. Se caracteriza por la pérdida progresiva y específica de las motoneuronas superiores, las cuales se proyectan desde la corteza cerebral hasta el tronco encefálico y la médula espinal, así como de las motoneuronas inferiores, que se proyectan desde el tronco encefálico o la médula espinal hasta los músculos (Figura 1).

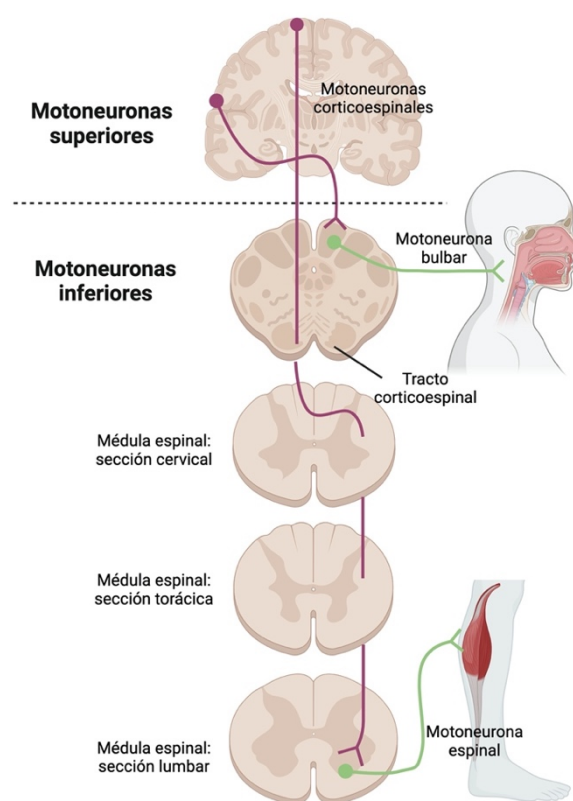


Figura 1: Esquema simplificado del sistema motor. Adaptado de (Brown & Al-Chalabi, 2017)

Según la hipótesis tradicional, esta pérdida de motoneuronas conduce a una denervación progresiva de los músculos y, como resultado, a un defecto en la ejecución de los movimientos voluntarios por parte de los músculos esqueléticos, que comienza inicialmente en un único área y posteriormente se extiende a diferentes regiones del cuerpo (Feldman et al., 2022). No obstante, de acuerdo con la hipótesis alternativa de la muerte retrógrada, el proceso degenerativo no se inicia en la motoneuronas, sino que lo hace en las terminaciones nerviosas distales y avanza retrógradamente a lo largo del axón hasta el soma de la motoneurona (Figura 2) (Dadon-Nachum et al., 2011).

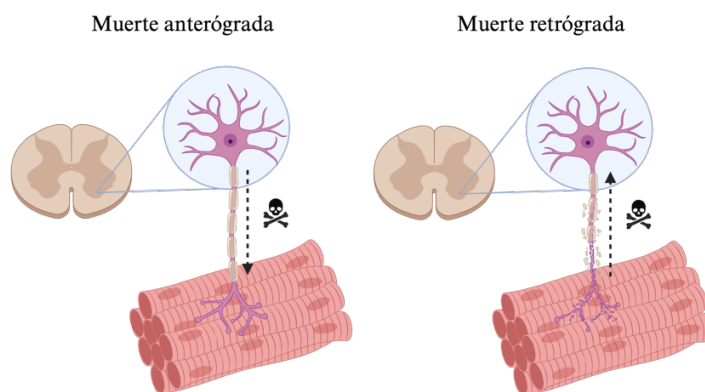


Figura 2: Representación esquemática del fenómeno de muerte anterógrada y retrógrada en la ELA. Imagen creada con BioRender.com

1.1. Manifestaciones clínicas de la ELA

Durante la progresión de la enfermedad, la pérdida de neuronas motoras superiores e inferiores en la corteza motora, en los núcleos del tronco encefálico y la médula espinal da lugar a una debilidad y atrofia muscular progresivas, acompañadas por fasciculaciones y calambres. La ELA suele tener un inicio focal, pero posteriormente se extiende a diferentes regiones del cuerpo, en dirección contralateral rostral y caudal. Finalmente, la mayoría de los pacientes mueren por insuficiencia respiratoria debido a una parálisis de los músculos del diafragma, aproximadamente de 3 a 5 años después del inicio de los síntomas.

La ELA puede clasificarse en bulbar, cuando la afectación comienza en las neuronas motoras superiores o en las motoneuronas inferiores presentes en el tronco del encéfalo; o espinal, cuando las neuronas motoras superiores o las inferiores ubicadas en la médula espinal están primariamente afectadas (Zaino et al., 2023). La manifestación más frecuente es la ELA de inicio espinal, que comienza con debilidad asimétrica e indolora en una extremidad. En estos pacientes, los síntomas clínicos incluyen debilidad, atrofia muscular y fasciculaciones en los músculos de las extremidades superiores o inferiores como signos de degeneración de la motoneurona inferior, e hiperreflexia e hipertonia, que reflejan la degeneración de la motoneurona superior. Por otro lado, únicamente un tercio de los pacientes presenta un inicio bulbar de la enfermedad. En estos casos, la debilidad comienza en los músculos bulbares, acompañada de atrofia lo que produce síntomas de disartria (dificultad con el habla) y disfagia (dificultad para tragar) así como disfonía y problemas para masticar (Feldman et al., 2022). La ELA de inicio bulbar es más común en mujeres y tiene un peor pronóstico, con una supervivencia media de aproximadamente dos años, y solo el 3% de los pacientes sobreviven más de diez años.

Además, en función de la afectación relativa de las neuronas motoras superiores frente a las inferiores y de las zonas afectadas, es posible realizar una clasificación más detallada de los diversos fenotipos motores que se observan en la ELA, como se ilustra en la **figura 3**. Sin embargo, es importante destacar que la ELA se caracteriza por la afectación simultánea de motoneuronas superiores e inferiores. Por lo tanto, cuando una condición muestra inicialmente afectación que parece ser exclusiva de motoneuronas superiores o inferiores, puede considerarse temporalmente como una posible ELA. Sin embargo, el diagnóstico de ELA solo se confirma si la enfermedad evoluciona para involucrar ambos tipos de motoneuronas. En contraste, si la afectación persiste en un solo tipo de motoneurona sin progresar, se clasificará como una enfermedad distinta a la ELA.

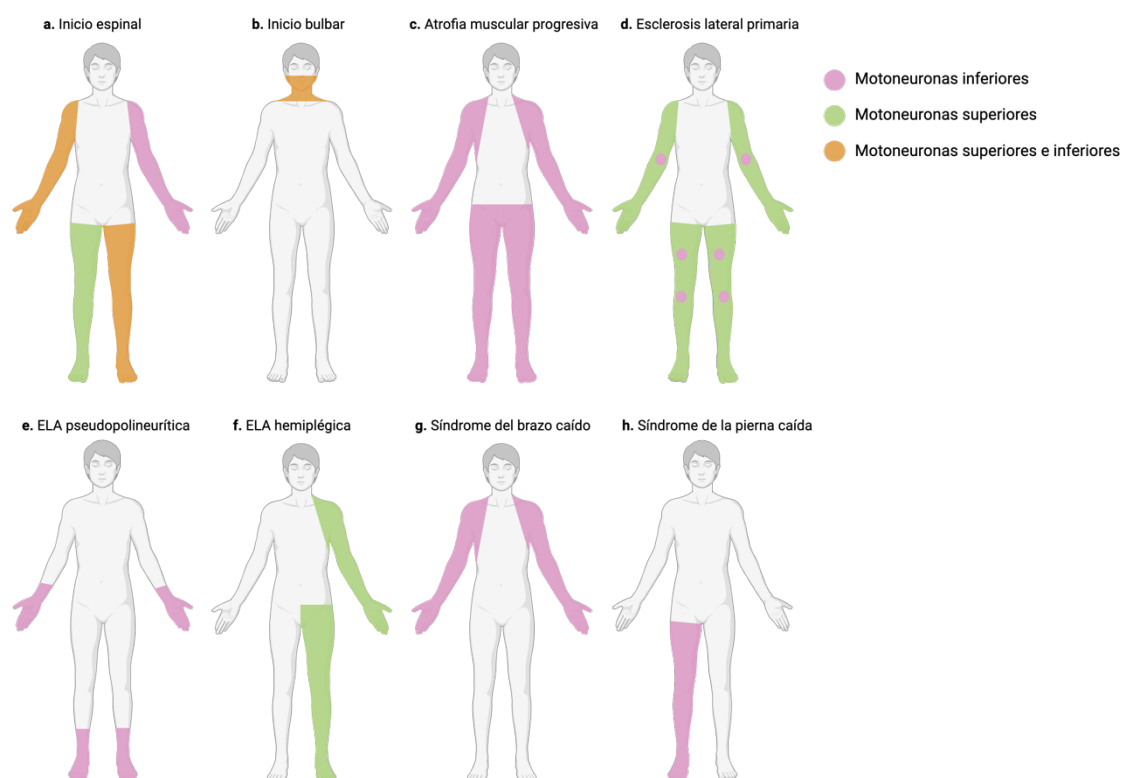


Figura 3: Enfermedades de la motoneurona. Clasificación según el patrón de afectación. En la ELA de inicio espinal, se observa afectación de motoneuronas inferiores (MNI) y motoneuronas superiores (MNs) en todas las extremidades (A). La ELA de inicio bulbar presenta afectación de MNI y MNs en los músculos bulbares (B). En la atrofia muscular progresiva, se detecta alteración de las MNI en las extremidades (C). En la esclerosis lateral primaria, la afectación se produce en las MNs de las extremidades, pero en etapas avanzadas se detecta cierta alteración de las MNI (D). En la ELA pseudopolineurítica, solo se alteran MNI en las extremidades distales (E). En la ELA hemipléjica, se observa una afectación unilateral de MNI (F). En el síndrome del brazo caído, se produce una degeneración de las MNI en las extremidades superiores (G). En el síndrome de la pierna caída, se afectan las MNI de las extremidades inferiores generalmente de manera asimétrica (H). Adaptado de (Swinnen & Robberecht, 2014).

Además, aunque los síntomas principales de la ELA están relacionados con la disfunción motora, aproximadamente el 50% de los pacientes con ELA desarrollan síntomas cognitivos y, en concreto, entre un 10% y un 15% cumplen los criterios diagnósticos para la Demencia Frontotemporal (DFT) (Elamin et al., 2011; Phukan et al., 2012). Estas dos enfermedades comparten

características clínicas, genéticas y patológicas, lo que ha llevado su agrupación dentro de un espectro clínico común (**BOX1**).

BOX 1: ESPECTRO DFT- ELA

La ELA y la DFT son dos trastornos neurológicos estrechamente relacionados, ya que comparten similitudes a nivel genético e histopatológico, así como características clínicas comunes. Inicialmente, la ELA y la DFT se consideraron dos enfermedades diferentes, con características clínicas particulares. La ELA se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas motoras, lo que conduce a la debilidad muscular, la espasticidad y la eventual pérdida de la función motora. Por otro lado, la DFT afecta principalmente a las regiones frontal y/o temporal del cerebro, resultando en cambios en el comportamiento, la personalidad y las funciones cognitivas, como la memoria. Sin embargo, posteriormente se detectó que algunos pacientes con DFT presentan síntomas motores y aproximadamente el 50% de los pacientes con ELA desarrollan síntomas cognitivos (Hardiman et al., 2017).

Además, de las similitudes clínicas, tanto la ELA como la DFT comparten mecanismos patológicos similares, como la acumulación de agregados proteicos. En concreto, la agregación de la proteína TDP43 es un evento común a ambas enfermedades que aparece en un 97% de los pacientes de ELA y en el 45% de los casos de DFT (Neumann et al., 2006). Por otro lado, a nivel genético, ambas enfermedades comparten mutaciones en genes causales de la patología como FUS, TARDBP y C9ORF72. De hecho, la presencia de expansiones del hexanucleótido GGGGCC en el gen C9ORF72 es la causa genética más común de ambas patologías, siendo responsable del 11% de todos los casos de ELA y del 13% de los casos de DFT, lo que refuerza la conexión entre ambas patologías (Abramzon et al., 2020).

Por tanto, la presencia de síntomas compartidos, así como de mecanismos moleculares similares, ha llevado a definir la ELA y la DFT como los extremos opuestos de un espectro clínico común, donde las manifestaciones clínicas y neuropatológicas se superponen en algunos casos.

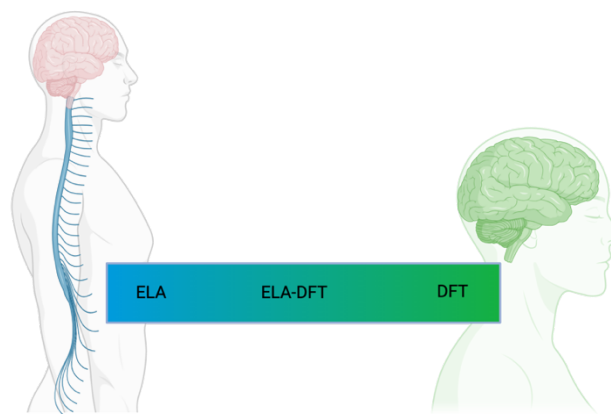


Figura 4: Esquema del espectro ELA-DFT. Adaptado de (Feldman et al., 2022)

1.2. Diagnóstico

El diagnóstico de la ELA sigue siendo complicado en la actualidad debido a la variabilidad en su presentación clínica, los posibles retrasos en la derivación a unidades de neurología por la falta de especificidad de los síntomas y la frecuente coexistencia de esta con otras enfermedades.

Actualmente, la evaluación clínica es el método principal para el diagnóstico de la ELA, aunque se apoya, además, en la utilización de estudios electrofisiológicos (análisis de conducción nerviosa y electromiografía (EMG)) que permiten evaluar la función de las neuronas motoras inferiores (Ramroop & Cruz, 2024), y estudios de neuroimagen como la resonancia magnética y la tomografía por emisión de positrones del cerebro y la médula espinal. Con estas técnicas de imagen, además se persigue descartar otras posibles causas para la aparición de los síntomas (infecciones víricas, esclerosis múltiple, otras enfermedades neuromusculares, tumores...), así como detectar signos de degeneración axonal en el sistema nervioso periférico (Vidovic et al., 2023).

A lo largo de los años, se han desarrollado y modificado diversos criterios diagnósticos con el objetivo de mejorar la precisión y efectividad en el diagnóstico de esta enfermedad neurodegenerativa. Los primeros criterios diagnósticos consensuados en la ELA fueron los Criterios de El Escorial, en 1994, y los Criterios El Escorial Revisados (2000). Estos criterios se basan en la evaluación clínica y electrofisiológica de signos que ponen de manifiesto afectación de las neuronas motoras (debilidad muscular, fasciculaciones, disartria, etc) (Brooks, 1994; Brooks et al., 2000). Sin embargo, aunque estos criterios unificados supusieron un avance importante, en algunos casos se observaba que tenían una baja sensibilidad, sobre todo debido a la forma de considerar los datos provenientes de los registros electromiográficos. Es por esta razón que se decidió modificar, en parte, estos criterios estableciendo los criterios Awaji-Shima (Carvalho & Swash, 2009), que permitían un mayor sensibilidad y especificidad del diagnóstico de ELA al añadir hallazgos adicionales en la EMG como signos de afectación de las neuronas motoras inferiores que no se consideraban previamente. Sin embargo, ninguno de estos criterios abarca completamente la variedad de presentaciones de la enfermedad. Por ello, recientemente se han publicado los criterios de Gold Coast, que tienen como objetivo simplificar la evaluación diagnóstica (Shefner et al., 2020). De esta forma, para que un paciente sea diagnosticado con ELA, debe presentar un deterioro motor progresivo que haya comenzado con una función motora normal. Además, debe haber disfunción tanto de la neurona motora superior como de la neurona motora inferior en al menos una región corporal, o en dos regiones corporales si solo se afecta la neurona motora inferior. Asimismo, las investigaciones diagnósticas deben excluir otras enfermedades mediante estudios de conducción nerviosa, EMG, resonancia magnética y pruebas de fluidos según sea necesario. Cabe destacar que, en los criterios Gold Coast, también se tiene en cuenta la inclusión de manifestaciones cognitivas y conductuales, admitiendo que la ELA puede afectar más allá del

sistema motor. Además, se reconoce el potencial de nuevos biomarcadores, tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo (LCR), recientemente identificados en el diagnóstico de la ELA.

La búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y la evaluación de la progresión de ELA ha sido una prioridad para diversos grupos en los últimos años, lo que ha llevado a identificar a los neurofilamentos de cadena ligera (NfL). Los pacientes de ELA presentan un aumento en los niveles de NfL, detectable a niveles similares en muestras de LCR y suero (Vacchiano et al., 2021; Shi et al., 2022). De hecho, en pacientes con mutaciones genéticas relacionadas con la ELA, se ha detectado que este incremento se produce en etapas presintomáticas, hasta 12 meses antes de la aparición de los primeros síntomas, demostrando el valor del NfL como biomarcador (Paganoni et al., 2014). Sin embargo, este es un indicador de lesión neuronal o axonal por lo que se encuentra aumentado en diversas enfermedades neurodegenerativas (Khalil et al., 2018; Verde et al., 2019). Por ello, al no ser específico, no sirve como elemento de diagnóstico, pero tiene un gran valor predictivo del impacto de tratamientos durante ensayos clínicos. Además, se ha observado que los niveles de NfL se correlacionan inversamente con el pronóstico de la enfermedad (Behzadi et al., 2021; Shi et al., 2022). Es decir, concentraciones más altas de NfL suelen indicar una progresión más rápida de la enfermedad. En este sentido, se ha descrito que los pacientes con un inicio de ELA bulbar, que generalmente presentan una menor supervivencia, presentan un aumento mayor en los niveles de NfL, lo que subraya la utilidad del NfL como biomarcador para determinar el pronóstico en pacientes con ELA.

Otro posible biomarcador de la ELA propuesto es el receptor de neurotrofina p75 (p75^{NTR}, del inglés *p75 neurotrophin receptor*). Este receptor se relaciona con el desarrollo y maduración de nervios motores y sensitivos. Sin embargo, en condiciones de muerte neuronal se detecta como marcador en las motoneuronas apoptóticas y en las células de Schwann. El dominio extracelular de p75^{NTR} se escinde después de la unión de ligandos proapoptóticos y, por lo tanto, la fracción soluble puede detectarse en la orina. Se ha observado que su aumento se correlaciona con la progresión de la enfermedad en pacientes con ELA, pero también en otras enfermedades neurodegenerativas, lo que sugiere su potencial utilidad como un marcador de la evolución de la enfermedad (Shepherd et al., 2017).

Además, dado que los procesos inflamatorios desempeñan un papel significativo en la progresión de la enfermedad, se han descrito también biomarcadores relacionados con la neuroinflamación en pacientes de ELA. Concretamente, se ha observado que las quitinasas (enzimas hidrolíticas presentes en el sistema nervioso central en microglía y astrocitos), y sus proteínas relacionadas (CHIT-1, CHI3L1, CHI3L2) aumentan en el LCR a medida que progresa la ELA (Vu et al., 2020).

1.3. Epidemiología y etiología

La ELA ocupa el tercer lugar entre las enfermedades neurodegenerativas más comunes, solo por detrás de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson. Aunque es una de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes, la ELA sigue siendo clasificada como una enfermedad rara en términos generales. Su incidencia oscila entre 2 y 3 casos por cada 100,000 personas anualmente (Mead et al., 2023). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que la incidencia de la ELA podría estar en aumento debido probablemente al envejecimiento de la población o a una mejora en el diagnósticos temprano de la enfermedad (C. A. Brown et al., 2021). No obstante, existen variaciones en la incidencia y en las características clínicas de la ELA dependiendo de la región geográfica de estudio. Por ejemplo, en el norte de Europa aparecen las mayores tasas de incidencia, mientras que en el sur y este de Asia se observa la menor incidencia (Xu et al., 2020). Por otro lado, la ELA presenta una baja prevalencia, entre 6 y 9 casos por cada 100,000 habitantes, debido a la corta esperanza de vida de los pacientes (Mead et al., 2023). En cuanto a la edad de inicio, la ELA es el trastorno neurodegenerativo más común entre las personas de mediana edad, generalmente manifestándose alrededor de los 40-60 años (Masrori & Van Damme, 2020). Los hombres tienen ligeramente mayor riesgo de padecerla en comparación con las mujeres, con una proporción de alrededor de 1.35:1. No obstante, esta disparidad de género tiende a reducirse en los casos en los que la enfermedad se desarrolla en edades más avanzadas (Fontana et al., 2021).

La ELA ha sido tradicionalmente categorizada en dos tipos basándose en la presencia o ausencia de un historial familiar de la enfermedad (Gros-Louis et al., 2006):

1. **ELA familiar (ELAf):** representa aproximadamente entre el 5% y el 10% de todos los casos de la enfermedad e incluye pacientes con un historial familiar de ELA. Este subtipo está asociado con mutaciones genéticas en genes con diversas funciones biológicas y que se heredan siguiendo un patrón de herencia autosómica dominante.
2. **ELA esporádica (ELAe):** representa cerca del 95% de todos los casos de ELA y se presenta en individuos sin historial familiar de la enfermedad. A pesar de que la causa exacta no se comprende en su totalidad, se han descrito distintos factores genéticos, en combinación con factores ambientales, que pueden producir el desarrollo de la patología.

En cuanto a los factores genéticos, en ambos casos se han detectado mutaciones, con distinto grado de penetrancia, en más de 30 genes que son causantes o confieren un mayor riesgo de desarrollar ELA (Tabla 1). De estos genes, cuatro (C9ORF72, SOD1, TARDBP y FUS) son responsables de hasta el 70% de los casos de ELAf y del 15% de los casos de ELAe (Wang et al., 2023a) (**Figura 5**). Sin embargo, la ELA es una enfermedad genéticamente compleja en la que solo alrededor del 10-21% de los pacientes presentan una mutación monogénica, es decir, en un solo

INTRODUCCIÓN

gen (Mead et al., 2023). Es frecuente que, al realizar estudios genéticos tras el diagnóstico, los pacientes presenten mutaciones en varios de los genes descritos. Esto ha llevado a plantear la hipótesis de que la ELA puede tener una base oligogénica, en la que la expresión fenotípica de la enfermedad es el resultado de la interacción de múltiples genes. En este sentido, estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *genome-wide association studies*) en pacientes con ELA esporádica han revelado que la predisposición genética a esta enfermedad está influenciada por la presencia de múltiples variantes genéticas poco comunes en diferentes genes. Aunque estos genes no son identificables *a priori* como causantes de la ELA, se postula que la interacción de múltiples variantes genéticas contribuye al desarrollo de la enfermedad, especialmente cuando se combinan con factores ambientales (Shepherd et al., 2021).

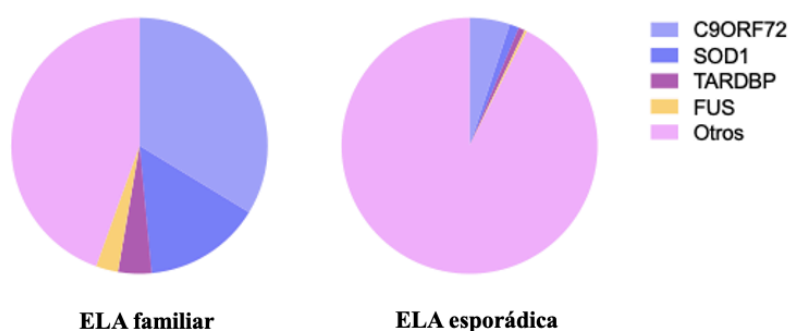


Figura 5: Diagrama esquemático de las mutaciones presentes en los casos de ELA esporádica y familiar.

Por otro lado, diversos metaanálisis han identificado varios factores ambientales como potenciales desencadenantes y contribuyentes al desarrollo de la ELA. Entre estos factores se incluyen el ejercicio físico intenso, el trauma craneal, la descarga eléctrica, el servicio militar (probablemente asociado al ejercicio físico intenso, la falta de sueño, el trauma y el estrés psicológico) y la exposición a pesticidas y plomo. Asimismo, se ha descrito también una relación en algunos estudios entre el tabaquismo y la aparición de la ELA, especialmente en mujeres (Wang et al., 2017; Zhu et al., 2023b). Sin embargo, los resultados respecto a esta relación son controvertidos, por lo que se necesita más investigación para comprender mejor esta asociación.

Gen	Proteína	Herencia	Función
SOD1	Superóxido dismutasa 1	AD/AR	Proteostasis, estrés oxidativo
SETX	Senataxina	AD	Metabolismo del ARN
ALS2	Alsina	AR	Trafico vesicular
DCTN1	Subunidad 1 de la dinactina	AD	Transporte axonal
VAPB	Proteína B/C asociada a proteínas de membrana asociadas a vesículas	AD	Proteostasis
CHMP2B	Proteína corporal multi vesicular cargada 2B	AD	Proteostasis, tráfico vesicular
TARDBP	Proteína de Unión al ADN de Respuesta Transactiva de 43 kDa	AD/AR	Metabolismo del ARN
FUS	Proteína de fusión del sarcoma	AD/AR	Metabolismo del ARN
FIG4	Polifosfatidil inositol fosfatasa	AD	Trafico intracelular
VCP	Proteína que contiene valosina	AD	Proteostasis
OPTN	Optineurina	AD/AR	Autofagia, neuroinflamación
ATXN2	Ataxina 2	AD	Metabolismo ARN
SIGMARI	Receptor intracelular no opioide tipo 1	AD/AR	Proteasoma, tráfico intracelular
UBQLN2	Ubiquilina 2	X	Proteostasis
SQSTM1	Proteína p62	AD	Autofagia, neuroinflamación
C9ORF72	Región no codificante marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9	AD	Trafico intracelular, autofagia, proteostasis
PFN1	Profilina 1	AD	Citoesqueleto, crecimiento axonal
HNRNPA1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1	AD	Metabolismo ARN
HNRNPA2B1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1	AD	Metabolismo ARN
TUBA4A	Cadena α 4A de la tubulina	AD	Citoesqueleto, transporte axonal
MATR3	Matrina 3	AD	Metabolismo ARN
CHCHD10	Proteína N27C7-4	AD	Función mitocondrial
TBK1	Proteína quinasa de unión a TANK	AD	Autofagia, neuroinflamación
ERBB4	Receptor tirosina proteína quinasa erbB4	AD	Desarrollo neuronal
NEK1	Proteína quinasa de relacionada con NIMA	AD	Reparación del DNA, ciclo celular
CCNF	Ciclina F	AD	Autofagia, fallos axonales
TIA1	Antígeno intracelular de linfocitos T1	AD	Metabolismo ARN, acumulación de TDP43
KIF5A	Miembro 5A de la familia de las kinesinas	AD	Trafico intracelular, fallos axonales
DNAJC7	Miembro 7 de la subfamilia C homóloga de DnaJ	AD/AR	Homeostasis proteica
GLT8D1	Proteína 1 que contiene el dominio de transferasa de glucosiltransferasa 8	AD	Síntesis de gangliósidos
SPTLC1	Serina palmitoiltransferasa, subunidad básica 1 de cadena larga	AD	Síntesis de gangliósidos

Tabla 1: Genes implicados en la patología de la ELA. AD: autosómica dominante, AR: autosómica recesiva, XD: ligada al cromosoma X. Adaptado de

A continuación, exploraremos con más detalle los genes más relevantes y su implicación en la patogénesis de la ELA.

1.3.1. SOD1

El gen *SOD1*, que codifica la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), fue identificado en 1993 como el primer gen asociado con la ELA (Rosen et al., 1993). SOD1 es una metaloenzima de 153 aminoácidos que se une al cobre y al zinc formando homodímeros. Se encuentra en el citosol y en el espacio intermembranoso de las mitocondrias, donde eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*) mediante la catálisis de los aniones superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (Eleutherio et al., 2021). Hasta la fecha, se han descrito más de 185 mutaciones diferentes en *SOD1*, lo que representa entre el 15 % de los casos de ELA^f y menos de un 2% de la ELA^e (Suzuki et al., 2023). La mayoría de las mutaciones en el gen *SOD1* son sustituciones en un solo nucleótido con cambio de sentido. Entre las mutaciones más frecuentes encontramos la mutación D90A, o la mutación G93A, que fue la primera identificada es la mutación y dio lugar al primer modelo de murino de ELA y el más estudiado (Berdyński et al., 2022; Ruffo et al., 2022). Estas mutaciones se transmiten generalmente de manera autosómica dominante, aunque también se han descrito patrones de herencia recesiva para ciertas variantes, como la mutación D90A. Por otro lado, las diferentes variantes genéticas en el gen *SOD1* se asocian con diferentes características clínicas como la edad de inicio, los síntomas clínicos y la supervivencia en la ELA. De este modo, algunas mutaciones, como por ejemplo la mutación A4V, están relacionadas con una forma agresiva de ELA, de progresión rápida y con una menor supervivencia, mientras que otras mutaciones, como la D90A, resultan en una progresión más lenta y una mayor supervivencia (Ghasemi & Brown, 2018).

En cuanto al posible mecanismo patogénico derivado de estas mutaciones en *SOD1* encontradas en los pacientes, se han postulado diversas hipótesis. Inicialmente, se creía que las mutaciones estaban asociadas con una disminución en la actividad enzimática de la proteína, ya que un alto porcentaje de las mutaciones identificadas llevaban consigo una pérdida de su capacidad antioxidante. Sin embargo, se observó que la gravedad de la enfermedad no guardaba correlación con la disminución de la actividad enzimática de SOD1. Además, aunque la ausencia de la proteína en un modelo murino generaba aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, no producía un fenotipo de ELA. Estos hallazgos sugirieron otro mecanismo, posiblemente una ganancia de función tóxica (Mejzini et al., 2019). De acuerdo con esta hipótesis, el daño oxidativo no surge debido a la disminución en la capacidad antioxidante de la enzima SOD1, sino porque SOD1 interactúa de manera anormal con otras proteínas intracelulares, lo que conlleva un incremento en la generación de ROS (Cozzolino et al., 2009; Hayashi et al., 2016)

1.3.2. TARDBP

El gen *TARDBP* (del inglés *TAR DNA-binding protein*) codifica la proteína 43 de unión a ADN TAR (TDP43 por sus siglas en inglés), una ribonucleoproteína nuclear heterogénea (hnRNP, del inglés *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) que desempeña un papel fundamental en la regulación de la expresión génica y el metabolismo del ARN.

La proteína TDP43 exhibe diversos dominios funcionales, que incluyen dos motivos de unión a ARN, una secuencia de localización nuclear, una señal de exportación nuclear y, en su región C-terminal, un dominio rico en glutamina/asparagina de tipo prión y una región rica en glicina. Específicamente, la región C-terminal de la proteína es crucial tanto en la interacción con otras hnRNP como en la regulación de la solubilidad de la proteína (Jo et al., 2020). En condiciones fisiológicas, TDP43 se encuentra predominantemente en el núcleo, donde participa en el empalme y transporte de ARN y en la biogénesis de ARNs no codificantes. Sin embargo, en condiciones de estrés celular puede translocarse al citoplasma, donde sus funciones incluyen la estabilización y traducción del ARN mensajero (ARNm), así como la formación y regulación de gránulos de estrés que limitan la traducción de ARNm no esenciales para la supervivencia (Nilaver & Urbanski, 2023). Además, los niveles de expresión de la proteína TDP43 están cuidadosamente regulados por mecanismos de autoregulación. De este modo, en situaciones de exceso en el núcleo celular, TDP43 promueve la degradación de su propio ARNm en lugar de su traducción en proteína. De la misma forma, una disminución de los niveles nucleares estimula su síntesis *de novo*. Por tanto, un descenso en los niveles de TDP43 nuclear podría desencadenar una sobreproducción de esta proteína (Mejzini et al., 2019).

En 2008, se identificaron las primeras mutaciones en el gen *TARDBP* como causa principal de la ELA y, hasta la fecha, se han identificado más de 50 mutaciones en el gen *TARDBP* relacionadas con la ELA, la mayoría de las cuales son de cambio de sentido y representan aproximadamente el 4% de los casos de ELA_f y el 1% de la ELA_e (Suzuki et al., 2023).

El mecanismo molecular exacto por el cual la proteína induce la activación de los procesos neurodegenerativos no está del todo esclarecido, pero parece que es el resultado de una combinación de una pérdida de función en el núcleo y de una ganancia de función tóxica en el citoplasma. Por un lado, las mutaciones en el extremo C-terminal, implicado en la interacción proteica, y en regiones que pueden provocar la traslocación de la proteína TDP43 hacia el citoplasma, aumentan la tendencia de la proteína a formar agregados en el citoplasma, un evento clave en la patología de la ELA, ya que la mayoría de los pacientes presentan agregados de esta proteína (Neumann et al., 2006). Por otro lado, el aumento de la traslocación de TDP43 al citoplasma, reduce los niveles de TDP43 nucleares, lo que resulta en fallos en el metabolismo del ARN debido a la pérdida de su función nuclear (de Boer et al., 2021).

1.3.3. C9ORF72

En 2011, se identificó una expansión de repetición del hexanucleótido (GGGGCC) (G₄C₂) en la región no codificante marco de lectura abierta 72 del cromosoma 9 (*C9ORF72*) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011; Gijssels et al., 2012) lo que resultó ser un hito importante, ya que, además de no ser una mutación puntual, es actualmente, la causa hereditaria más común de la ELA. Esta expansión se encuentra en aproximadamente en el 34% de los casos de ELA familiar y en el 5% de los casos de ELA esporádica (Suzuki et al., 2023). En individuos sanos, el número típico de repeticiones oscila entre 20 y 30 copias del gen, mientras que, en pacientes con ELA se observan cientos de copias de estas repeticiones. La relación entre el tamaño de la expansión de repeticiones y el fenotipo aún no está completamente dilucidada, en parte debido a las variaciones en el número de repeticiones de la expansión presentes en diferentes tejidos o células dentro del mismo individuo (Fang et al., 2022).

Se han descrito varias funciones del producto del gen *C9ORF72*. Se ha observado que este gen codifica tres transcritos diferentes que producen proteínas con dominios DENN (expresados diferencialmente en células normales y neoplásicas, del inglés *differentially expressed in normal and neoplastic cells*), que funcionan como factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, del inglés *guanine nucleotide exchange factor*) que regulan la actividad de Rab GTPasas. Se le atribuyen funciones en procesos celulares como el tráfico de vesículas, la homeostasis lisosomal, la señalización de mTORC1, la autofagia y la modulación de respuestas inflamatorias (Pang & Hu, 2021). Dentro de su función como regulador de la autofagia, se ha observado que *C9ORF72* se asocia con el receptor p62 y controla la eliminación de los gránulos de estrés.

Inicialmente, se sugirió que la pérdida de función del gen *C9ORF72* podría ser el mecanismo patogénico detrás de las mutaciones asociadas a ELA, ya que se observó en pacientes una reducción en los niveles de ARNm y de la proteína *C9ORF72*. Además, en pacientes con expansiones repetidas en *C9ORF72*, se detectó un aumento de los gránulos de estrés que co-localizaban con p62, lo que indica alteraciones en la autofagia y refuerza la hipótesis de una pérdida de función en estos casos (Chitiprolu et al., 2018). No obstante, estudios en ratones *knockout* para el gen *C9ORF72* no mostraron una pérdida significativa de neuronas motoras, lo que indica que este mecanismo podría no ser suficiente para explicar la patogénesis de la ELA (Koppers et al., 2015); en su lugar, la patología resulta de una combinación de los mecanismos de pérdida y ganancia de función. La ganancia de función se produce por dos mecanismos diferentes. En primer lugar, las repeticiones G₄C₂ en el gen *C9ORF72* pueden ser transcritas en ambas direcciones, lo que resulta en altas cantidades de ARN repetido. Estas secuencias repetidas de ARN tienden a agruparse entre sí y a interactuar con proteínas nucleares y otros ARN, acumulándose en el núcleo y formando agregados nucleares puntuales, conocidos como focos de ARN. Estos agregados de ARN son potencialmente tóxicos para la célula, ya que pueden capturar proteínas de unión al ARN que

bloquean la transcripción de otros genes (Barker et al., 2017). En segundo lugar, la ganancia de función se produce por la acumulación de proteínas de dipéptidos repetidos (DPR, del inglés *dipeptide repeat proteins*). La traducción de ARN repetido de *CgORF72* se realiza mediante una forma no convencional de traducción, conocida como traducción asociada a repeticiones no iniciada por ATG (traducción RAN, del inglés *repeat-associated non-ATG translation*). En este proceso, los ARNm que contienen repeticiones de trinucleótidos pueden generar proteínas sin un codón de inicio de traducción convencional, lo que da lugar a proteínas con secuencias de aminoácidos distintas a las que codificaría el ARNm. La traducción RAN de *CgORF72* resulta en la traducción de proteínas de DPR, compuestas por repeticiones de solo dos aminoácidos, lo que las hace anormales. Estas DPR forman inclusiones ubiquitinadas en el citoplasma celular en el cerebelo, hipocampo y otras regiones cerebrales de los portadores de la expansión. Además, se ha observado que algunos de estos DPR son altamente neurotóxicos (Breevoort et al., 2022). Asimismo, las expansiones G4C2, ya sea como resultado de los focos de ARN o de los DPR, pueden provocar otras alteraciones secundarias, como la disrupción del complejo de poro nuclear y del proceso de transporte nucleocitoplasmático (Ghasemi & Brown, 2018).

1.3.4. FUS

Otro gen implicado en el procesamiento del ARN es *FUS* (del inglés, *fused in sarcoma*), que fue identificado en el año 2009, como un gen vinculado a la ELA. La proteína codificada por este gen comparte diversas similitudes estructurales y funcionales con la proteína TDP43. *FUS* codifica una proteína de unión a ARN ubicua que presenta múltiples dominios, incluyendo uno de activación transcripcional en su extremo N-terminal, así como dominios de unión a ácidos nucleicos y una señal de localización nuclear en el extremo C-terminal (Assoni et al., 2023). Al igual que TDP43, *FUS* se localiza principalmente en el núcleo celular en condiciones fisiológicas, pero puede translocarse al citoplasma, donde también puede formar agregados en condiciones patológicas o asociado a la presencia de formas mutadas. Estos agregados se observan tanto en las células neuronales como en las gliales y no están asociados con otras modificaciones proteicas como la fosforilación o la ubiquitinación (Deng et al., 2014). Al igual que TDP43, *FUS* desempeña diversas funciones relacionadas con el metabolismo del ARN entre los que se incluyen procesos como la transcripción, el empalme alternativo, el transporte y la estabilidad del ARNm y la biogénesis de microARNs. Además, *FUS* también desempeña un papel importante en la reparación del ADN (Chen et al., 2019).

Se han identificado más de 50 mutaciones en *FUS*, la mayoría de sentido erróneo, autosómicas dominantes. Las mutaciones en *FUS* representan alrededor del 3% de los casos de ELA familiar y solo un 0,3% de la ELA esporádica (Zou et al., 2017; Suzuki et al., 2023). Cabe destacar que las mutaciones en *FUS* son responsables de más de la mitad de los casos de ELA juvenil (Wang et al., 2023b) y producen formas de la enfermedad más agresivas y con peor pronóstico (Grassano et al., 2022).

En lo que respecta a la patología asociada con la proteína FUS, hay evidencia tanto a favor de que sea causada por una disminución en su función como por un aumento en su actividad. Según la teoría de pérdida de función, la translocación de FUS al citoplasma resulta en una reducción de sus funciones nucleares. Sin embargo, modelos murinos *knockout* de FUS no exhibieron síntomas similares a la ELA (Kino et al., 2015), lo que sugiere que la falta de FUS por sí sola no es suficiente para desencadenar la enfermedad. Por otro lado, en ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína FUS humana, se detectaron anomalías motoras, pérdida neuronal y agregados de FUS en el citoplasma, lo cual reforzó la hipótesis de que una ganancia de función tóxica podría ser la causa subyacente principal en este tipo de ELA (Mitchell et al., 2013). Además, muchas de las mutaciones se encuentran en la señal de localización nuclear, lo que provoca la traslocación de FUS al citoplasma. En este compartimento, tanto el exceso de FUS en forma soluble como la formación de agregados de esta proteína pueden ser responsables de causar toxicidad a la célula (Feuillette et al., 2017).

1.4. Modelos murinos de ELA

Dada la gran heterogeneidad de la ELA, representada en una gran diversidad de subtipos genéticos y patológicos, así como variaciones en la velocidad de progresión y los síntomas clínicos; es necesario utilizar diferentes estrategias de modelización de la enfermedad que abarquen y representen distintos aspectos de esta enfermedad (Stephenson & Amor, 2017).

El descubrimiento de mutaciones en genes en pacientes con ELA familiar ha permitido crear modelos de la enfermedad en animales vivos, mediante la manipulación genética de genes asociados con la ELA. Actualmente, se dispone de diversos modelos animales de distinta complejidad para modelizar la enfermedad, incluyendo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *Danio rerio* (pez cebra), así como modelos murinos (Zhu et al., 2023c). Dado que en esta Tesis Doctoral se han utilizado dos modelos murinos como herramienta de estudio, nos centraremos en la descripción de estos modelos animales.

Los modelos murinos son fácilmente manejables y tienen ciclos de vida relativamente cortos, lo que facilita la realización de estudios a largo plazo. Además, a pesar de presentar diferentes mutaciones, convergen en fenotipos similares y reproducen muchas de las características de la ELA en un mamífero vivo, siendo esenciales en los estudios traslacionales. De hecho, los modelos de ratones genéticos han sido clave para dilucidar los mecanismos patogénicos de la ELA. Todo ello los convierte en el modelo preclínico más empleado para el estudio de la ELA (Todd & Petrucelli, 2022).

1.4.1. Modelos murinos basados en SOD1

Tras el descubrimiento de SOD1 como la primera mutación genética asociada a la ELA, se creó el primer ratón transgénico que sobreexpresaba la proteína humana con una sustitución de glicina por alanina en la posición 93 (SOD1^{G93A}). Este modelo reproduce muchos de los mecanismos patológicos observados en pacientes con ELA, como la formación de agregados citoplásmicos, gliosis y denervación muscular, además de la pérdida de motoneuronas, déficits motores, parálisis y muerte temprana (Gurney et al., 1994). Sin embargo, no muestra degeneración de las neuronas motoras en la corteza cerebral, una característica importante en pacientes humanos (Niessen et al., 2006). Hoy en día es el modelo que recapitula más síntomas de la enfermedad, aunque tiene bastantes limitaciones y solo representa un porcentaje pequeño del total de ELAs.

Además del modelo SOD1^{G93A}, se han creado otros modelos de ratón SOD1 con diferentes mutaciones (como SOD1^{G37R}, SOD1^{G86R} y SOD1^{G85R}), que presentan fenotipos diversos pero comparten características comunes como neuroinflamación, excitotoxicidad, alteraciones mitocondriales y del transporte axonal (Philips & Rothstein, 2015). El modelo SOD1^{G93A} sigue siendo uno de los más utilizados en la investigación de la ELA y ha contribuido a la validación de tratamientos para esta enfermedad como el riluzol (Gurney et al., 1998) y la edavarona (Ito et al., 2008).

1.4.2. Modelos murinos basados en TDP43

Se han desarrollado aproximadamente 20 modelos de ratón que sobreexpresan la proteína TDP43, basados en las variantes genéticas conocidas en pacientes con ELA familiar (Lutz, 2018). Estos modelos se crearon utilizando diferentes estrategias, como la sobreexpresión de TDP43 de tipo *wildtype* o mutante (A315T y M337V), bajo el control del promotor del gen de la proteína priónica. En estos modelos transgénicos, se observó la acumulación de agregados patológicos de proteínas ubiquitinadas en ciertas poblaciones neuronales, lo que resultó en alteraciones neuronales, gliosis, parálisis progresiva y muerte. Estos modelos han sido útiles para estudiar los mecanismos subyacentes de la ELA y evaluar posibles terapias (Wegorzewska et al., 2009; Xu et al., 2011). No obstante, el mayor problema de estos modelos es que TDP43 muestra una localización predominantemente nuclear y no reproduce la deslocalización y agregación en el citoplasma.

Por otro lado, se han desarrollado varios modelos de ratones *knock-in* para TDP43, incluyendo variantes como TDP43^{A315T}, TDP43^{M337V} y TDP43^{G298S}. En general, muestran fenotipos menos pronunciados en comparación con los modelos transgénicos. La degeneración neuronal en estos modelos suele observarse en etapas avanzadas de la vida y no presentan agregados proteicos. Sin embargo, hay una excepción con el modelo *knock-in* de TDP43^{N390D}, el cual muestra un fenotipo degenerativo más robusto. Estos ratones desarrollan pérdida progresiva de neuronas

motoras espinales, denervación muscular y problemas de locomoción a partir de los 6 meses de edad. Además, muestran una localización citoplasmática aberrante de TDP43 y, en etapas posteriores, se observan inclusiones positivas para TDP43 en las neuronas motoras (Todd & Petrucelli, 2022).

En el campo de la investigación sobre la ELA, la tendencia actual es utilizar ratones humanizados o modelos con pérdida de función para obtener un perfil más fisiológico de la enfermedad. No obstante, los modelos transgénicos siguen siendo valiosos para ciertos estudios, ya que permiten la investigación de mecanismos específicos y la evaluación de potenciales terapias.

Hasta la fecha, ningún modelo animal por sí solo recapitula todas las características de la enfermedad tal como se presentan en los seres humanos. Los tratamientos que demuestran ser efectivos en un modelo animal en ocasiones no son trasladables a pacientes humanos, ya que los mecanismos subyacentes y las manifestaciones de la enfermedad pueden variar significativamente entre especies (Bonifacino et al., 2021). Por lo tanto, para avanzar en la comprensión de la ELA y en el desarrollo de tratamientos efectivos, es fundamental validar los estudios en diferentes modelos de la enfermedad que se complementen entre sí.

1.5. Mecanismos patogénicos en la ELA

La causa exacta de la ELA aún no se comprende completamente, pero se sabe que es el resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales. Sin embargo, se desconoce el mecanismo patogénico exacto que produce la degeneración de las motoneuronas. No obstante, los investigadores coinciden en que la degeneración neuronal en la ELA es el resultado de la alteración de múltiples procesos celulares interrelacionados (**Figura 6**). Además, se sabe que la degeneración de las neuronas motoras y la progresión de la enfermedad no son exclusivamente causadas por un daño intrínseco dentro de estas neuronas, sino que también se ven afectadas por alteraciones en otros tipos de células con las que interactúan, incluidos los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos. Este fenómeno se conoce como muerte celular no autónoma (Schweingruber & Hedlund, 2022). A continuación, se describen los diversos mecanismos patogénicos implicados en la enfermedad.

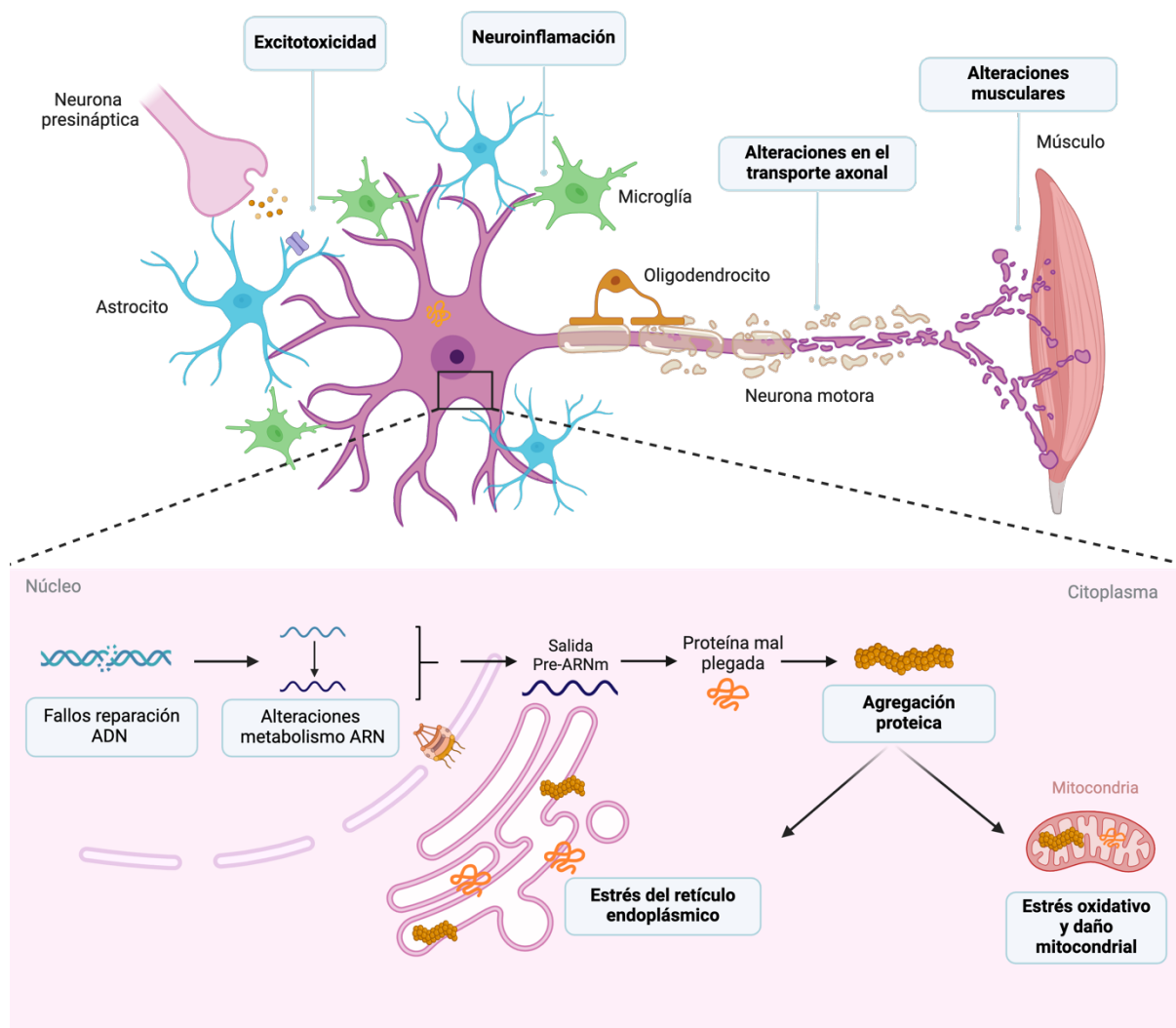


Figura 6: Esquema de la fisiopatología de la ELA. Adaptado de (Hardiman et al., 2017)

1.5.1. Agregación proteica

La presencia de acumulaciones de proteínas en las neuronas motoras y células gliales constituye un rasgo distintivo de la patogenia de la ELA (TDP43, SOD1 o FUS), común a otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson o la DFT. Así, en muestras *post mortem* de pacientes con ELA, se han detectado inclusiones citoplasmáticas que contienen agregados proteicos en neuronas motoras, astrocitos, microglía y oligodendrocitos en diversas áreas del sistema nervioso central (SNC), como la médula espinal, la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo. La presencia de estos agregados revela la existencia de fallos en el sistema de proteostasis durante la enfermedad (Blokhuis et al., 2013). La proteostasis es el conjunto de mecanismos celulares que regulan el correcto funcionamiento de las proteínas, asegurando que se encuentren en la concentración, ubicación y conformación óptimas. El mantenimiento de la proteostasis celular implica, por tanto, una precisa coordinación de diferentes procesos entre los

INTRODUCCIÓN

que se incluye el metabolismo del ARN. En líneas generales, una vez que se traduce el ARNm, las proteínas chaperonas intervienen para asegurar un plegamiento adecuado y prevenir la formación de proteínas anómalas y agregados proteicos. En caso de que las chaperonas no logren corregir el plegamiento anómalo de las proteínas, estas pueden ser marcadas con ubiquitina para su degradación a través del sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés *ubiquitin-proteasome system*) o mediante la autofagia selectiva, evitando así la acumulación de agregados proteicos. Sin embargo, cualquier alteración en alguno de estos componentes puede conducir a la acumulación de proteínas mal plegadas, produciendo toxicidad y daño neuronal (Lambert-Smith et al., 2022). En este sentido, en pacientes de ELA se han descrito inclusiones de agregados positivos para las proteínas ubiquitina, que marca otras proteínas para su degradación por el proteasoma, y p62, que reconoce las proteínas marcadas con ubiquitina para su degradación por autofagia, lo que sugiere fallos en el sistema UPS en la ELA (Lambert-Smith et al., 2022). Por otro lado, se han identificado mutaciones en genes asociados con la ELA que codifican proteínas potencialmente implicadas en la formación de agregados proteicos como UBQLN2, VCP y VAPB. Estas proteínas están involucradas en la degradación de proteínas mal plegadas, por lo que estas mutaciones, presumiblemente, favorecerían la presencia de inclusiones al impedir su correcta eliminación (Cicardi et al., 2021).

Cuando estos sistemas de control proteico no funcionan, las proteínas defectuosas se acumulan y forman agregados proteicos, una característica común en los pacientes de ELA. De hecho, el 97% de los pacientes con ELA, presentan agregados de TDP43, incluidos los pacientes de ELA_f sin variantes patogénicas en el gen *TARDBP* (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006) a excepción de los pacientes con mutaciones en *SOD1* y *FUS*, que representan el 3% restante (Mackenzie et al., 2007; Vance et al., 2009).

No obstante, estos agregados pueden producirse también como consecuencia de la presencia de estrés celular crónico. En situaciones de estrés celular, como en el estrés oxidativo, la prioridad de las células eucariotas es conservar la energía para permitir la supervivencia y una posterior posible recuperación. Para ello, en estas situaciones, TDP43, que tienen capacidad de agruparse gracias a sus dominios tipo prión, aumentan sus niveles en el citoplasma y se ensamblan con ARNm no implicados en la respuesta de estrés neuronal y con factores de represión de la traducción, formando estructuras condensadas en el citoplasma. Estas estructuras se conocen como gránulos de estrés y son estructuras transitorias sin membrana altamente dinámicas que ejercen una función prosupervivencia (Khalfallah et al., 2018) mediante la inhibición de la traducción de proteínas no esenciales (de Boer et al., 2021). Cuando cesa el estímulo estresante, las chaperonas moleculares desmantelan los gránulos de estrés, manteniendo un equilibrio entre su formación y desensamblaje. Sin embargo, cuando la situación que provoca el estrés se perpetua en el tiempo, los gránulos de estrés permanecen en la célula provocando alteraciones a nivel intracelular que puede llevar a la activación, por ejemplo, de procesos de degeneración celular. En muestras de pacientes con ELA las inclusiones patológicas de TDP43 colocalizan con marcadores de gránulos

de estrés, por lo que los gránulos de estrés crónicos podrían actuar como puntos de partida para la agregación no controlada de TDP43 a través de sus dominios tipo prión (Dudman & Qi, 2020).

Por otro lado, cabe destacar que algunas de las proteínas agregadas, como SOD1 o TDP43 presentan un comportamiento tipo prión. Por un lado, observamos este comportamiento en cuanto a la capacidad de inducir agregación de estas proteínas. Ambas, tiene segmentos de su secuencia que son propensos a formar fibrillas amiloides. Estas estructuras funcionan como un cebador que permite interactuar con otras proteínas normales y promover además un plegamiento incorrecto en ellas. Esta interacción puede llevar a la formación de oligómeros, que son pequeños agregados de proteínas, y luego a estructuras más grandes, como fibrillas o formaciones tipo amiloide que pueden, a su vez, acelerar la formación de nuevas fibrillas en un proceso autocatalítico, conduciendo en último término a la agregación de SOD1 o TDP43 (Chia et al., 2010; McAlary et al., 2019). En este sentido, se han detectado agregados de SOD1 *wildtype* en las neuronas motoras de pacientes con ELA esporádica que no tienen mutaciones en el gen *SOD1* (Forsberg et al., 2019) y agregados de TDP43 en pacientes con ELA esporádica sin mutaciones en el gen *TARDBP* (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Esto demuestra que incluso la forma *wildtype* de las proteínas SOD1 y TDP43 puede adoptar un plegamiento anormal y contribuir al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, su comportamiento tipo prión se manifiesta en su capacidad de transmisión entre células ya que las proteínas agregadas pueden ser liberadas en el espacio extracelular y ser internalizadas por células vecinas contribuyendo al desequilibrio proteostático en las células receptoras y perpetuando la agregación (Cicardi et al., 2021).

Aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual estos agregados proteicos contribuyen a la toxicidad celular en pacientes con ELA, parece que están implicados varios mecanismos (Duranti & Villa, 2022). Por un lado, la agregación proteica en las mitocondrias puede causar disfunción mitocondrial, aumentando así el estrés oxidativo en la célula (de Boer et al., 2021). De hecho, la supresión de la localización de TDP43 en las mitocondrias ha demostrado prevenir la disfunción mitocondrial inducida por TDP43, así como la pérdida neuronal, y mejorar los fenotipos en modelos de ratones transgénicos con mutaciones en TDP43 (Wang et al., 2016). Por otro lado, los agregados pueden ejercer toxicidad por su capacidad para unirse a ARN o proteínas necesarias para el funcionamiento normal de las neuronas motoras (Yang & Hu, 2016). Además, la agregación proteica también reduce la capacidad del proteasoma y la autofagia incrementando el desequilibrio en la proteostasis y dificultando la capacidad de la célula para plegar o degradar correctamente otras proteínas. Por ejemplo, en cultivos de células neuronales y en neuronas motoras de un modelo murino de SOD1, se ha observado que la agregación de SOD1 mutada (mSOD1) produce una disminución de la actividad de las chaperonas y del sistema de degradación proteica UPS (Lambert-Smith et al., 2022). Por último, se ha observado que estos agregados también alteran el transporte axonal al bloquear físicamente el transporte de las cargas (Guo, et al., 2020b).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE) provoca estrés en este orgánulo, activando una respuesta protectora conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*). Esta respuesta busca corregir las proteínas mal plegadas y restaurar la proteostasis mediante la reducción temporal de la síntesis de proteínas no esenciales, la activación de chaperonas que ayudan en el plegamiento de proteínas, como la chaperona BiP, el aumento de factores que promueven la maduración y el control de calidad de las proteínas (Melo et al., 2022). En pacientes con ELA, se observó un aumento en proteínas relacionadas con el estrés del RE y la UPR; incluyendo un aumento de chaperonas como la proteína BiP (Vats et al., 2018). De manera similar, en un modelo de ratones transgénicos que expresan mSOD1 se detectaron agregados de SOD1 en el RE, acompañado de activación de las vías de señalización del RE (Kikuchi et al., 2006). En conjunto, estos cambios indican que, durante la progresión de la ELA, se produce estrés del RE y la activación de la UPR como respuesta protectora.

BOX2: BIP EN EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

La chaperona molecular de unión a inmunoglobulinas (BiP, del inglés *binding immunoglobulin protein*), también conocida como proteína regulada por glucosa de 78 kDa (GRP78, del inglés *glucose-regulated protein 78*) o proteína de choque térmico de 70 kDa 5 (Hsp α 5, del inglés *heat shock protein family A member 5*) se localiza en el RE, aunque también se ha detectado en el citosol (Costas-Insua et al., 2021). En el RE donde actúa como chaperona, facilitando el transporte de proteínas hacia el RE y la eliminación de aquellas que están mal plegadas mediante su transporte hacia el citoplasma. Además, desempeña un papel crucial en la UPR, donde, en ausencia de estrés del RE, inhibe la expresión de tres factores esenciales para esta respuesta: la enzima 1 que requiere inositol (IRE1, del inglés *inositol-requiring enzyme 1*), la quinasa similar a la proteína quinasa del retículo endoplásmico (PERK, del inglés *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6, del inglés *activating transcription factor 6*). En condiciones de estrés del RE, BiP se libera de su interacción con IRE1, PERK y ATF6 lo que permite que estos factores se activen y desencadenen respuestas adaptativas, como el aumento de la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la UPR como chaperonas, que permitan el correcto plegamiento de las proteínas (**Figura 7**) (Shen et al., 2002; Kopp et al., 2019).

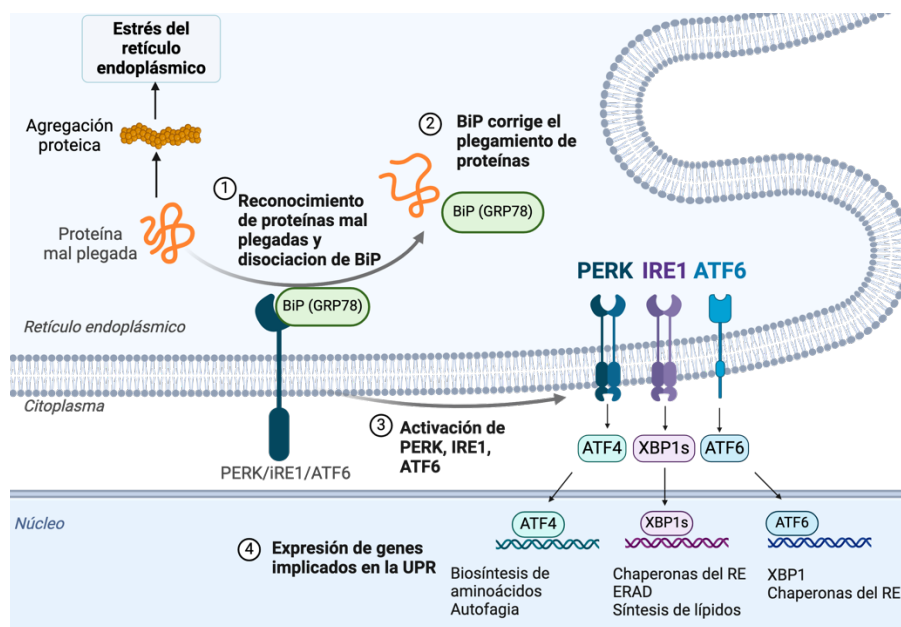


Figura 7: Esquema del mecanismo de acción de BiP en la UPR.

La expresión de BiP disminuye con el envejecimiento, sin embargo, en las enfermedades neurodegenerativas, su expresión parece aumentar o disminuir dependiendo de la etapa de la enfermedad y de los procesos patológicos asociados. En este sentido, se ha observado que la modulación específica de los niveles de esta proteína permite obtener beneficios en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, se observó que su inducción en modelos de enfermedad de Parkinson y de degeneración retinal tenía efectos beneficiosos como la reducción de la apoptosis y el aumento de la supervivencia neuronal (Gorbatyuk & Gorbatyuk, 2013), mientras que en un modelo de la enfermedad de Huntington, se obtuvieron mejoras de los déficits en la memoria con la disminución de los niveles de BiP (Espina et al., 2023). Por tanto, estos datos muestran que la modulación de los niveles de BiP es una estrategia terapéutica potencial en las enfermedades neurodegenerativas.

1.5.2. Excitotoxicidad

Otro de los mecanismos patogénicos característicos de la ELA es la excitotoxicidad. Se define como el efecto neurotóxico sobre las neuronas que un incremento de la actividad de los receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato (Van Damme et al., 2005). Los cambios en la señalización glutamatérgica desencadenan una mayor excitabilidad en las motoneuronas, lo que resulta en descargas espontáneas en las fibras musculares que inervan, manifestándose como fasciculaciones (de Carvalho et al., 2017). La excitotoxicidad puede surgir debido a dos causas: una actividad presináptica excesiva (debida a un aumento de la liberación de neurotransmisores excitatorios o a defectos en la recaptación) y/o a una respuesta anormal de las neuronas postsinápticas a los estímulos excitatorios (debido a alteraciones en las interneuronas, en los receptores de glutamato o en la excitabilidad de las neuronas).

Por un lado, la excitotoxicidad puede ocurrir por una actividad presináptica excesiva debido bien a un aumento en la liberación de glutamato o bien, a defectos en la recaptación de este neurotransmisor por parte de los astrocitos. El incremento en la liberación de glutamato puede deberse a un aumento en los niveles de calcio intracelular, ya sea por una mayor entrada desde el espacio extracelular, por la liberación desde el RE o por cambios en las proteínas efectoras fijadoras de calcio que disminuyan su capacidad para amortiguar el calcio en el citoplasma. Este aumento de calcio intracelular desencadena una mayor liberación del neurotransmisor y, además, puede provocar estrés en el RE y daño a nivel mitocondrial (Armada-Moreira et al., 2020). El aumento del glutamato en la hendidura sináptica también se puede producir por una disminución de su recaptación por parte de los astrocitos a través del transportador de aminoácidos excitatorios de tipo 2 (EAAT2, del inglés *excitatory amino acid transporter 2*) (Allaman et al., 2011). En la ELA, se ha observado una reducción del transportador EAAT2 tanto en la corteza como en la médula espinal en tejidos *post mortem* de pacientes (Sasaki et al., 2000), así como en ratones en el transportador de glutamato GLT1 en el modelo murino SOD1^{G93A} (Warita et al., 2002). En este modelo, también se ha detectado una disminución en los niveles de proteínas fijadoras de calcio (Bernard-Marissal et al., 2012), un aumento en la liberación de glutamato, niveles elevados de calcio en las terminales nerviosas y una mayor activación de enzimas y proteínas relacionadas con la liberación sináptica, lo que sugiere una actividad presináptica exacerbada (Milanese et al., 2011).

Por otro lado, una respuesta inapropiada al glutamato de las neuronas postsinápticas ante los estímulos excitatorios también puede producir excitotoxicidad. Esto puede ser debido a alteraciones en la inhibición mediada por las interneuronas, en la expresión o función de los receptores de glutamato o en la excitabilidad intrínseca de las neuronas postsinápticas. En este sentido, las interneuronas son indispensables para la modulación de la actividad sináptica al regular la inhibición y excitación de las neuronas en el cerebro mediante la liberación de neurotransmisores como el GABA (Ácido γ -aminobutírico, del inglés γ -*amino butyric acid*) que inhiben la actividad

neuronal. Estudios realizados de estimulación magnética transcraneal (EMT) sugieren que los pacientes con ELA experimentan una reducción en la inhibición cortical (Vucic et al., 2009), hallazgo que se ha asociado con un pronóstico desfavorable en la enfermedad (Shibuya et al., 2016). Además, se ha observado una pérdida de interneuronas inhibitorias corticales y espinales en muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Stephens et al., 2006), así como en un modelo murino de ELA junto con un aumento de la hiperexcitabilidad hipocampal (Thielsen et al., 2013).

En cuanto a los receptores de glutamato, los cambios en su estructura o función pueden predisponer a un aumento en la excitotoxicidad al modificar la sensibilidad de las neuronas a la sobreestimulación glutamatérgica. Por ejemplo, una sobreexpresión de receptores de glutamato, como los receptores AMPA (Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y NMDA (N-metil-D-aspartato), podría aumentar la entrada de calcio en las neuronas. Del mismo modo, alteraciones en la composición de subunidades de los receptores de glutamato podrían incrementar su conductancia de calcio, exacerbando aún más el efecto excitotóxico. En este sentido, en muestras de pacientes de ELA, se ha observado que las neuronas motoras espinales tienen una alta expresión de receptores AMPA que carecen de la subunidad GluA2, lo que los hace altamente permeables al calcio (Williams et al., 1997; Laslo et al., 2001). De manera similar, en motoneuronas con mutaciones en el gen *CgORF72*, se ha descrito una sobreexpresión de la subunidad GluA1 en el receptor AMPA, lo que produce también un aumento en la expresión de receptores AMPA permeables al calcio y resulta en una mayor vulnerabilidad selectiva de las motoneuronas a la excitotoxicidad (Selvaraj et al., 2018).

En relación con la hiperexcitabilidad neuronal, cambios en la estructura o función de los canales iónicos pueden predisponer a un incremento en la excitabilidad neuronal. Por ejemplo, una mutación que aumente la actividad de los canales de sodio puede producir una despolarización más rápida de la membrana celular y una mayor frecuencia de potenciales de acción. Del mismo modo, alteraciones en la actividad de canales de calcio pueden facilitar una mayor entrada de calcio en la neurona, contribuyendo a una excitación excesiva. En la ELA, estudios de EMT han revelado hiperexcitabilidad neuronal en etapas tempranas de la enfermedad, posiblemente debido a cambios en los receptores de sodio postsinápticos (Vucic et al., 2021).

Curiosamente, el único fármaco aprobado para esta enfermedad durante décadas, el riluzol, actúa como un agente excitotóxico, lo que demuestra la importancia de este fenómeno en la ELA. Este fármaco produce un bloqueo de corrientes de sodio y calcio a nivel presináptico que causa una reducción en la liberación de glutamato desde las terminales presinápticas, disminuyendo los efectos excitotóxicos sobre las neuronas motoras (Lamanauskas & Nistri, 2008).

1.5.3. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo es un proceso patogénico que aparece cuando existe un desequilibrio entre la formación de especies radicales libres (moléculas que contienen uno o más electrones libres) y la eliminación por parte de los sistemas de eliminación que incluyen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa, así como también moléculas antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) y la vitamina E. A nivel fisiológico los radicales libres más importantes son las ROS que se producen como subproductos del metabolismo celular mayoritariamente en las mitocondrias, durante la respiración celular e incluyen el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Cunha-Oliveira et al., 2020). El O_2^- y el OH^\cdot , son radicales altamente reactivos y nocivos debido a su capacidad para oxidar y dañar moléculas biológicas. Por otro lado, el H_2O_2 es menos nocivo y desempeña funciones importantes en la señalización celular y en la defensa del organismo contra agentes patógenos. Sin embargo, en altas concentraciones, el H_2O_2 puede desencadenar la formación de radicales libres más reactivos como OH^\cdot , o reaccionar con otras moléculas como óxido nítrico para formar peroxinitrito, una especie oxidante altamente reactiva (Olufunmilayo et al., 2023). Si estos radicales libres no se neutralizan, por una acción reducida o alterada por parte de los sistemas de degradación, pueden dañar macromoléculas como los ácidos nucleicos (el ADN y ARN), las proteínas y los lípidos. Este estrés oxidativo también afecta a componentes internos de las mitocondrias. El daño mitocondrial desencadena a su vez, una mayor producción de radicales libres y la peroxidación de lípidos, lo que resulta en la desestabilización de la membrana mitocondrial, la reducción en la síntesis de ATP (adenosín trifosfato) y alteraciones en el ADN mitocondrial. Esta situación compromete aún más la función mitocondrial, creando un ciclo de retroalimentación negativa que exacerba el estrés oxidativo.

Tanto la disfunción mitocondrial como el estrés oxidativo se han identificado como factores que contribuyen al desarrollo de la patología de la ELA. Aunque todas las células aeróbicas producen estrés oxidativo como producto de la respiración celular, las motoneuronas presentan una susceptibilidad mayor a estos eventos. Por un lado, esto es debido a que presentan bajos niveles de las enzimas antioxidantes catalasas y GSH. Por otro lado, son células postmitóticas que carecen de la capacidad de dividirse por lo que tienen una capacidad reducida para recuperarse de los daños causados por el estrés oxidativo (Hemerková & Vališ, 2021). Por último, debido al gran tamaño de sus axones presentan alta actividad metabólica, por lo que dependen en gran medida de un funcionamiento óptimo de las mitocondrias para generar energía en forma de ATP. Sin embargo, este proceso metabólico también puede dar lugar a la producción de ROS como subproductos del metabolismo, especialmente cuando existen alteraciones a nivel mitocondrial (Zhao et al., 2022).

En este sentido, se han observado cambios morfológicos en las mitocondrias y alteraciones en los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial junto con niveles elevados de estrés oxidativo en muestras de médula espinal y músculo de pacientes con ELA (Zhou et al., 2019b). Además, tanto en pacientes, como en modelos celulares y animales con mutaciones en *TARDBP*, se ha observado un deterioro mitocondrial mediante microscopía electrónica. Asimismo, la sobreexpresión de TDP43 ha demostrado inducir disfunción mitocondrial y aumentar la producción de ROS. Estas alteraciones pueden ser atribuibles al papel de TDP43 en la regulación de los transcritos mitocondriales (Wang et al., 2019). Por otro lado, se ha descubierto que mutaciones en *CgORF72* afectan a la correcta función mitocondrial ya que *CgORF72*, presente en las mitocondrias, estabiliza la proteína TIMMDC1, la cual es fundamental para el ensamblaje del complejo I de la fosforilación oxidativa mitocondrial. La disminución de la función de *CgORF72* en neuronas derivadas de pacientes con ELA asociada a *CgORF72* se ha relacionado, por tanto, con una reducción en la actividad del complejo I mitocondrial (Wang et al., 2021b). Además, la existencia de alteraciones en una de las principales enzimas antioxidantes, como es la enzima SOD1 indica un papel fundamental del estrés oxidativo en la patogénesis de la ELA. Como ya se ha comentado, la proteína mSOD1 regula al alza las ROS por su interacción con mitocondrias y proteínas (Cozzolino et al., 2009). Por ejemplo, mSOD1 se une al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), agregándose en la mitocondria y produciendo fallos en la producción de energía y un aumento del estrés oxidativo (Shteinfer-Kuzmine et al., 2019). Asimismo, mSOD1 también interfiere con la señalización entre el RE y las mitocondrias, así como con el proceso de mitofagia al interactuar con el receptor de autofagia optineurina (Tak et al., 2020).

La contribución del estrés oxidativo a la patología de la ELA se hace más evidente al examinar muestras de pacientes, ya que revelan un aumento en los niveles de estrés oxidativo, junto con una reducción de los sistemas antioxidantes. Por un lado, se han identificado niveles alterados de biomarcadores de estrés oxidativo tanto en tejido cerebral *post mortem* como en la sangre de pacientes con ELA esporádica o familiar. Por ejemplo, se ha detectado incrementos en los niveles de productos de la peroxidación lipídica como el hidroxinonenal (HNE) y el malondialdehído (MDA), en suero, LCR y sangre de pacientes con ELA (Arslanbaeva & Bisaglia, 2022). Por otro lado, se han observado alteraciones en los sistemas de defensa antioxidante en estos pacientes, como, por ejemplo, una disminución en la corteza motora de pacientes con ELA de los niveles de GSH, en comparación con controles sanos. Esto sugiere una incapacidad para contrarrestar eficazmente el estrés oxidativo contribuyendo a este fenómeno y al daño asociado (Blasco et al., 2017; Tam et al., 2019; Wang et al., 2019).

Otro de los sistemas antioxidantes donde se han observado alteraciones es la vía de señalización NRF2/ARE. El factor nuclear eritroide similar al factor 2, semejante 2 (NRF2, del inglés *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) es un factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión de genes asociados con enzimas antioxidantes, pero también de genes implicados

en proteostasis, inflamación y bioenergética mitocondrial, entre otros. En condiciones fisiológicas, los niveles de NRF2 son bajos pero, en situaciones de elevado estrés oxidativo, NRF2 aumenta y se transloca al núcleo donde se une al elemento de respuesta antioxidante ARE (del inglés *antioxidant response element*), lo que activa la transcripción de genes implicados en la respuesta antioxidante (Lastres-Becker et al., 2022). En muestras *post mortem* de médula espinal y corteza de pacientes con ELAe, así como en linfoblastos derivados de pacientes de ELAe y en muestras de ratones transgénicos TDP43^{A3345T} se ha observado un aumento en la actividad de la vía NRF2/ARE. Esto sugiere una respuesta antioxidante de NRF2 ante la presencia de estrés oxidativo en la enfermedad (Lastres-Becker et al., 2022). No obstante, los resultados obtenidos en pacientes son variables ya que otros estudios muestran una disminución de los niveles de la expresión de NRF2 en muestras *post mortem* de médula espinal y corteza de pacientes (Arslanbaeva & Bisaglia, 2022). Estas diferencias pueden ser debidas a la heterogeneidad de la enfermedad entre de los pacientes y revelan diferentes respuestas ante el estrés oxidativo.

1.5.4. Neuroinflamación

La neuroinflamación es una respuesta inflamatoria que ocurre en el SNC, que involucra a las células gliales residentes en el SNC, incluidas la microglía, los astrocitos, los oligodendrocitos, pero también a células del sistema inmune como linfocitos y monocitos que pueden infiltrarse en el SNC en respuesta a lesiones, infecciones o enfermedades neurodegenerativas (DiSabato et al., 2016). Inicialmente, el proceso inflamatorio es una respuesta protectora endógena dirigida a eliminar un daño. Sin embargo, cuando esta respuesta se vuelve crónica o se encuentra desregulada puede volverse perjudicial y contribuir a la progresión de diversas patologías del SNC. Esta inflamación sostenida y desregulada puede generar un entorno tóxico para las neuronas y otras células del SNC, lo que amplifica el daño neuronal y perpetúa un ciclo vicioso de inflamación y neurodegeneración (Yamanaka & Komine, 2018). Esto es lo que ocurre en ciertas enfermedades entre las que se incluyen las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson o la ELA.

En pacientes con ELA, se ha descrito un aumento en marcadores de neuroinflamación en muestras *post mortem* de la corteza motora y médula espinal mediante análisis inmunohistoquímicos (You et al., 2023). Estos análisis han revelado un aumento en la expresión de diversos marcadores microgliales, como la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba1, del inglés *ionized calcium-binding adapter molecule 1*) o el receptor desencadenante expresado en células mieloides 2 (TREM2, del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), así como del marcador de macrófagos activados, clúster de diferenciación 68 (CD68) (Tam et al., 2019; Chiot et al., 2020). Asimismo, se ha observado un aumento en los marcadores de astrocitos, como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*) o el clúster de diferenciación 44 (CD44) (Fujita et al., 1998; Brettschneider et al., 2012; Tam et al., 2019); que indican un incremento en el

número o una mayor activación de estas células. Además, los análisis transcriptómicos en estos tejidos han revelado un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta proinflamatoria, incluidos los genes que codifican las proteínas quitinasa 3 similares a las proteínas 1 y 2 (CHI3L1, CHI3L2, respectivamente, del inglés *chitinase 3-like protein 1, 2*) y la quitotriosidasa, que están implicadas en la respuesta inmunitaria y en la degradación de patógenos (Dols-Icardo et al., 2020). En muestras de LCR de pacientes también se ha observado un incremento en estos marcadores de activación glial (Morello et al., 2017; Vu et al., 2020).

Microglía

La microglía es un tipo celular específico del SNC que actúa como primera línea de defensa inmunitaria. La microglía desempeña diversas funciones: supervisa y detecta el entorno, migra a sitios lesionados o infectados para fagocitar agentes dañinos; mantiene la homeóstasis cerebral al remodelar las sinapsis y preservar la homeostasis de la mielina y responde frente a estímulos perjudiciales liberando citoquinas y quimiocinas para propagar las señales inflamatorias y facilitar la resolución del daño (Hickman et al., 2018).

En presencia de una lesión o patógeno, la microglía se activa. La microglía activada, según la visión tradicional, puede adoptar dos estados: M1 o neurotóxico y M2 o neuroprotector. Ante un daño leve, la microglía adquiere un fenotipo M2, caracterizado por cuerpos celulares pequeños y largas ramificaciones e implicado en la reparación tisular, la regeneración neuronal y la resolución de la inflamación mediante la secreción de factores antiinflamatorios (Da Pozzo et al., 2019). Cuando el daño es mayor o persiste en el tiempo, la microglía se polariza a un fenotipo M1. En este estado la microglía presenta una función fagocítica más agresiva, que elimina rápidamente células infectadas y células dañadas, produciendo efectos citotóxicos. El fenotipo M1 presenta una apariencia ameboide, con cuerpos celulares más grandes y ramificaciones más cortas y gruesas, indicando estas modificaciones morfológicas un cambio en su función (Vidal-Itriago et al., 2022). Además, este fenotipo M1 se caracteriza también por una secreción aumentada de la NADPH oxidasa 2 (NOX2), ROS y citoquinas proinflamatorias como interleucina (IL) 6, IL-8, IL-1 β o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés *tumor necrosis factor α*) (Yu et al., 2022).

Sin embargo, hoy en día esta clasificación de la microglía se considera obsoleta. Actualmente se sabe que la microglía, a lo largo de la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, exhibe múltiples fenotipos reactivos cambiantes con funciones diversas y que no son necesariamente completamente beneficiosos o perjudiciales. Recientemente, ha surgido una descripción de los estados microgliales en términos de patrones de expresión molecular y cambios funcionales. Esto ha dado lugar a la identificación de diversos estados microgliales. Dentro de estos fenotipos encontramos un estado de microglía no reactivo pero funcional, caracterizado

por la expresión elevada de marcadores homeostáticos como *CX3CR1*, *P2RY12*, *P2RY13* y *TMEM119*. Estos genes están implicados en mantener la vigilancia y realizar funciones de migración, motilidad, o de comunicación entre la neurona y la microglía. Por otro lado, otro de los fenotipos identificados es el de microglía asociada a enfermedad (DAM, del inglés *disease-associated microglia*), un fenotipo definido por una expresión génica diferencial que fue descrito por primera vez mediante estudios de secuenciación de ARN de célula única (scARN-seq) en muestras de ratones y pacientes de enfermedad de Alzheimer. Se caracteriza por un aumento en los niveles de expresión de genes como *CLEC7A*, *APOE* y *TREM2*, implicados en vías de fagocitosis, degradación lisosomal y metabolismo lipídico; así como una reducción en genes homeostáticos como *CX3CR1*, *P2RY12* y *TMEM119* (Deczkowska et al., 2018).

En la ELA, se ha descrito la presencia de este fenotipo DAM en varios modelos murinos de la enfermedad. En el modelo murino *SOD1^{G93A}*, se encontró un perfil de expresión muy similar, con una disminución en la expresión de genes homeostáticos, incluidos *P2RY12* y *CX3CR1*; y un aumento en la expresión de *TREM2*. De hecho, *TREM2* se ha descubierto que es esencial para la transición de la microglía a un estado DAM (Keren-Shaul et al., 2017). Además, en el modelo murino de ELA rNLS8, que se trata de un modelo reversible de TDP43 humano (TDP43h) neuronal suprimible con doxiciclina, se detectaron cambios similares, con un aumento de genes implicados en quimiotaxis, fagocitosis e inflamación, como *APOE* y *CLEC7A* (Hunter et al., 2021). Cabe destacar, que la expresión de estos genes se modificaba durante la progresión de la enfermedad y tras la supresión de la expresión de TDP43h. Recientemente, se han descrito también patrones específicos de expresión génica tipo DAM en muestras de pacientes de ELA similares a los observados en el modelo de Alzheimer, incluido un aumento en los niveles de *TREM2* y *APOE*, confirmando la presencia del estado DAM en la ELA (Jauregui et al., 2023). Sin embargo, aún no está clara la asociación de DAMs con la gravedad y la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Paolicelli et al., 2022).

Por otro lado, la importancia de la microglía en la patología de la ELA se refleja en la presencia de mutaciones en genes causales de la ELA cuyas proteínas están implicadas en la capacidad fagocítica de las células microgliales, lo que destaca la importancia de este tipo celular en la patología de la enfermedad. Por ejemplo, el gen *TBK1* controla la maduración del autofagosoma, *SQSTM1/p62* facilita la degradación de agregados proteicos ubiquitinados por autofagia, y *C9ORF72* regula la autofagia y el transporte endocítico (Chen et al., 2018).

Asimismo, varios estudios en modelos murinos de ELA confirman la importancia de este tipo celular en la patología de la ELA. En particular, en un modelo murino de ELA con haploinsuficiencia de *C9ORF72* se observó que las células microgliales acumulaban más desechos en los lisosomas y además, los macrófagos y la microglía tenían una capacidad inmunitaria reducida (O'Rourke et al., 2016). Además, la función adecuada de la proteína TDP43 se ha relacionado también con la correcta función fagocítica de la microglía, como se demostró en el modelo de ratón reversible rNLS8, donde la supresión de la expresión de TDP43h llevó a un aumento en la activación

y proliferación de las células microgliales, que fue necesario para eliminar los agregados de TDP43h en las neuronas y así producir una recuperación de la función motora en estos animales (Spiller et al., 2018). Por otro lado, en ratones carentes de células de microglía ($Pu1^{-/-}$) con la mutación $SOD1^{G93A}$, el trasplante de médula ósea proveniente de animales *wildtype* retrasó la pérdida de motoneuronas y aumentó la supervivencia con respecto al trasplante de donantes $SOD1$. Sin embargo, en ratones $Pu1^{-/-}$, el trasplante de médula ósea de donantes mutantes con mSOD1 no causó la muerte de motoneuronas ni produjo un fenotipo similar a la ELA (Beers et al., 2006). Estos resultados sugieren que, aunque las alteraciones en la microglía no son suficientes para producir enfermedad, sí que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, debido, aparentemente, a una mayor toxicidad de la microglía. En este sentido, se observó que en ratones dobles mutantes que carecen del receptor CSF-1R en la microglía, crucial para la activación y regulación de la vía NF- κ B, se redujo la muerte de las motoneuronas y se incrementó la supervivencia de ratones $SOD1^{G93A}$, demostrando la implicación de esta vía en la toxicidad de la microglía (Frakes et al., 2014). Asimismo, en una serie de estudios *in vitro* se detectó que la microglía primaria de ratones neonatales con mSOD1 estaba más activada y presentaba una mayor producción de ROS, óxido nítrico (NO, del inglés *nitrid oxide*) y anión superóxido lo que producía una mayor muerte de motoneuronas en co-cultivo, que se revertía con un inhibidor de la sintasa de NO inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase inhibitor*) (Beers et al., 2006; Xiao et al., 2007). Estos hallazgos destacan la implicación de las vías NF- κ B, así como de las vías asociadas a ROS y NO, en la toxicidad de la microglía.

Otro aspecto interesante en discusión es si la microglía en la ELA contribuye negativamente a la patología de la ELA desde las etapas iniciales de la enfermedad. Estos estudios *in vitro* mencionados sugieren que la microglía ya presenta efectos neurotóxicos en las etapas iniciales de la enfermedad. No obstante, algunos estudios han demostrado que el papel de la microglía evoluciona durante la progresión de la enfermedad, pasando de un papel neuroprotector en las etapas iniciales a un fenotipo neurotóxico en etapas avanzadas. Por ejemplo, se observó que la microglía de ratones $SOD1^{G93A}$ en el inicio de la enfermedad aumentaba la supervivencia de las motoneuronas en co-cultivo, pero la microglía de estos ratones en etapas avanzadas de la enfermedad producía muerte en las motoneuronas (Liao et al., 2012). Además, en otro experimento, la delección de mSOD1 de la microglía prolongó la esperanza de vida, pero no tuvo efecto sobre la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, sugiriendo un papel perjudicial de la microglía únicamente en etapas tardías de la patología (Boillée et al., 2006). Otra evidencia a favor del papel neuroprotector en las etapas iniciales se observó en ratones $SOD1^{G37R}$, donde en la etapa presintomática se detectó un aumento de la citocina antiinflamatoria IL-10. Asimismo, la sobreexpresión de esta citocina en la microglía de ratones $SOD1^{G93A}$ retrasó el inicio de la enfermedad y prolongó su supervivencia (Gravel et al., 2016).

Astrocitos

Los astrocitos son el tipo de célula glial más común en el SNC. Además de su papel estructural y en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), proporcionan un soporte metabólico esencial para el crecimiento y la supervivencia de las neuronas. También contribuyen a mantener el equilibrio químico y eléctrico, regulan la actividad sináptica y responden a lesiones, participando en la plasticidad neuronal (Kwon & Koh, 2020).

En ausencia de daño, los astrocitos exhiben un estado quiescente en el que realizan funciones metabólicas y de soporte vitales para las neuronas. En este estado, se caracterizan por presentar una morfología ramificada y una expresión baja de marcadores gliales como GFAP, el componente principal de los filamentos intermedios de los astrocitos. Sin embargo, en respuesta a daño, los astrocitos se vuelven reactivos liberando factores de crecimiento y citocinas para limitar el daño y promover la reparación del tejido nervioso. El aumento en la expresión de GFAP (Zhou et al., 2019a), y cambios morfológicos que incluyen una hipertrofia del soma junto con un aumento en el número de ramificaciones, se han empleado como marcadores característicos de los astrocitos reactivos (Escartin et al., 2021).

De manera similar a la clasificación de los fenotipos de la microglía, comúnmente se ha clasificado a los astrocitos en astrocitos con fenotipo neuroprotector o A2 y neurotóxico o A1. Los astrocitos con un fenotipo neuroprotector aumentan la expresión de diversos factores neurotróficos y liberan moléculas antiinflamatorias como las citocinas IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés *transforming growth factor β*). Por otro lado, los astrocitos con un fenotipo proinflamatorio están asociados con una respuesta inflamatoria exacerbada y producen la liberación de factores inductores de la inflamación como IL-1 β , TNF- α y NO (Yamanaka & Komine, 2018). Recientemente, estudios de transcriptómica han llevado a establecer una mayor diversidad fenotípica de los astrocitos, lo que sugiere una clasificación más amplia de estas células, basadas en sus patrones de expresión génica (Escartin et al., 2021). De hecho, de manera similar a lo observado en la microglía, se han observado patrones de expresión génica de astrocitos asociados a enfermedad (DAA, del inglés *disease-associated astrocytes*) en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, que podrían ser comunes a otras enfermedades neurodegenerativas. Estos astrocitos presentan un perfil de expresión génica caracterizado por la sobreexpresión de genes relacionados con endocitosis, la cascada de complemento y el envejecimiento, como por ejemplo Serpina3n y catepsina B.

Una pregunta fundamental en el estudio de la ELA que se ha planteado en los últimos años es si los astrocitos contribuyen directamente a la muerte de las motoneuronas o si su reactividad es simplemente una consecuencia del ambiente tóxico que las afecta. Existen diversas evidencias que respaldan la contribución de los astrocitos reactivos a la muerte celular no autónoma en la ELA.

Por un lado, se observó que la expresión selectiva de la SOD1 humana mutada en neuronas motoras espinales primarias de ratón no provocaba degeneración de las neuronas motoras, lo que sugirió un papel de las células no neurales en la progresión de la ELA en ratones con mutación en *SOD1* (Nagai et al., 2007). Varios experimentos confirmaron la contribución de los astrocitos a la muerte de las motoneuronas. Por ejemplo, el co-cultivo de neuronas motoras *wildtype* o transgénicas con astrocitos que expresan mSOD1 fue tóxico para las motoneuronas (Nagai et al., 2007; Di Giorgio et al., 2008; Marchetto et al., 2008), demostrando así el impacto de los astrocitos sobre las motoneuronas. La hipótesis de la toxicidad mediada por astrocitos se confirmó con otra serie de experimentos en los que el trasplante de células precursoras de astrocitos que expresan mSOD1 en la médula espinal de ratones *wildtype* generó astrocitos reactivos que expresaban mSOD1, induciendo la muerte de las motoneuronas y disfunción motora (Papadeas et al., 2011), mientras que el trasplante de precursores de astrocitos *wildtype* en la médula espinal cervical de ratones *SOD1^{G93A}* prolongó la supervivencia de los ratones, mejoró la progresión de la enfermedad y redujo la muerte de las motoneuronas (Lepore et al., 2008). Además, la eliminación de *SOD1* mutado en astrocitos de ratones transgénicos *SOD1* retrasó el inicio de la enfermedad, mejoró la progresión de la patología (Wang et al., 2011) y produjo mejoras a nivel funcional en la unión neuromuscular (Rochat et al., 2022), demostrando así que los astrocitos generan un ambiente neurotóxico para las motoneuronas. Este efecto neurotóxico de los astrocitos no se limita solo a la mutación en *SOD1*; si no que la contribución de los astrocitos a la muerte neuronal se ha descrito también en otros modelos animales. Por ejemplo, se observó que la expresión selectiva de TDP43 mutado en astrocitos de ratas transgénicas causó la muerte neuronal progresiva y la parálisis de los músculos en este modelo (Tong et al., 2013). Asimismo, en muestras de pacientes de ELA también se ha observado dicha contribución. Así, los astrocitos obtenidos a partir de fibroblastos de pacientes con mutaciones en *C9ORF72*, *SOD1* y de pacientes con ELA esporádica produjeron toxicidad en motoneuronas derivadas de células madre embrionarias de ratón *wildtype* (Meyer et al., 2014) demostrando que los astrocitos desempeñan un papel activo en la patogénesis de la ELA, independientemente de la causa genética. Todos estos experimentos, demuestran que los astrocitos no son meros espectadores en la neurodegeneración de la ELA, sino que contribuyen de manera significativa a la muerte de las motoneuronas.

En cuanto al mecanismo por el que los astrocitos producen la muerte de las motoneuronas, existen varias teorías. Por un lado, el efecto neurotóxico parece deberse a la liberación de factores tóxicos en el medio extracelular, como el polifosfato (polyP), un gliotransmisor que modula la actividad de los canales iónicos, aumentando la excitabilidad neuronal (Arredondo et al., 2022). Sin embargo, la toxicidad de los astrocitos también puede atribuirse a una disminución en la secreción de factores neurotróficos. En este sentido, se ha observado que la producción de estos factores está reducida en astrocitos primarios derivados de ratones *SOD1^{G93A}* en respuesta al estrés (Brambilla et al., 2018).

Además, para comprender completamente el papel de los astrocitos en la ELA, es importante considerar cómo otras células del sistema nervioso con las que interacciona influyen en su reactividad y función, como las neuronas y la microglía. En este sentido, por un lado, se ha observado que los astrocitos pueden captar el microARN-218 (miR-218) liberado por las motoneuronas en respuesta a lesiones o muerte, lo cual disminuye la expresión del transportador de glutamato EAAT2 en los astrocitos y aumenta la excitotoxicidad (Hoye et al., 2018). Esto sugiere la presencia de un bucle de retroalimentación neurotóxico en el cual los astrocitos en ELA contribuyen a la muerte de las motoneuronas mediante la liberación de factores neurotóxicos y las motoneuronas degeneradas liberan factores que influyen en los astrocitos, exacerbando aún más la muerte de las motoneuronas. Por otro lado, varios estudios indican que existe una comunicación bidireccional entre la microglía y los astrocitos que influye sobre la patogénesis de la enfermedad. Esta interacción se ha descrito en modelos murinos de SOD1. Por ejemplo, se observó que el bloqueo de la proliferación microglial en estos animales disminuía la activación de los astrocitos (Gowing et al., 2008). A su vez, la eliminación de mSOD1 en los astrocitos disminuía la activación glial (Yamanaka et al., 2008), y retrasaba la aparición de los síntomas motores (Wang et al., 2011) sugiriendo una interacción estrecha entre ambos tipos celulares que parece ser importante en la patogénesis de la ELA. Además, estudios de trasplante de precursores de astrocitos en modelos murinos de ELA revelaron cómo los astrocitos, dependiendo de su naturaleza, pueden modular diferentes respuestas en la microglía. En este sentido el trasplante de precursores de astrocitos *wildtype* en la médula espinal de ratones con una mutación en SOD1 redujo la activación microglial (Lepore et al., 2008), mientras que el trasplante de precursores de astrocitos con mSOD1 en la médula espinal de ratones *wildtype* aumento la activación microglial, confirmando una interacción entre ambos tipos celulares en este modelo (Papadeas et al., 2011). En cuanto al mecanismo por el que se produce esta interacción, parece que, en el caso de la activación de la microglía por parte de los astrocitos, está mediada por la liberación al espacio extracelular por parte de los astrocitos de proteínas mal plegadas, como mSOD1, que activan la microglía a través de vías dependientes de clúster de diferenciación 14 (CD14), receptor tipo *toll* (TLR, del inglés *toll like receptor*) 2, TLR4 y receptor *scavenger* (Liu & Wang, 2017). Por su parte, la microglía en este modelo es capaz de modular el estado de activación de los astrocitos a un fenotipo neurotóxico a través de la liberación IL-1 α , TNF- α y el componente del complemento 1q (C1q) (Liddelow et al., 2017). De hecho, el bloqueo de estos factores disminuye la astrogliosis y mejora la supervivencia y la progresión de la enfermedad (Guttenplan et al., 2020).

Células del sistema inmune en la ELA

Entre las células principales del sistema inmune se encuentran los linfocitos T, responsables de coordinar y ejecutar respuestas específicas del sistema inmune; los linfocitos B, encargados de producir anticuerpos para neutralizar patógenos y los monocitos que pueden diferenciarse bien en

macrófagos, células fagocíticas que eliminan patógenos y células muertas, o bien, en células dendríticas, que presentan antígenos a los linfocitos, iniciando así respuestas inmunitarias específicas. Además, los neutrófilos, eosinófilos y basófilos también juegan roles importantes en la defensa contra patógenos y en la regulación de respuestas alérgicas e inflamatorias. Las células del sistema inmune pueden contribuir a la progresión de enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas al infiltrarse en el cerebro, pero también mediante la modulación del sistema inmunológico desde la periferia (Greenhalgh et al., 2020).

Aunque tradicionalmente se ha centrado la atención en los astrocitos y la microglía como principales contribuyentes a la neuroinflamación, cada vez más estudios identifican un papel importante de las células del sistema inmune periférico en la ELA. Se ha observado una creciente evidencia tanto a nivel central, con la identificación de infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células dendríticas en el SNC, especialmente en las regiones afectadas por la ELA, como a nivel periférico (McCauley & Baloh, 2019). Varios estudios han observado la infiltración de monocitos en pacientes, asociada con mejoras de la supervivencia neuronal (Zondler et al., 2016), como en el modelo murino de ELA $SOD1^{G93A}$, donde los efectos observados son diversos. En este modelo, en un primer estudio se asoció la infiltración de monocitos a un aumento de la muerte neuronal (Butovsky et al., 2012); mientras que en otro estudio posterior se relacionó con un aumento de la supervivencia neuronal (Zondler et al., 2016). Estas discrepancias podrían atribuirse a las diferencias en los marcadores utilizados en los estudios de citometría para distinguir los monocitos de otras células inmunes, que han sido objeto de refinamiento a lo largo de los años, mejorando la precisión de la identificación de los subtipos de monocitos.

Además, se ha observado que los pacientes con una progresión rápida de la enfermedad presentan monocitos en la sangre periférica con un perfil de expresión génica diferencial, marcado por la expresión de genes proinflamatorios, que no se observa en los pacientes de progresión lenta; sugiriendo que los monocitos influyen en la progresión de la enfermedad (Zhao et al., 2017).

Asimismo, los monocitos en el SNC pueden diferenciarse a macrófagos con un fenotipo antiinflamatorio, que produce citocinas antiinflamatorias como IL-10 y el TGF- β proinflamatorio, que libera citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6. Curiosamente, los monocitos de pacientes con ELA exhiben una mayor propensión a la activación y diferenciación hacia el fenotipo proinflamatorio en comparación con los individuos sanos. Esto sugiere que estos monocitos, al ingresar al SNC, pueden contribuir significativamente a la neuroinflamación mediante la producción aumentada de citocinas proinflamatorias (Du et al., 2020).

1.5.5. Transporte axonal

Las alteraciones en el transporte axonal juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión de la ELA. Dada la naturaleza altamente polarizada de las motoneuronas y a la gran longitud de sus axones, el correcto funcionamiento del transporte axonal es clave para la correcta función y supervivencia de las motoneuronas. El transporte axonal requiere de una maquinaria compleja que permite el desplazamiento de las cargas que incluye los microtúbulos, las proteínas motoras, las moléculas adaptadoras y las cargas. Los microtúbulos representan las estructuras esqueléticas de sostén fundamentales dentro de las neuronas y sirven como vías de transporte dentro del axón para las proteínas motoras. Estas proteínas motoras son dineínas y quinesinas citoplasmáticas que transportan las cargas en direcciones retrógrada y anterógrada, respectivamente, desplazándose a lo largo de los microtúbulos. Además, las proteínas adaptadoras unen las proteínas motoras con las cargas transportadas, asegurando así su correcto transporte y dirección a lo largo del axón. De esta manera, esta maquinaria compleja asegura que las moléculas necesarias para el funcionamiento celular, como proteínas, ARN, lípidos y orgánulos, sean transportadas a sus destinos fisiológicos. Por ejemplo, las enzimas encargadas de la síntesis de neurotransmisores se producen en el soma neuronal y luego son transportadas en dirección anterógrada hacia los terminales axonales, donde participan en la síntesis de neurotransmisores. Además, el transporte axonal también facilita la eliminación de proteínas mal plegadas y orgánulos dañados, mediante el transporte retrógrado de los autofagosomas que se generan en la parte distal del axón hasta el soma.

Uno de los elementos que permite identificar las alteraciones en el transporte axonal en la ELA es la acumulación de neurofilamentos fosforilados dentro de los axones. Este fenómeno se ha observado en las neuronas motoras de tejidos *post mortem* de pacientes con ELA, como en neuronas motoras derivadas de iPSC de pacientes (Lefebvre-Omar et al., 2023) así como en el modelo murino SOD1^{G93A} (Rouleau et al., 1996). Pero, además, los estudios realizados utilizando microscopía *in vivo* han permitido identificar en modelo murinos alteraciones en endosomas de señalización y mitocondrias, indicando alteraciones en el transporte axonal en estos modelos. Concretamente, se ha observado una reducción en la velocidad de transporte de los endosomas y las mitocondrias a lo largo del axón en los modelos murinos de ELA mSOD1^{G93A} y TDP43^{M337V} tanto *in vitro* (en cultivos primarios de motoneuronas), como *in vivo*, antes del inicio de los síntomas (Sleigh et al., 2020; Tosolini et al., 2022).

La relevancia de las alteraciones en el transporte axonal como un mecanismo patogénico central en la ELA se evidencia en la presencia de mutaciones en genes asociados con la enfermedad que codifican diversos componentes de la maquinaria de transporte axonal, tanto en modelos animales como en pacientes humanos (Guo, et al., 2020a). Entre los genes mutados en la ELA asociados a alteraciones en el transporte, cabe destacar *KIF5A*, que codifica una proteína

implicada en el transporte anterógrado; *DCTN1*, que codifica la dinactina, un componente fundamental del transporte axonal retrógrado, y *TUBA1A*, que codifica una proteína implicada en la formación de los microtúbulos (Sleigh et al., 2019).

Por otro lado, la estabilidad de los microtúbulos es crucial para el transporte axonal adecuado y su alteración puede desencadenar alteraciones significativas. TDP43 es una proteína clave que puede regular la estabilidad de los microtúbulos de manera indirecta, mediante la modulación de los niveles de expresión de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), una enzima que elimina grupos acetilo de la α -tubulina, produciendo la desestabilización de los microtúbulos. De hecho, se ha descrito como la presencia de mutaciones en la proteína TDP43 aumenta los niveles de expresión de la enzima HDAC6, y esto conduce a una disminución en el porcentaje de mitocondrias en movimiento y a un aumento en el número de mitocondrias pausadas en las neuronas motoras con TDP43 mutado (Yang et al., 2023).

Además, las alteraciones en el transporte axonal están vinculadas a ciertos eventos patológicos ya descritos presentes en la ELA. Por un lado, los fallos en el transporte axonal dificultan la eliminación de proteínas mal plegadas que se acumulan en el RE y en las mitocondrias, produciendo su disfunción y, con ello, un aumento del estrés oxidativo debido a la liberación de ROS. Asimismo, las alteraciones en el transporte axonal de las mitocondrias conducen a un déficit energético en las neuronas, agravando aún más la patología. Estos eventos se refuerzan mutuamente y pueden contribuir significativamente a la degeneración de las neuronas motoras (Guo, et al., 2020a).

1.5.6. Mecanismos patogénicos en la ELA en el músculo esquelético

Si bien el apartado anterior se ha centrado en los eventos de la patología de la ELA en relación con las motoneuronas, en los últimos años se está reconociendo cada vez más que el músculo esquelético también desempeña un papel importante en la patogénesis de la ELA, no solo por su afectación durante la progresión de la enfermedad, sino por su posible papel primario en ELA. Por tanto, comprender las alteraciones musculares que se producen en las diferentes etapas de progresión de la enfermedad, ya sean intrínsecas o asociadas a otros eventos (degeneración axonal, inflamación, etc) es fundamental para obtener una visión completa de su patogénesis. Para ello, numerosos estudios han dirigido su atención hacia el análisis de la unión neuromuscular.

La unión neuromuscular se refiere a la sinapsis tripartita química especializada que implica la neurona motora presináptica, la placa motora postsináptica (la estructura especializada del músculo esquelético donde los terminales nerviosos llegan y se invaginan), y las células de Schwann terminales. Cuando un impulso nervioso llega al extremo de la motoneurona, se produce la liberación de acetilcolina desde las vesículas sinápticas hacia el espacio sináptico, donde activa

INTRODUCCIÓN

los receptores de acetilcolina en la placa motora, desencadenando la contracción muscular (Verma et al., 2022). Cabe destacar, que cada fibra muscular es inervada por una única motoneurona, pero cada motoneurona puede inervar múltiples fibras musculares. La unidad funcional compuesta por una neurona motora y todas las fibras musculares esqueléticas que esta neurona inerva se conoce como unidad motora.

La disfunción de la unión neuromuscular se caracteriza principalmente por la denervación de las fibras musculares; es decir, por la pérdida total o parcial de conectividad funcional entre la neurona motora y la fibra muscular. La denervación a nivel histológico se puede evaluar mediante la presencia de placas denervadas (cuando la conexión entre la neurona motora y la fibra muscular está completamente ausente) o parcialmente denervadas (cuando el terminal axonal inerva algunos, pero no todos los surcos de la placa motora) (Villarreal-Campos et al., 2022). Además, las placas denervadas y parcialmente denervadas a menudo aparecen fragmentadas, indicando que la neurona motora no está haciendo contacto adecuado con la fibra muscular, lo que puede resultar en una comunicación nerviosa deficiente y una función muscular comprometida (Ditsworth et al., 2017). La denervación de la placa produce fatiga muscular y la disminución de las reservas energéticas, ya que la fibra muscular no recibe los estímulos nerviosos necesarios para contraerse de manera eficiente y mantener su actividad metabólica.

Debido a la progresión rápida de la ELA y a que el diagnóstico suele realizarse en etapas avanzadas de la enfermedad, el estudio en pacientes de las alteraciones en la unión neuromuscular es complicado, especialmente durante los estadios presintomáticos. Sin embargo, existen varios estudios histológicos y electrofisiológicos en pacientes de ELA que muestran alteraciones a nivel de la unión neuromuscular. Por un lado, los registros electrofisiológicos realizados para el diagnóstico y el análisis de la progresión de la enfermedad en los pacientes con ELA, muestran alteraciones en la contracción muscular, lo que sugiere que la eficacia de la transmisión nerviosa está comprometida debido a alteraciones en la unión neuromuscular (Bruneteau et al., 2013; Picchiarelli et al., 2019; Ramroop & Cruz, 2024). Por otro lado, el análisis de las biopsias de muestras de músculos procedentes de pacientes ha sido una de las técnicas que ha arrojado más información sobre la contribución de músculo a la patología de la ELA. Los diversos estudios que han analizado estas biopsias musculares han observado en ellas una serie de patrones comunes indicativos de patología neuromuscular. Entre las alteraciones más frecuentemente presentes destaca la presencia de placas motoras denervadas, que a menudo aparecen fragmentadas; así como de placas parcialmente inervadas; y de placas reinervadas (Bruneteau et al., 2013; Liu et al., 2013; Bruneteau et al., 2015; Picchiarelli et al., 2019; Ding et al., 2022). Las placas reinervadas aparecen cuando una fibra muscular que había perdido su conexión con una motoneurona es reconectada por un nuevo axón y se identifican por la presencia de una hendidura sináptica aplanada y fragmentada con bordes separados y evanescentes. Curiosamente, se ha observado que el aumento de la supervivencia en pacientes no se correlaciona con una mayor cantidad de placas normales, sino con un mayor número de placas reinervadas. Esto sugiere que la reinervación

actúa como un mecanismo compensatorio y protector del organismo ante la pérdida de uniones sinápticas en el músculo (Bruneteau et al., 2013). Además, a menudo se han identificado también en las biopsias de pacientes terminales axonales presinápticas ausentes, así como invasión en los terminales de las células de Schwann. Esto indica que estas células, que normalmente apoyan y envuelven las fibras nerviosas, invaden el espacio sináptico en las uniones neuromusculares, lo que puede reducir el área disponible para la transmisión sináptica efectiva, por lo que constituye un signo de degeneración de la unión neuromuscular (Bruneteau et al., 2015; Ding et al., 2022). A nivel molecular, otra característica patológica en la unión neuromuscular de pacientes con ELA es el cambio en la expresión de subunidades de receptores de acetilcolina (AChR, del inglés *acetylcholine receptors*). En los pacientes con ELA se han detectado mayores cantidades de receptores formados por subunidades γ (γ -AChR) que están estrechamente relacionadas con la inervación y son abundantes en músculos denervados (Palma et al., 2016), demostrando el potencial de estos cambios como indicadores de alteración en la formación y el mantenimiento de la unión neuromuscular.

Es importante mencionar que la degeneración de las uniones neuromusculares ocurre de manera específica en ciertos tipos de músculos en diferentes etapas de la enfermedad, y no todos los músculos se ven afectados simultáneamente ni de la misma manera durante el curso de la ELA. La pérdida de unidades motoras comienza en las de uniones de fibras musculares rápidas fatigables durante la etapa presintomática, luego progresa a las uniones de fibras musculares resistentes a la fatiga durante la etapa sintomática, y finalmente en las uniones de fibras musculares lentas en etapas avanzadas de la enfermedad (Verma et al., 2022).

La progresión de la denervación ha sido extensamente estudiada en el modelo de SOD1^{G93A}, ya que presenta alteraciones musculares más graves que otros modelos murinos y la progresión de los síntomas motores se asemeja a la observada en pacientes con ELA, incluida la aparición de debilidad muscular y parálisis. Concretamente, en este modelo se detectó en edades tempranas, alrededor del día postnatal (PN) 30, denervación de la unión neuromuscular y atrofia en músculos de contracción rápida, especialmente en el músculo tibial y el gastrocnemio. Sin embargo, no se observó denervación en músculos de contracción lenta como el sóleo hasta etapas más tardías, alrededor de PN70. Estos eventos ocurren antes de la pérdida de motoneuronas, reportada entre PN50 y PN100, así como antes de la aparición de síntomas motores, que se observaron aproximadamente entre PN90 y PN120 (Alhindi et al., 2022). Aunque las fechas exactas de aparición de la denervación en diferentes músculos en el modelo SOD1^{G93A} varían entre estudios (Fischer et al., 2004; Clark et al., 2016; Tallon et al., 2016), se conserva un orden de aparición similar. Es importante destacar que en todos estos estudios se ha observado consistentemente que las alteraciones en la unión neuromuscular preceden a los déficits motores, lo cual apoya un mecanismo de muerte retrógrada en el modelo SOD1^{G93A}, donde la patología comienza a nivel de la unión neuromuscular. No obstante, cabe destacar que pueden existir alteraciones fisiológicas en

INTRODUCCIÓN

las motoneuronas no percibidas directamente como muerte neuronal que puede preceder y estar contribuyendo a la disfunción en la unión neuromuscular.

Sin embargo, se dispone de pocas evidencias en humanos que nos permitan discernir si las alteraciones en la unión neuromuscular son previas o posteriores a las alteraciones en las motoneuronas. En este sentido, la autopsia de un paciente con ELA que presentaba alteraciones motoras y falleció durante una cirugía, constituye la principal prueba a favor de que la degeneración en la unión neuromuscular puede ocurrir antes de la pérdida de las neuronas motoras (Fischer et al., 2004). Sin embargo, esta idea no está exenta de controversia. Otro grupo de estudios, respaldado por procedimientos electromiográficos, argumenta que la afectación de la motoneurona es previa a la alteración del músculo. Los resultados demostraban una reducción en el número de unidades motoras en los pacientes con ELA. Sin embargo, a pesar de esta pérdida, las fibras musculares previamente inervadas por las motoneuronas fallecidas eran reinervadas por motoneuronas sobrevivientes, lo que indicaría que las alteraciones en el músculo son secundarias a la degeneración de las motoneuronas (Shefner et al., 2023).

Por otro lado, una pregunta sin resolver es si los defectos observados en la unión neuromuscular son mediados por eventos patogénicos que suceden en las motoneuronas presinápticas o en las fibras musculares. Un estudio reciente demuestra una contribución activa del músculo esquelético en la disfunción de la unión neuromuscular. Empleando miotubos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced pluripotent stem cells*) de pacientes con ELA con mutaciones en SOD1, los investigadores observaron defectos en estos miotubos, incluida una disminución en la expresión de receptores de acetilcolina y en la fuerza contráctil; sugiriendo que la expresión de SOD1 en los miotubos es suficiente para causar alteraciones en el músculo esquelético que alteren la unión neuromuscular (Badu-Mensah et al., 2020). Además, otro estudio respaldó estos hallazgos, pues determinó que tanto las motoneuronas como los miotubos derivados de pacientes con ELA FUS mostraban toxicidad intrínseca, afectando la maduración de las placas terminales. Por tanto, estos hallazgos sugieren que tanto las alteraciones en las motoneuronas como en el músculo esquelético en la ELA pueden contribuir a la disfunción sináptica observada en la unión neuromuscular durante la progresión de la enfermedad (Picchiarelli et al., 2019).

BOX 3: Estructura y Clasificación de las Fibras Musculares en el Músculo Esquelético

El músculo esquelético está compuesto por fascículos musculares, que a su vez contienen fibras musculares rodeadas por tejido conectivo. Dentro de cada fibra muscular se encuentra un citoplasma denominado sarcoplasma y las miofibrillas, las unidades contráctiles del músculo, compuestas por filamentos de actina y miosina, que están rodeadas por una membrana plasmática llamada sarcolema. Además, el músculo está envuelto en varias capas de tejido conectivo que proporcionan soporte estructural y conectan el músculo a otras estructuras del cuerpo (Figura 8).

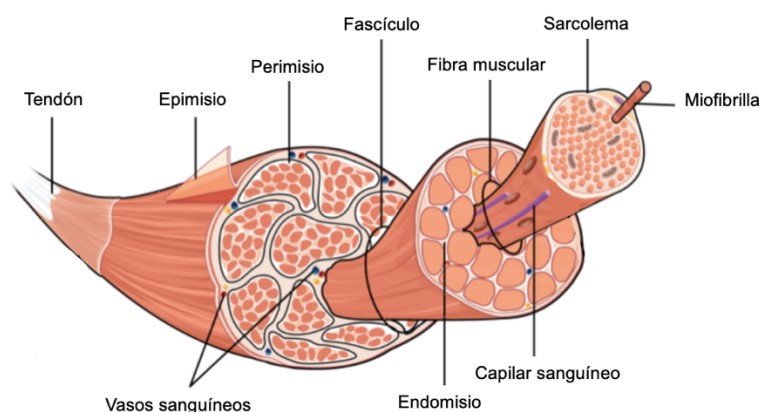


Figura 8: Estructura del músculo esquelético. Adaptado de (Allen et al., 2024)

En función de la velocidad de contracción de las fibras musculares estas se pueden clasificar en:

Fibras Tipo I, también conocidas como fibras lentas oxidativas, se caracterizan por su contracción lenta y alta resistencia a la fatiga. Tienen un alto contenido de mitocondrias y mioglobina, lo que les da un color rojo. Están presentes en músculos implicados en actividades que requieren una alta resistencia y baja intensidad, como caminar y mantener la postura.

Fibras Tipo IIa, o fibras rápidas oxidativas-glicolíticas, tienen una velocidad de contracción rápida y son moderadamente resistentes a la fatiga. Contienen una cantidad intermedia de mitocondrias y mioglobina y pueden generar energía tanto a través de la respiración aeróbica como de la glucólisis anaeróbica. Están presentes en músculos implicados en actividades que requieren velocidad y resistencia moderada, como correr distancias medias.

Fibras Tipo IIb, o fibras rápidas glicolíticas, presentan una velocidad de contracción muy rápida y se fatigan rápidamente. Tienen un bajo contenido de mitocondrias y mioglobina, obteniendo la mayor parte de su energía a través de la glucólisis anaeróbica, lo que les da un color más pálido. Están presentes en músculos implicados en actividades de alta intensidad y corta duración.

Los músculos están compuestos por diferentes proporciones de cada tipo de fibras según su función específica. Por ejemplo, el sóleo presenta predominantemente fibras de tipo I y IIa. En contraste, tanto el tibial anterior como el gastrocnemio están mayoritariamente formados por fibras tipo IIb, aunque también contienen fibras tipo IIa en menor proporción.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, además de las alteraciones descritas en la unión neuromuscular, se han documentado otras alteraciones que afectan a las fibras musculares y que demuestran el papel activo en la enfermedad. Por ejemplo, se han descrito cambios en las vías de señalización, como la del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1, del inglés *insulin-like growth factor 1*), que regula la proliferación celular en el músculo. En biopsias de pacientes con ELA se ha observado una disminución de los niveles de IGF-1, cuya vía de señalización promueve la hipertrofia muscular (Anakor et al., 2022). En consonancia con esta observación, la sobreexpresión de IGF-1 en el músculo de ratones SOD1^{G93A} mejoró la supervivencia de las motoneuronas, redujo la inflamación en la médula espinal y preservó las uniones neuromusculares, demostrando que los factores secretados por las fibras musculares pueden mejorar la supervivencia neuronal (Dobrowolny et al., 2005). Otro evento patogénico destacado en el músculo esquelético en la ELA es la disfunción proteostática, que conduce a la acumulación de proteínas mal plegadas en el músculo. Este proceso está estrechamente relacionado con diversos factores genéticos y moleculares implicados en la ELA. Estudios recientes han revelado que proteínas como TDP43, FUS y SOD1, comúnmente asociadas con la ELA, se acumulan no solo en las neuronas motoras, sino también en las células musculares, lo que sugiere una interconexión entre la degeneración neuronal y muscular en la enfermedad (Duranti & Villa, 2022). La alteración en la degradación de proteínas a través de la vía de autofagia es crucial en la acumulación de agregados proteicos en el músculo de pacientes con ELA. Varios estudios han demostrado una disfunción en la fusión lisosoma-autofagosoma en el músculo, lo que resulta en una acumulación de agregados proteicos patológicos en el citoplasma de las células musculares. Esta disfunción, vinculada a mutaciones en genes autofágicos, afecta negativamente a la eliminación eficiente de proteínas mal plegadas, exacerbando la degeneración muscular y contribuyendo a la progresión de la ELA (Xia et al., 2021). Por ejemplo, en un ratón con la mutación en el gen VCP, asociada a la ELA, se observó una disminución de la actividad de la vía mTOR, lo que se asocia con una disminución de la autofagia y como consecuencia, una mayor acumulación de agregados proteicos, sugiriendo un papel crucial de esta vía en la homeostasis proteica muscular (Ching et al., 2013). La presencia de agregados proteicos en el músculo provoca la activación de respuestas inflamatorias y puede interferir con la función mitocondrial, resultando en cambios y defectos morfológicos. En este sentido, en pacientes y en modelos animales de ELA, se han detectado cambios morfológicos y bioquímicos en las mitocondrias, incluyendo la presencia de mitocondrias alteradas, disminución de la actividad enzimática y lesiones en el ADN mitocondrial (Zhou et al., 2019b). Los fallos en la función mitocondrial afectan a la producción de energía mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial y aumentan la generación de ROS. Dado que el músculo esquelético depende de un alto número de mitocondrias para satisfacer las elevadas necesidades energéticas de la contracción muscular, las consecuencias de los fallos en la función mitocondrial son particularmente graves en este tejido. De hecho, se ha observado una reducción en la eficiencia energética y una mayor producción de ROS en el músculo esquelético de pacientes y modelos murinos de ELA, junto con una disminución en pacientes de la expresión de enzimas antioxidantes como la manganeso SOD, una enzima presente en la membrana mitocondrial interna encargada de la neutralización de ROS producidos durante la respiración celular (Vielhaber et al.,

2000). Estas alteraciones en el músculo esquelético demuestran que la atrofia muscular va más allá del simple resultado de la degeneración de las motoneuronas.

1.6. Estrategias terapéuticas en la ELA

A pesar de los avances en la comprensión de la patología que se han logrado en los últimos años, la ELA sigue siendo una enfermedad que carece en la actualidad de un tratamiento realmente efectivo para frenar o parar su progresión.

El primer medicamento para el tratamiento de la ELA, el riluzol, fue aprobado en 1995 por la FDA (del inglés, Food and Drug Administration) y un año más tarde, recibió la autorización de la EMA (del inglés, European Medicine Agency). El riluzol actúa reduciendo la excitotoxicidad ligada al glutamato, mediante el bloqueo de los canales de sodio en la neurona presináptica, la activación de los receptores de glutamato EAAT2 y la inhibición de los receptores de glutamato postsinápticos AMPA y NMDA (Gupta et al., 2023). Los primeros estudios en pacientes demostraron una mejora de la progresión de la enfermedad y un aumento de la esperanza de vida de 2 a 3 meses (Bensimon et al., 1994; Lacomblez et al., 1996). Sin embargo, tras su aprobación y uso real en pacientes se ha observado un aumento de la esperanza de vida de entre 6 a 19 meses (Andrews et al., 2020).

A pesar su limitada eficacia, durante muchos años el riluzol fue la única opción de tratamiento disponible para pacientes con ELA, hasta la aparición de la edavarona. En 2015, tras observar un retraso en la progresión de la enfermedad en un ensayo clínico en pacientes en etapas tempranas de la enfermedad, se aprobó este fármaco neutralizador de ROS en Japón y Corea del Sur. Desde entonces, ha sido aprobado para su comercialización en el tratamiento de la ELA en varios países, incluidos Estados Unidos, Canadá, Suiza, China, Indonesia, Malasia y Tailandia. Los resultados de los primeros ensayos clínicos con este fármaco arrojaron resultados diversos pero, en conjunto, revelaron que el fármaco produce beneficios sobre la progresión de la enfermedad únicamente en pacientes en fases tempranas de la enfermedad (Abe et al., 2014; Writing Group & Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group, 2017). En cuanto a los efectos sobre la supervivencia, los resultados también son controvertidos. En algunos casos la administración ha producido un aumento de la esperanza de vida de hasta 6 meses (Brooks et al., 2022) mientras que en otros no se ha observado diferencias significativas en la supervivencia tras el tratamiento a largo plazo (Lunetta et al., 2020; Witzel et al., 2022).

Más recientemente, ha aparecido un nuevo fármaco prometedor para el tratamiento de la ELA, el AMX0035, aprobado en EE. UU. y Canadá. AMX0035 es una combinación de dosis fija de fenilbutirato sódico y taurursodiol, cuya acción reduce la muerte celular neuronal al disminuir el estrés en el retículo endoplásmico (RE) y la disfunción mitocondrial (Kusaczuk, 2019). Tras observar

INTRODUCCIÓN

en un ensayo de fase II, una mejora funcional en pacientes tratados con el compuesto, así como un aumento en la supervivencia media de 6.5 meses en aquellos pacientes tratados desde el momento del diagnóstico (Paganoni et al., 2020, 2021), el fármaco se encuentra en un ensayo en fase III (NCT05021536) para confirmar su eficacia.

Además, el año pasado, como resultado de los esfuerzos realizados en la investigación en terapia génica, la FDA aprobó el fármaco Tofersen, un oligonucleótido antisentido (ASO, del inglés *antisense oligonucleotide*) para el tratamiento de pacientes con ELA y una mutación confirmada en SOD1; y afortunadamente, la EMA ha recomendado recientemente otorgar la autorización de comercialización en la Unión Europea. Los ASOs son secuencias cortas de oligonucleótidos de una sola hebra diseñadas para unirse a ARNm específicos y bloquear su función, lo que puede alterar la expresión de ciertas proteínas. Tofersen se dirige al ARNm de SOD1 mutado y media su degradación, reduciendo así la síntesis de la proteína mSOD1. Hasta ahora, los ensayos clínicos con este medicamento han demostrado que es seguro y que produce una menor pérdida funcional junto con un retraso en la progresión de la enfermedad y una disminución de los niveles de NfL en LCR en los pacientes (Miller et al., 2020). Actualmente, se está llevando a cabo un nuevo ensayo clínico para evaluar su eficacia en pacientes presintomáticos con mutaciones en SOD1 que presentan niveles aumentados del biomarcador NfL en plasma (NCT04856982) (Benatar et al., 2022).

Por último, es importante tener en cuenta que además del tratamiento farmacológico que reciben los pacientes para intentar mitigar la progresión de la enfermedad, también disponen de apoyo psicológico y paliativo, así como tratamiento sintomatológico para mejorar su calidad de vida. Esto incluye que los pacientes reciban terapia física y del habla, terapia ocupacional y sistemas de ayuda robóticos, así como terapia nutricional y ventilación para abordar la insuficiencia respiratoria que se suele dar en las fases más avanzadas de la enfermedad (Xu et al., 2021).

Por tanto, los esfuerzos realizados en los últimos años han permitido el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la ELA. Sin embargo, los beneficios de estos fármacos aún son limitados y, en ocasiones, como ya se ha comentado, restringidos a pacientes con mutaciones genéticas específicas o en estadios muy concretos de la patología. Por ello, es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para abordar esta enfermedad. En este sentido, la regulación del sistema endocannabinoide se postula como una potencial diana terapéutica para esta enfermedad.

2. Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema de comunicación intercelular que desempeña un papel crucial en la regulación de una variedad de funciones fisiológicas en el cuerpo humano. En el SNC están implicado en la regulación de la nocicepción, la actividad motora, procesos de aprendizaje y memoria, en el control de la ingesta y el apetito o el control de la supervivencia neuronal, entre otros procesos (Zou & Kumar, 2018)

El SEC está formado por diferentes elementos entre los que se incluyen, los receptores de cannabinoides, sus ligandos endógenos (endocannabinoides) y las enzimas que catalizan la biosíntesis y la degradación de los endocannabinoides (**Figura 10**).

2.1. Receptores cannabinoides

Hasta la fecha, se han identificado dos receptores canónicos de cannabinoides: el receptor cannabinoide de tipo 1 o receptor CB₁ y el receptor CB₂. Estos receptores forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, del inglés *G protein-coupled receptors*), caracterizados por poseer una estructura de siete segmentos tipo hélice transmembrana y por su capacidad para acoplarse a proteínas G, lo que les permite regular diversas vías de señalización intracelular (Mackie, 2005). Aunque los receptores CB₁ y CB₂ comparten un grado de similitud del 44% en su secuencia de aminoácidos, esta similitud se incrementa considerablemente hasta alcanzar alrededor del 68% en las regiones transmembranales, que son especialmente relevantes para la unión con los ligandos cannabinoides (Montero et al., 2005). Cabe destacar que, a pesar de que estos son los receptores a los que clásicamente se unen los cannabinoides, estos también se pueden unir a otros receptores no canónicos como los receptores GPR55, canales iónicos y receptores nucleares

2.1.1. Receptor CB₁

El primer receptor cannabinoide, CB₁, fue descubierto en el cerebro de la rata en 1988 (Devane et al., 1988) y posteriormente fue clonado en ratas y humanos en 1990 y 1991, respectivamente (Matsuda et al., 1990; Gérard et al., 1991). Sin embargo, la estructura cristalina del receptor CB₁ humano no se obtuvo hasta el año 2016 (Hua et al., 2016). El receptor CB₁ está codificado por el gen *CNR1* localizado en el cromosoma 6 y codifica una proteína compuesta por 472 aminoácidos en humanos (473 en roedores). Se ha observado una alta conservación entre especies del receptor CB₁, con una similitud en la secuencia de aminoácidos que oscila entre el 97% y el 99% entre humanos y roedores. Uno de los aspectos estructurales más relevantes del receptor CB₁ es su

INTRODUCCIÓN

segundo bucle intracelular, ya que desempeña un papel fundamental en la interacción con las proteínas G, lo que determina su especificidad de acoplamiento (Scherma et al., 2019).

Curiosamente, el receptor CB₁ es el GPCR más abundante en el SNC (Herkenham et al., 1991), y se distribuye en varias regiones, incluidos los ganglios basales, el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el tronco encefálico y la médula espinal (Mackie, 2005; Hu & Mackie, 2015). Su presencia en estas estructuras del SNC explica sus diversas funciones fisiológica en la regulación de la actividad motora (Howlett et al., 2004), la percepción del dolor (Guindon & Hohmann, 2009), la ansiedad (Ruehle et al., 2012) o en la memoria y el aprendizaje (Marsicano & Lafenêtre, 2009). Además, el receptor CB₁ está presente en el sistema nervioso periférico (Zou & Kumar, 2018) y en tejidos periféricos no neurales, como el corazón, el hígado, el tracto gastrointestinal, el tejido adiposo, el músculo esquelético y el sistema reproductivo (Howlett et al., 2002; Mackie, 2005).

A nivel molecular, en el SNC se encuentra principalmente en las terminales presinápticas, aunque también se expresa en el soma y las dendritas de neuronas gabaérgicas. Además, se expresa también en otros tipos neuronales entre los que se incluyen neuronas glutamatérgicas, colinérgicas, glicinérgicas y serotoninérgicas (Hu & Mackie, 2015), así como en otras células no neurales, como los oligodendrocitos (Molina-Holgado et al., 2002) y sus precursores (Manterola et al., 2022), la microglía (De Meij et al., 2021) y los astrocitos (Hegyi et al., 2018). Subcelularmente, se localiza principalmente en las membranas plasmáticas, pero también se ha detectado su presencia intracelular en endosomas (Thibault et al., 2013) y en la membrana mitocondrial (Bénard et al., 2012; Jimenez-Blasco et al., 2020). En las endosomas, encontramos receptores CB₁ como parte de procesos de internalización y reciclaje del receptor CB₁ ante una activación prolongada; regulando así la densidad de receptores en la membrana celular y con ello la señalización cannabinoide. Además, en estos compartimentos también pueden desencadenar una señalización dependiente de proteínas G, modulando la liberación de calcio desde el RE y los lisosomas tras la activación por agonistas intracelulares (Zou & Kumar, 2018). Por otro lado, los receptores CB₁ en las mitocondrias (mtCB₁) regulan el metabolismo energético. Así, la activación de los CB₁ mitocondrial produce la disminución de AMP cíclico (AMPc) y de la actividad de la proteína quinasa A (PKA) en las mitocondrias, lo que a su vez reduce la fosforilación de componentes específicos de la cadena de transporte de electrones (Bénard et al., 2012; Jimenez-Blasco et al., 2020), influyendo en la función respiratoria mitocondrial y la producción de energía celular.

La función principal del receptor CB₁ es modular la liberación de glutamato o GABA mediante señalización retrógrada, mecanismo esencial para los procesos de plasticidad sináptica como la despolarización inducida por la supresión de la inhibición y de la excitación (Araque et al., 2017). En este sentido, el mecanismo de señalización del receptor CB₁ implica principalmente la activación de las proteínas G_{i/o}. Una vez activadas, estas proteínas G_{i/o} separan su subunidad α (G _{α i/o}) de las subunidades $\beta\gamma$, lo que permite que tanto la subunidad G _{α i/o} como las subunidades $\beta\gamma$

modulen la actividad de diversas enzimas efectoras y canales iónicos. Por ejemplo, la subunidad $G_{\alpha i/o}$ inhibe el adenilato ciclasa (AC), reduciendo así la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), un segundo mensajero intracelular que puede activar otras proteínas efectoras como la proteína quinasa A (PKA). De esta forma, la activación del receptor CB_1 , a través de la disminución del AMPc, puede influir en la regulación de respuestas celulares controladas por la fosforilación y desfosforilación de proteínas, así como en la transmisión de señales a través de vías de señalización dependientes del AMPc. Por otro lado, las subunidades $\beta\gamma$ liberadas inhiben los canales de calcio activados por voltaje y abren canales de potasio rectificadores internos activados por proteínas G. Esto conduce a la salida de potasio fuera de la célula, induciendo un estado hiperpolarizado y reduciendo la liberación de neurotransmisores. Además, las subunidades $\beta\gamma$ activan las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinases*) y de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) /proteína quinasa B (AKT). Además de su asociación con proteínas $G_{i/o}$, el receptor CB_1 puede también asociarse con proteínas G_s y G_q en ciertos contextos. Cuando se acopla a $G_{\alpha s}$, el receptor CB_1 activa la AC, aumentando los niveles de AMPc. Por otro lado, la proteína G_q activada estimula la fosfolipasa C (PLC), lo cual produce un aumento de la concentración de calcio en el citoplasma desde el retículo endoplásmico, actuando como segundo mensajero, y la activación de la proteína quinasa C (PKC), que regula diversas vías de señalización intracelular como la activación de MAPK y AKT (Zou & Kumar, 2018) (**Figura 9**). De esta forma, la activación de estos receptores CB_1 puede desencadenar diferentes respuestas celulares, derivadas de la activación de una u otra cascada de señalización, en función del contexto celular y fisiológico (Wouters et al., 2019).

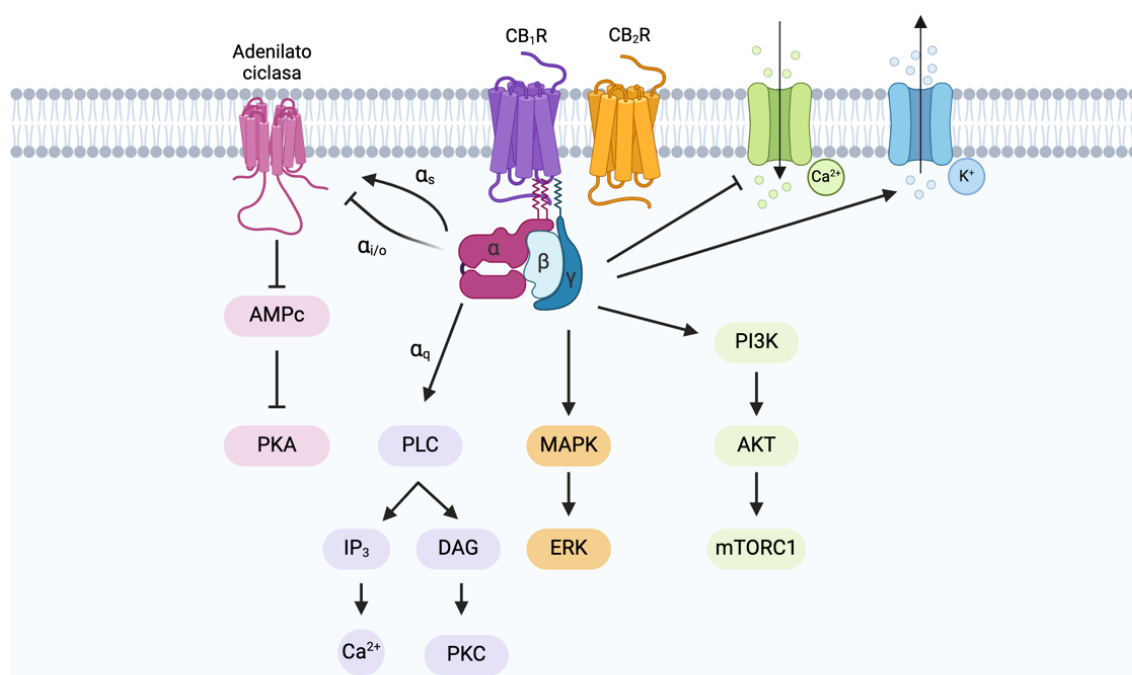


Figura 9: Cascadas de señalización asociadas a la activación de los receptores CB_1 y CB_2 .

Cabe destacar que los receptores CB₁ interactúan de manera significativa con otros tipos de receptores en el SNC, formando heterómeros y modulando así también su señalización. Una de las interacciones más estudiadas es con los receptores de dopamina (Navarro et al., 2008), mostrando que la activación simultánea de ambos receptores puede cambiar la señalización de inhibición a estimulación de la actividad de la AC (Smith et al., 2010). Además, los receptores CB₁ también pueden interactuar con otros receptores como receptores opioides (Mollica et al., 2017), adenosina A_{2A} (Carriba et al., 2007; Chiodi et al., 2016), orexina-1 (Ellis et al., 2006) y receptores serotoninérgicos (Guinart et al., 2020).

Además, el receptor CB₁ a través de su dominio C-terminal interactúa con varias proteínas citoplasmáticas que modulan su actividad, como la proteína 1a que interactúa con el receptor cannabinoide (CRIP1a), las β -arrestinas y las proteínas de clasificación asociadas a GPCR (GASP) (Oliver et al., 2020). Recientemente, se ha identificado otro interactivo y modulador del receptor CB₁, la chaperona BiP (Costas-Insua et al., 2021). La interacción entre BiP y el receptor CB₁ ocurre a través del dominio C-terminal del receptor CB₁ y el dominio C-terminal de BiP, y tiene lugar específicamente en las neuronas gabaérgicas, donde bloquea la vía de señalización G_{q/11}, sin afectar a la vía clásica G_{i/o}.

2.1.2. Receptor CB₂

El receptor CB₂, codificado en humanos por el gen *CNR2* situado en el cromosoma 1, consta de 360 aminoácidos y es altamente conservado entre especies, mostrando una homología de secuencia del 80% entre humanos y roedores. Fue inicialmente identificado en los macrófagos del bazo (Munro et al., 1993) y su estructura cristalina se describió por primera vez en el año 2019 (Li et al., 2019). Inicialmente, se consideraba que el receptor CB₂ desempeñaba un papel periférico, ya que se expresaba predominantemente en células del sistema inmune, particularmente en la línea linfóide y en los monocitos (Galiègue et al., 1995). Sin embargo, investigaciones posteriores revelaron su presencia en otros tejidos y sistemas, como el tracto gastrointestinal, el hígado, el músculo, el tejido adiposo, el hueso, el sistema cardiovascular, o el sistema reproductivo, entre otros (Howlett et al., 2002). Además, también se ha demostrado la presencia de receptores CB₂, aunque en menor medida que los receptores CB₁, en el SNC. Aunque los niveles de expresión basales del receptor CB₂ en el SNC son bajos en individuos sanos, se regulan al alza en respuesta a estímulos patológicos que conllevan neuroinflamación, como los presentes en enfermedades neurodegenerativas (Jordan & Xi, 2019). Se ha observado su expresión en células gliales, incluyendo astrocitos (Fernández-Trapero et al., 2017), microglía (Schmöle et al., 2015; Ruiz de Martín Esteban et al., 2022) y oligodendrocitos (Molina-Holgado et al., 2002) pero también en progenitores neurales (Palazuelos et al., 2012). Respecto a su presencia en neuronas, ha sido objeto de debate durante mucho tiempo; sin embargo, se ha demostrado su expresión en ciertas poblaciones neuronales, especialmente en condiciones de inflamación o lesión neuronal (Rodríguez-Cueto et al., 2014a;

Stempel et al., 2016; Zhang et al., 2017). De esta forma, se ha observado un aumento de la expresión de este receptor en la glía reactiva en muestras *post mortem* de pacientes y en modelos animales de varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Benito et al., 2003; López et al., 2018), Parkinson (Gómez-Gálvez et al., 2016), ataxias espinocerebelosas (Rodríguez-Cueto, et al., 2014a), Huntington (Palazuelos et al., 2009; Sagredo et al., 2009), o ELA (Yiangou et al., 2006; Shoemaker et al., 2007; Moreno-Martet et al., 2014; Espejo-Porras et al., 2015; Fernández-Trapero et al., 2017; Espejo-Porras et al., 2018), entre otras. Los receptores CB₂ en las células gliales se acumulan en el área de la neurodegeneración y parecen desempeñar un papel crucial en la protección y mantenimiento de la integridad y función neuronal (Navarro et al., 2016). Este aumento en la actividad de la glía reactiva se interpreta, por tanto, como una respuesta endógena de protección dirigida a reducir el daño neuroinflamatorio asociado a estas enfermedades, posiblemente relacionado con la capacidad de estas células para modular los procesos inflamatorios.

En cuanto a los mecanismos de señalización intracelular del receptor CB₂, son similares a los descritos para el receptor CB₁ (**Figura 9**). Sin embargo, la activación de los receptores CB₂ produce acoplamiento de las proteínas G_{i/o}, pero no de G_s y G_q (S. Zou & Kumar, 2018). Además, en la señalización del receptor CB₂ la subunidad βγ no tiene efecto sobre los canales de iones Ca²⁺ y K⁺ (Demuth & Molleman, 2006)

2.1.3. Otros receptores cannabinoides

Además de su unión a los receptores CB₁ y CB₂, los cannabinoides ejercen su acción a través de otros receptores, incluyendo otros tres receptores GPCRs, considerados receptores cannabinoides (GPR55, GPR18 y GPR119) canales iónicos (TRP) y receptores nucleares (PPAR) (Hasbi et al., 2023). Estos receptores son activados por moléculas de naturaleza lipídica, incluidos los endocannabinoides y cannabinoides exógenos.

GPR55 en el SNC se encuentra presente en neuronas y en la microglía lo que sugiere un papel importante en la modulación de la inflamación (Pietr et al., 2009). Su principal ligando endógeno es el lisofosfatidilinositol (LPI) y se une a proteínas G diferentes a los receptores CB₁ y CB₂, incluidas G₁₂, G₁₃ y G_q (Henstridge et al., 2011). Por otro lado, GPR18 se activa por N-araquidonoil glicina (Ara-G), N-araquidonoil serina (Ara-S), N-palmitoiletanolamina (PEA) y 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Pacher et al., 2020) y se acopla a G_{i/o} y G_q (Console-Bram et al., 2014). Por su parte, GPR119 tiene como principales ligandos la N-oleoiletanolamina (OEA), la linoleoiletanolamida (LEA), y la PEA (Syed et al., 2012), y se acopla a proteínas G_s (Godlewski et al., 2009).

Los cannabinoides también activan los algunos receptores de potencial transitorio (TRP, del inglés *transient receptor potential receptors*) principalmente TRPV1-TRPV4, TRPA1 y TRPM8 (Muller

et al., 2018). Por lo general, su actuación provoca un incremento en los niveles de Ca^{2+} dentro del citoplasma, lo que activa diversas vías de señalización relacionadas con el dolor. (De Petrocellis et al., 2011). En particular, los receptores vanilloides de tipo 1 (TRPV1) son activados por algunos endocannabinoides y fitocannabinoides. De hecho, algunos investigadores los han propuestos como los receptores ionotrópicos del SEC.

Además, los cannabinoides también pueden modular la actividad de ciertos receptores nucleares, como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs, del inglés *peroxisome proliferator-activated receptors*) (Melis et al., 2010), una familia de receptores implicados en la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos, la proliferación y diferenciación celular y la inflamación (Mirza et al., 2019). Los PPAR α y γ pueden ser activados entre otros ligandos por el 2-AG, la PEA y la OEA así como por fitocannabinoides como el Δ -⁹-tetrahidrocannabinol (Δ ⁹-THC), lo que podría conferir efectos neuroprotectores a través de su actividad antiinflamatoria (O'Sullivan, 2016).

2.2. Endocannabinoides

Los endocannabinoides son sustancias que se generan de manera endógena en el organismo y se unen a los receptores cannabinoides, desempeñando una función reguladora en diversos procesos. Los principales compuestos endocannabinoides son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG).

A diferencia de los neurotransmisores, no se almacenan en vesículas sinápticas. En lugar de eso, se forman como precursores lipídicos en la membrana celular y se generan en las neuronas y en los astrocitos a demanda a partir de fosfolípidos de membrana, específicamente a partir del ácido araquidónico (Lu & Mackie, 2021). Estas moléculas modulan la actividad sináptica mediante un mecanismo de señalización retrógrada. De este modo, la elevación de los niveles de calcio intracelular en la neurona postsináptica, que puede ser resultado de la actividad neuronal intensa u otros estímulos, desencadena la síntesis y liberación de endocannabinoides en la hendidura sináptica. Cuando los endocannabinoides activan los receptores cannabinoides, especialmente los receptores CB₁ en las neuronas presinápticas, inhiben la entrada de calcio, lo que resulta en una reducción de la liberación de neurotransmisores desde la presinapsis. Finalmente, los endocannabinoides son recaptados por la neurona postsináptica y sometidos a procesos de degradación por una serie de enzimas (Castillo et al., 2012).

El primer endocannabinoide descubierto fue la N-araquidonoiletanolamida, también conocida como AEA, que pertenece a la familia de las N-aciletanolaminas (Devane et al., 1992). Aunque es un agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂, tiene una mayor afinidad por el receptor

CB₁. En cuanto a su distribución, está ampliamente presente en el SNC específicamente en áreas con una alta expresión de receptores cannabinoides CB₁ como el hipocampo, el estriado y la corteza cerebral. A nivel periférico, se encuentra presente principalmente en el bazo, el corazón y la piel (Felder et al., 1996). Además de interactuar con los receptores cannabinoides clásicos, la AEA también actúa como agonista de receptores de cannabinoides no canónicos, como TRPV1, GPR55 y PPARs (Scherma et al., 2019).

El 2-AG, el segundo endocannabinoide identificado, en el año 1995, es un tipo de monoacilglicerol (Mechoulam et al., 1995). Presenta una estructura química parecida a la AEA, aunque se encuentra en concentraciones considerablemente más elevadas en el SNC (Sugiura et al., 2006). Actúa como un agonista completo de los receptores CB₁ y CB₂, pero muestra una mayor afinidad por los receptores CB₁. Además, el 2-AG también tiene afinidad por los receptores TRPV1, GPR55 y PPARs (Pertwee et al., 2010).

Aunque la AEA y el 2-AG son los endocannabinoides más ampliamente estudiados, existen otros compuestos derivados de ácidos grasos poliinsaturados con actividad cannabimimética. Estas moléculas incluyen derivados estructurales del 2-AG, como la O-araquidoniletanolamina (virodhamina) y la N-araquidonil dopamina (NADA) y de la AEA, como la OEA y la PEA. Estas últimas moléculas, a diferencia de la AEA no se unen directamente a los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, sino que sus efectos pueden ser mediados por otros receptores distintos de los receptores cannabinoides tradicionales, incluidos PPAR α , TRPV1 y GPR55. No obstante, también se ha planteado la posibilidad de que estas moléculas puedan aumentar la actividad biológica de los endocannabinoides AEA y 2-AG al interactuar con sus mismas vías de síntesis y degradación. De esta forma, al competir por la actividad de estas enzimas, retrasan la degradación de la AEA y 2-AG, haciendo así más prolongados sus efectos. Este fenómeno se conoce como "efecto *entourage*" e implica que estas moléculas podrían influir en la acción de los endocannabinoides principales, potenciando o modificando sus efectos en el organismo (Pacher et al., 2020). De hecho, varios estudios han demostrado que la PEA y OEA aumentan de los efectos de la anandamida mediados por los receptores CB₁ y TRPV1 (De Petrocellis et al., 2002; Ho et al., 2008)

2.3. Metabolismo de endocannabinoides

Respecto a la síntesis de los endocannabinoides, tanto la AEA como el 2-AG se sintetizan a partir de los fosfolípidos de la membrana celular. La síntesis de AEA comienza con la formación del precursor de membrana N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) a través de la acción de la enzima N-aciltransferasa (NAT). Posteriormente, la NAPE se hidroliza por la NAPE fosfolipasa D (NAPE-PLD), generando así la AEA (Lu & Mackie, 2021). Cabe destacar que la NAPE-PLD puede hidrolizar otras N-acil-fosfatidiletanolaminas, produciendo diversos N-aciletanolaminas (NAEs) además de AEA, como la PEA y la OEA. Además, la NAPE puede ser hidrolizada en menor medida por otras enzimas

INTRODUCCIÓN

incluidas la fosfolipasa A2, la PLC y la α/β -hidrolasa 4 (Scherma et al., 2019). Por otro lado, la síntesis de 2-AG implica la hidrólisis inicial del fosfatidil inositol de la membrana celular, que produce el precursor diacilglicerol (DAG). Luego, el DAG se hidroliza por la acción de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL), dando como resultado la formación de 2-AG. Además, existen otras vías alternativas menos comunes para la síntesis de 2-AG que involucran la hidrólisis secuencial del fosfatidilinositol por la fosfolipasa A1 y posteriormente por la PLC específica de lisofosfatidilinositol (Scherma et al., 2019) (**Figura 10**).

Una vez liberados al medio extracelular y después de cumplir su función, los endocannabinoides son recaptados de la brecha sináptica para su degradación a través de mecanismos que aún no se comprenden completamente. Existe controversia en torno a si la recaptación se produce a través de una proteína transportadora específica de endocannabinoides, o si los endocannabinoides son recaptados por difusión pasiva facilitada por su naturaleza hidrofóbica (Kaczocha et al., 2006). No obstante, la existencia de estudios que muestran que la liberación de AEA al espacio extracelular puede ser regulada y llegar a un máximo, independientemente de la concentración externa, descarta la difusión pasiva y apoya la hipótesis de un verdadera proteína transportadora de endocannabinoides encargado de esta función, todavía hoy no identificada (Chicca et al., 2012)

La señalización biológica finaliza con la degradación de los endocannabinoides en el interior de la célula, a través de una o varias reacciones enzimáticas. La AEA se degrada principalmente a través de una serina hidrolasa, la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*), generando ácido araquidónico y etanolamina como productos de su hidrólisis. La enzima FAAH se encuentra en niveles elevados principalmente en el SNC, aunque está ampliamente distribuida en todo el organismo expresándose también en tejidos periféricos como el hígado, el intestino delgado, los testículos, el útero y el riñón. En el cerebro, su distribución es similar a la del receptor CB₁ y se localiza postsinápticamente principalmente en las células de Purkinje y las células piramidales en la corteza cerebral y el hipocampo, pero también en los astrocitos y la microglía (Cravatt et al., 1996). A nivel subcelular, se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática (Tripathi, 2020). Además, cabe destacar que la expresión aumenta en muestras *post mortem* de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, específicamente en astrocitos y microglía (Benito et al., 2003; Grieco et al., 2021) o las ataxias espinocerebelosas, donde aparece aumentada en las neuronas de Purkinje (Rodríguez-Cueto et al., 2014b). Por otro lado, la AEA puede ser degradada también por la N-aciletanolamina ácido amidasa (NAAA) generando también ácido araquidónico y etanolamina. Además, ambas enzimas participan en la degradación también de otras amidas, como la PEA y la OEA (Ho et al., 2008).

Por otro lado, la principal vía de degradación del 2-AG ocurre a través de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), la cual lo hidroliza produciendo como productos ácido

araquidónico y glicerol. Esta enzima se localiza en las terminales axonales de las neuronas presinápticas (Dinh et al., 2002), pero también se ha descrito su expresión en astrocitos (Viader et al., 2015; Zhu et al., 2023a) y en microglía (Tanaka et al., 2019). Además de por la MAGL, el 2-AG puede ser eliminado en cierta medida por la enzima FAAH y por las enzimas hidrolasa alfa/beta 6 (ABHD6) y 12 (ABHD12) (Navia-Paldanius et al., 2012).

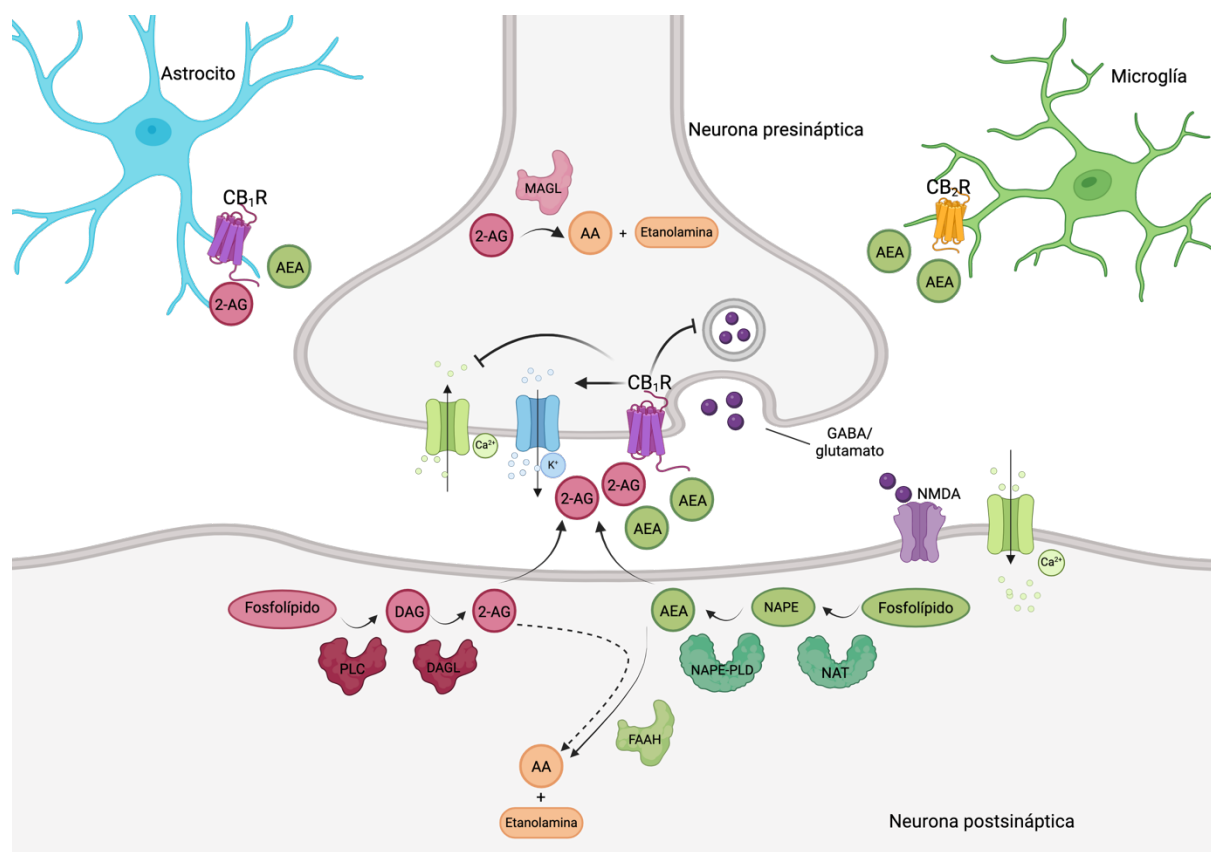


Figura 10: Rutas principales de síntesis, señalización y degradación de los endocannabinoides. Imagen creada con Biorender.com

Además, tanto la AEA como el 2-AG, pueden ser metabolizados por enzimas que participan en el metabolismo de eicosanoides, como las ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas y oxidasas del complejo P450. La acción de estas enzimas inactiva los cannabinoides al mismo tiempo que genera moléculas bioactivas como prostamidas, en el caso de la AEA y a prostaglandin-gliceril-ésteres, como producto de degradación del 2-AG (Scherma et al., 2019).

2.4. Modulación farmacológica del SEC

Los fitocannabinoides, compuestos presentes en la planta *Cannabis sativa*, junto con los cannabinoides sintéticos (compuestos diseñados en laboratorio que imitan los efectos de los

cannabinoides naturales), han emergido como herramientas farmacológicas potencialmente útiles para manipular selectivamente la actividad del sistema endocannabinoide.

2.4.1. Fitocannabinoides

La *Cannabis sativa* es una de las plantas cultivadas más antiguas del mundo y ha sido utilizada durante milenios por antiguas civilizaciones para fines recreativos, religiosos y medicinales. Su uso medicinal está documentado desde el 2350 a.C. en el Antiguo Egipto y su uso terapéutico se ha mantenido hasta la actualidad. El interés en sus propiedades analgésicas, sedantes y anticonvulsivantes, y el desarrollo de nuevos métodos de cromatografía impulsaron el aislamiento de los principales componentes de la planta: el cannabidiol (CBD) en 1963 (Mechoulam & Shvo, 1963) y un año más tarde, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964). Estos descubrimientos sentaron las bases para la identificación posterior de las dianas de estos endocannabinoides, así como los ligandos endógenos y las enzimas de síntesis y degradación, marcando, por tanto, el inicio del estudio del SEC. Desde entonces, más de cien fitocannabinoides han sido identificados en la planta *Cannabis sativa*, aunque los más estudiados y conocidos son el Δ^9 -THC y el CBD.

El Δ^9 -THC es el principal fitocannabinoide del cannabis y es responsable de sus efectos psicotrópicos. Es un agonista parcial de los receptores CB₁ y CB₂, con mayor afinidad por el receptor CB₁, cuya activación en el SNC es responsable de los síntomas de la conocida como tétlada cannabinoide asociados al consumo de cannabis que incluyen hipolocomoción, hipotermia, catalepsia y antinocicepción (Finn et al., 2021). Además, el Δ^9 -THC produce analgesia y efectos antiinflamatorios (Pacher et al., 2020).

Por otro lado, el CBD es el fitocannabinoide no psicotrópico más abundante en el cannabis. Tiene una baja afinidad por los receptores CB₁ y CB₂ (Howlett et al., 2002; Pertwee et al., 2010), aunque en ciertas circunstancias puede actuar como un modulador alostérico negativo de estos receptores (Laprairie et al., 2015; Martínez-Pinilla et al., 2017). Sin embargo, sus efectos primarios son derivados de la activación de receptores no cannabinoides, como PPAR γ , TRPV1, serotonina 5-HT_{1A} y receptores de adenosina A₁ y A₂ y de la inhibición de los receptores GPR55 y TRPM8 (Chayasirisobhon, 2021; Martínez Naya et al., 2023). Además, debido a su estructura química, el CBD exhibe potentes propiedades antioxidantes independientes de su unión a receptores (Atalay et al., 2019). Se ha demostrado que el CBD tiene una amplia variedad de efectos terapéuticos, que incluyen propiedades analgésicas, ansiolíticas, antipsicóticas y antiinflamatorias (Pisanti et al., 2017).

Además del Δ^9 -THC y el CBD, hay otros fitocannabinoides presentes en la planta del cannabis, como el cannabigerol (CBG), el cannabicromeno (CBC), el tetrahidrocannabivarín (THCV) y el cannabinol (CBN) entre otros, que aunque se encuentren en menor proporción en la planta,

también son interesantes por sus diferentes perfiles farmacológicos y su capacidad de actuar sobre diferentes vías de señalización (Blebea et al., 2024). Por ejemplo, el cannabigerol presenta baja afinidad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, pero activa el receptor adrenérgico α_2 y bloquea moderadamente el receptor serotoninérgico 5HT_{1A}. Además, actúa como agonista potente de TRPA1, como agonista débil de TRPV1 y TRPV2, y como antagonista potente de TRPM8 (Franco et al., 2021).

2.4.2. Cannabinoides sintéticos

Los estudios que relacionan la estructura de los cannabinoides con su actividad farmacológica han impulsado la síntesis de moléculas con una conformación capaz de actuar de forma selectiva sobre algunas moléculas diana del SEC. Estos ligandos han sido de gran utilidad en el estudio de la farmacología e implicación fisiológica del SEC (Alves et al., 2020).

Estas moléculas se dividen en varios tipos, incluyendo agonistas no selectivos de los receptores CB₁ y CB₂, como WIN55212-2 y CP55940, capaces de activar ambos receptores (Howlett et al., 2002), así como agonistas selectivos del CB₁R como ACEA (Hillard et al., 1999) y del CB₂R como HU-308 (Hanus et al., 1999), AM-1241 (Ibrahim et al., 2003), Ro-6866945 (Alami et al., 2018) y Ro-6871304 (Porter et al., 2019). Además, se han desarrollado antagonistas selectivos de ambos receptores entre los que destacan Rimonabant (SR141716A) y SR144528, antagonistas de los receptores CB₁ y CB₂, respectivamente (Shire et al., 1999) así como moduladores alostéricos como VCE006.1, un modulador alostérico positivo de los receptores GPR55 (Burgaz et al., 2021). Además, algunas moléculas regulan el tono cannabinoide modulando las enzimas implicadas en el metabolismo de los endocannabinoides. Dentro de estas moléculas podemos encontrar inhibidores de las enzimas de degradación, que pueden ser reversibles, o irreversibles. Los inhibidores reversibles, como el inhibidor selectivo de la FAAH SSR411298 (Griebel et al., 2018), se unen de manera no permanente permitiendo que la enzima recupere su actividad metabólica una vez que el inhibidor se disocia, por lo que, aunque el efecto sea menor, a menudo son más seguros. Por otro lado, los irreversibles, como el inhibidor selectivo de la FAAH URB597 (Piomelli et al., 2006), inactivan la enzima impidiendo una unión posterior, por lo que los efectos persisten aún en ausencia del inhibidor.

El uso de inhibidores de la enzima FAAH representa una estrategia prometedora para el tratamiento de trastornos del SNC. Esto es debido a que han demostrado proporcionar beneficios terapéuticos significativos como analgesia, antiinflamación, ansiólisis y efectos antidepresivos, sin provocar los efectos secundarios adversos en la motilidad o la cognición derivados de la activación directa mediante agonistas de los receptores CB₁ (Ahn et al., 2009). En este sentido, se ha observado que la delección genética de la enzima FAAH en ratones evita la degradación de los endocannabinoides, permitiendo un aumento significativo en las concentraciones naturales de AEA

INTRODUCCIÓN

en diversas regiones cerebrales (Clement et al., 2003), lo cual explica los efectos beneficiosos observados con la inhibición farmacológica de esta enzima y respalda su potencial terapéutico. Por tanto, esta estrategia se considera más segura y puede ser efectiva en una variedad de trastornos del SNC.

Dado que la inhibición de FAAH aumenta los niveles de AEA, que actúa principalmente a través de los receptores CB₁, los inhibidores de FAAH han sido investigados en diversas enfermedades donde la activación de los receptores CB₁ ha demostrado ser beneficiosa como el dolor neuropático, los trastornos del estado de ánimo como la ansiedad y el trastorno de estrés postraumático, así como trastornos inflamatorios, adicciones y enfermedades neurodegenerativas.

Así, la elevación del tono endocannabinoide al utilizar inhibidores selectivos de la FAAH, como el URB597, uno de los inhibidores más empleados, ha puesto de manifiesto su efecto neuroprotector en diversos modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington (Dowie et al., 2010), la enfermedad de Parkinson (Escamilla-Ramírez et al., 2017; Viveros-Paredes et al., 2019), y la demencia frontotemporal (Santos-García et al., 2023). Concretamente, en este último experimento, la administración de URB597 mejoró los déficits cognitivos junto con un aumento de la supervivencia neuronal y una disminución de los fenómenos de gliosis. Además, la administración de JZL-195, un inhibidor que actúa conjuntamente sobre las dos principales enzimas de degradación (MAGL y FAAH) en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer, conllevó una disminución de la acumulación de agregados proteicos, junto con una disminución de la neuroinflamación y el estrés oxidativo (Bajaj et al., 2022).

Además de las evidencias a nivel preclínico, varios inhibidores de la FAAH han mostrado efectos prometedores también en ensayos clínicos. Por ejemplo, el PF-04457845, un inhibidor irreversible de FAAH altamente potente y selectivo, mostró eficacia en la reducción de los síntomas de abstinencia y el consumo de cannabis en pacientes con dependencia de la marihuana (D'Souza et al., 2019). Además, en adultos sanos, el tratamiento con PF-04457845 resultó en un aumento de los niveles de AEA y una reducción del miedo (Mayo et al., 2020), lo que ha llevado al desarrollo de ensayos de fase II para su uso en el tratamiento del trastorno de estrés postraumático (NCT02216097). Sin embargo, en pacientes con dolor neuropático periférico, aunque la administración de ASP8477, otro inhibidor de FAAH, fue bien tolerada en individuos sanos, no demostró efectos analgésicos en la población analizada (Bradford et al., 2017). Lo mismo ocurrió con el inhibidor reversible V158866, que demostró buena tolerancia (Pawsey et al., 2016) pero ausencia de efectos analgésicos significativos en los pacientes estudiados.

A pesar de los resultados prometedores de algunos inhibidores de la FAAH en estudios preclínicos y clínicos, como los mencionados anteriormente, es necesario mencionar que el inhibidor de la FAAH BIA10-2474 mostró neurotoxicidad en voluntarios sanos durante un ensayo de fase I al administrarse a una dosis alta de 50 mg diarios del compuesto (Chaikin, 2017). Sin embargo,

investigaciones posteriores mostraron que esta toxicidad se debía a que el inhibidor irreversible no era específico de la FAAH, sino que también inhibían diferentes lipasas, lo que provocaba cambios significativos en las redes lipídicas de las neuronas corticales humanas (van Esbroeck et al., 2017). Los resultados de este ensayo tuvieron una gran repercusión que cuestionó el uso de esta estrategia terapéutica. Sin embargo, este hecho no debe frenar el desarrollo de terapias destinadas a la inhibición de FAAH, sino promover la investigación en el desarrollo de inhibidores más selectivos para aprovechar el potencial de actuar sobre esta diana molecular.

2.5. Papel neuroprotector de SEC

El sistema endocannabinoide desempeña un papel crucial en la regulación de diversas funciones fisiológicas, entre ellas en la supervivencia y muerte celular. Se ha observado que, en situaciones patológicas del sistema nervioso, el SEC activa una respuesta endógena de protección, que implica cambios en la expresión de sus componentes, con el fin de preservar la estructura, función y viabilidad de las neuronas (Vasincu et al., 2022).

Este papel neuroprotector se atribuye a la amplia gama de acciones del SEC sobre diversos mecanismos moleculares, algunos de los cuales están relacionados con eventos citotóxicos relevantes en enfermedades neurodegenerativas, como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la excitotoxicidad.

2.5.1. Efectos antiinflamatorios del SEC

Como se ha descrito anteriormente, en situaciones patológicas, como las enfermedades neurodegenerativas, se ha observado una sobreexpresión del receptor CB₂ en las células gliales (Jordan & Xi, 2019). Este incremento también se observa al estimular estas células con factores proinflamatorios como el lipopolisacárido y el interferón- γ (IFN- γ), confirmando así su papel en la respuesta inflamatoria (Navarro et al., 2018). Este fenómeno refuerza la capacidad de los cannabinoides para modular la respuesta inmune mediante la activación de los receptores CB₂, que promueve la producción de mediadores antiinflamatorios como IL-4, IL-10 y factores neurotróficos como GDNF, mientras reduce la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α (Komorowska-Müller & Schmöle, 2020). Además de los receptores CB₂, otros receptores como CB₁, GPR55 y PPAR γ también contribuyen a estos efectos inmunomoduladores (Benito et al., 2008; Kallendrusch et al., 2013; Pistis & O'Sullivan, 2017; Leonard & Aricioglu, 2023). En la esclerosis múltiple, una enfermedad en la cual la neuroinflamación desempeña un papel crucial en la progresión de la enfermedad, se ha comprobado que además de la respuesta del receptor CB₂ de la microglía, hay una importante respuesta inflamatoria mediada por los receptores CB₂ expresados en los linfocitos T infiltrantes y los monocitos (Vasincu et al., 2022). Asimismo, cabe destacar que los

receptores CB₂ también están presentes en el endotelio cerebral, donde preservan la integridad de la BHE durante la inflamación cerebral. De hecho, se ha observado que el receptor CB₂ se sobreexpresa en modelos murinos de trauma cerebral y también tras la estimulación con TNF- α en una línea celular endotelial cerebral humana (Bullock et al., 2023).

Diversos estudios farmacológicos respaldan que el aumento de los niveles de CB₂ en los diferentes tipos celulares forma parte de una respuesta neuroprotectora del organismo. En este sentido, la activación de los receptores CB₂ en diferentes condiciones patológicas ha demostrado efectos antiinflamatorios y la reducción de factores neurotóxicos como TNF- α acompañados de mejoras en la supervivencia neuronal en modelos preclínicos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Tolón et al., 2009; Aso et al., 2013), la enfermedad de Huntington (Palazuelos et al., 2009; Sagredo et al., 2009), la enfermedad de Parkinson (Gómez-Gálvez et al., 2016) y la ELA (Shoemaker et al., 2007; Espejo-Porras et al., 2019; Rodríguez-Cueto et al., 2021). De manera similar, la activación de los receptores CB₂ en pacientes con esclerosis múltiple, ha disminuido la producción de TNF- α por células T específicas (CD4⁺ y CD8⁺) y otras citocinas proinflamatorias (Tiberi et al., 2022). Además, varios estudios han mostrado que la activación de los receptores CB₂ preserva la función de la BHE en modelos de neuroinflamación tanto *in vitro* (Bullock et al., 2023) como *in vivo* (Wang et al., 2018). En contraste, la delección genética de los receptores CB₂ en modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas ha desencadenado un incremento de la respuesta inflamatoria conduciendo a un agravamiento de la patología y confirmando el efecto neuroprotector de CB₂. Por ejemplo, en la enfermedad de Huntington, la delección de CB₂ produjo un aumento la activación microglial y de la sintomatología y una menor esperanza de vida (Palazuelos et al., 2009); mientras que en un modelo murino de Parkinson, condujo a un aumento la muerte neuronal (García et al., 2011). De manera similar, en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T} la delección agravó el fenotipo patológico y adelantó la aparición de los síntomas motores (Rodríguez-Cueto et al., 2021).

2.5.2. Efectos antiexcitotóxicos del SEC

En varias situaciones patológicas que afectan al SNC, incluyendo la ELA, se produce una liberación excesiva del aminoácido excitador glutamato, que activa receptores NMDA en las neuronas lo que provoca una entrada descontrolada de calcio en las células, desencadenando una cascada de eventos celulares que culminan en una disfunción celular y en su caso, muerte de las neuronas.

Los cannabinoides desempeñan un papel fundamental en la regulación de la excitotoxicidad. Por un lado, a través de la activación del receptor CB₁, puede modular la liberación de glutamato en las neuronas presinápticas y, por lo tanto, modular la actividad de los receptores NMDA y reducir así la excitotoxicidad neuronal. En este sentido, se ha observado que la activación

de los receptores CB₁ protege a motoneuronas primarias de la excitotoxicidad inducida por kainato (Abood et al., 2001). Además, en un modelo murino *knockout* condicional del receptor CB₁ en neuronas piramidales del cerebro anterior, la inducción de excitotoxicidad por kainato produjo convulsiones excesivas (Marsicano et al., 2003). De manera similar, en un modelo enfermedad de Huntington (R6/2) con delección del receptor CB₁ en neuronas glutamatérgicas corticoestriatales, se confirmó que el receptor CB₁ es fundamental para la respuesta neuroprotectora ante la excitotoxicidad por glutamato (Chiarlone et al., 2014).

Por otro lado, los receptores CB₂ también pueden desempeñar un rol importante en la modulación de la excitotoxicidad. Esto se debe a su capacidad para formar heterómeros con los receptores NMDA, y al activarse, bloquear la función ionotrópica de los receptores NMDA (Rivas-Santisteban et al., 2021).

2.5.3. Efectos antioxidantes del SEC

En situaciones de neurodegeneración se produce un aumento en la liberación de ROS y otros productos tóxicos; que pueden causar daño oxidativo en las proteínas, el ADN y los lípidos de las membranas celulares, contribuyendo a la degeneración y la muerte de las neuronas.

Ciertos cannabinoides ejercen efectos antioxidantes significativos en el organismo a través de mecanismos independientes de los receptores cannabinoides. Por ejemplo, el CBD, junto con compuestos como el Δ^9 -THC y el CBN contienen un anillo fenólico en su estructura química, lo que les permite actuar como captadores de especies ROS, reduciendo así el estrés oxidativo (Pagano et al., 2023).

Por otro lado, también se han descrito efectos antioxidantes dependientes de receptor. Por ejemplo, se ha observado que la AEA protege *in vitro* a las neuronas frente al daño oxidativo al disminuir las ROS mediante la activación de los receptores CB₁ (Jia et al., 2014). Además, algunos cannabinoides pueden ejercer estos efectos antioxidantes también mediante la regulación vías de señalización relacionadas con la expresión de enzimas antioxidantes. Por ejemplo, CBD media la activación de los receptores PPAR, cuya activación, regula directamente la expresión de enzimas antioxidantes como la glutatión S-transferasa (GST) o la catalasa (CAT) al mismo tiempo que activa la vía de señalización antioxidante de Nrf2 (Khosropoor et al., 2023), que a su vez controla la expresión de COX-2 e iNOS. (Martinez Naya et al., 2023). De hecho, se ha observado que el tratamiento con CBD disminuye el estrés oxidativo en cultivos celulares expuestos a H₂O₂ mediante la inhibición de la expresión de las enzimas COX-2 e iNOS (Chen et al., 2016).

2.6. El SEC en la ELA

Como se ha mencionado, los cannabinoides son compuestos pleiotrópicos capaces de influir en múltiples mecanismos patogénicos. Este hecho convierte la modulación del SEC en una estrategia prometedora multidiana para enfermedades neurológicas como la ELA en las cuales el daño neuronal resulta de la combinación de diversos procesos patológicos. En este sentido, numerosos estudios preclínicos han descrito a los cannabinoides como agentes neuroprotectores en modelos animales de trastornos neurodegenerativos crónicos como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer, entre otras (Vasincu et al., 2022). Al igual que sucede en estas enfermedades neurodegenerativas, durante la patogénesis de la ELA, se producen una serie de cambios adaptativos en el SEC. Estos cambios pueden reflejar una respuesta protectora endógena ante el avance de la enfermedad, o bien pueden jugar un papel activo y significativo en su desarrollo y progresión.

Por un lado, existen diversos estudios en modelos preclínicos que reflejan respuestas protectoras endógenas para contrarrestar el avance de la enfermedad. Por ejemplo, en el modelo murino de SOD1^{G93A} se identificó un incremento de los niveles de 2-AG y AEA en la médula espinal de estos ratones en etapas sintomáticas (Witting et al., 2004; Bilsland et al., 2006); y de la enzimas de síntesis NAPE-PLD, aunque sin cambios en las DAGL ni en las enzimas de degradación de endocannabinoides (Moreno-Martet et al., 2014). De manera similar, en el modelo murino TDP43^{A315T} se observaron cambios en esta misma dirección, con un aumento de los niveles de endocannabinoides y una disminución de la expresión de la FAAH en etapas sintomáticas pero sin cambios en la expresión de otras enzimas metabólicas (Espejo-Porras et al., 2015). En conjunto, estos cambios indican un incremento del tono endocannabinoide durante la enfermedad, que podría tratarse de una respuesta endógena protectora del organismo para contrarrestar el daño. Estas respuestas podrían ser potenciadas desde un punto de vista farmacológico mediante la inhibición de las enzimas de degradación de los endocannabinoides (FAAH y MAGL).

Además, como ya se ha comentado, el receptor CB₂ desempeña un papel crucial en las células microgliales y astrocitos activados en respuesta a estímulos tóxicos, reduciendo la liberación de moléculas proinflamatorias y aumentando la producción de citoquinas antiinflamatorias. En la ELA, se ha observado un aumento del receptor CB₂ en la médula espinal (Yiangou et al., 2006) y en la corteza motora (Espejo-Porras et al., 2018) en muestras *post mortem* de pacientes con ELA, así como en la médula espinal de ratones SOD1^{G93A} (Shoemaker et al., 2007; Moreno-Martet et al., 2014), de ratones TDP43^{A315T} (Espejo-Porras et al., 2015, 2019) y de perros con mielopatía degenerativa canina, una enfermedad en perros similar a la de ELA que presenta mutaciones SOD1 (Fernández-Trapero et al., 2017).

Este aumento del receptor CB₂ se produjo específicamente en los astrocitos reclutados en la corteza motora primaria de muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Espejo-Porrás et al., 2018b), así como en los astrocitos reactivos de las médulas espinales de ratones transgénicos SOD1^{G93A} (Espejo-Porrás et al., no publicados) y de ratones transgénicos TDP43^{A315T} (Espejo-Porrás et al., 2015, 2019). También se detectó un aumento de este receptor en las células microgliales reactivas de la médula espinal de muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Yiangou et al., 2006) y de la médula espinal de ratones transgénicos TDP43 (Espejo-Porrás et al., 2019). En conjunto, el aumento del receptor CB₂ en astrocitos y células microgliales en la ELA sugiere una respuesta protectora para contrarrestar la muerte neuronal mediante una mejora del soporte metabólico por parte de los astrocitos y una disminución de la liberación de moléculas proinflamatorias así como un aumento de las citoquinas antiinflamatorias por parte de la microglía.

Por otro lado, los cambios identificados en los elementos del SEC en los diferentes modelos de ELA pueden interpretarse como consecuencia de la patología y contribuir al desarrollo de la enfermedad. Este parece ser el caso de los cambios observados en el receptor CB₁. Por ejemplo, en ratones mutantes SOD1^{G93A} en etapas presintomáticas se observó una disminución de los niveles del receptor CB₁ en las motoneuronas junto con un aumento de receptores de glutamato, lo que sugiere que la pérdida del receptor CB₁ en este modelo contribuye a la excitotoxicidad y, por ende, a la muerte de las motoneuronas (Zhao et al., 2008). Sin embargo, los cambios en relación al receptor CB₁ son controvertidos en la ELA, ya que otro estudio en este mismo modelo SOD1^{G93A} no encontró diferencias en la expresión del receptor CB₁ (Moreno-Martet et al., 2014). Estas discrepancias pueden explicarse porque el segundo estudio analizó los niveles de expresión del receptor en lugar de los niveles proteicos, y además se realizó en fases más avanzadas de la enfermedad. De manera similar, en el modelo murino TDP43^{A315T} y en la corteza motora de muestras *post mortem* de pacientes con ELA tampoco se han descrito cambios en la expresión del receptor CB₁ (Espejo-Porrás et al., 2015, 2018); pero sí que se ha observado una disminución de los niveles de expresión de los receptores CB₁ en la médula espinal de muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Espejo-Porrás et al., 2018). No obstante, cabe destacar que el descenso en los niveles de expresión de CB₁ podría ser un efecto secundario de la neurodegeneración neuronal en sí misma, ya que la reducción en los niveles de CB₁ puede ser atribuida a la pérdida de neuronas. Del mismo modo, la ausencia de diferencias en los niveles de expresión de CB₁ en la médula espinal, a pesar de la presencia de muerte neuronal, podría intrínsecamente estar revelando un aumento de los niveles de este receptor en las motoneuronas o células gliales.

En base a estas variaciones en los elementos del SEC observadas en las diferentes muestras analizadas en la ELA, se han realizado diversos estudios farmacológicos con agonistas y/o antagonistas de los receptores cannabinoides que han arrojado información importante del papel del SEC en la ELA. En este sentido, varios estudios señalan un efecto beneficioso de la activación de los receptores CB₁ y CB₂ en la enfermedad. Así, en el modelo SOD1^{G93A} el tratamiento con Δ⁹-THC en estadios presintomáticos retrasó el deterioro motor y prolongó la supervivencia en los ratones.

INTRODUCCIÓN

Estudios *in vitro* utilizando cultivos neuronales de médula espinal sugieren que estos efectos están relacionado con la capacidad Δ^9 -THC para reducir el daño oxidativo y actuar como un agente antiexcitotóxico (Raman et al., 2004). Además, diversos estudios basados en la administración de otros agonistas no selectivos como CBN y WIN-55,212-2 en el modelo murino SOD1^{G93A} confirmaron estos resultados pues demostraron retrasar la aparición y la progresión de la sintomatología (Weydt et al., 2005; Bilstrand et al., 2006; Shoemaker et al., 2007). Además, se ha estudiado en este modelo también el efecto de la activación selectiva de receptores CB₂. En este sentido, el tratamiento con AM-1241, un agonista selectivo del receptor CB₂, retrasó la progresión de la enfermedad (Kim et al., 2006) y aumentó la esperanza de vida en ratones SOD1^{G93A} (Shoemaker et al., 2007). Sin embargo, de acuerdo con un estudio reciente, el efecto positivo de la activación de los receptores CB₂ parece producirse exclusivamente en etapas avanzadas de la enfermedad (Alami et al., 2018).

Asimismo, se han llevado a cabo varias estrategias farmacológicas en el modelo TDP43^{A315T}. Por un lado, de manera similar a lo observado en el modelo SOD1^{G93A}, la administración de agonista no selectivo WIN55,212-2 produjo mejoras sobre la supervivencia neuronal, el comportamiento motor y la neuroinflamación en este modelo. Sin embargo, estudios posteriores con antagonistas CB₁ y CB₂ demostraron que, aunque existía cierta contribución de los receptores CB₁ en estos efectos, el efecto principal estaba mediado por la activación de los receptores CB₂ (Espejo-Porras et al., 2019). Un experimento posterior en este modelo con el agonista selectivo de los receptores del CB₂, HU-308, mostró una respuesta neuroprotectora mayor, corroborando los efectos beneficiosos de la activación del receptor CB₂ en la enfermedad en este modelo. Recientemente, la importancia del receptor CB₂ en la patogenia de la enfermedad se ha confirmado mediante la generación de un ratón transgénico TDP43^{A315T} con delección genética del receptor CB₂. La ausencia de este receptor en estos animales adelantó la aparición de los síntomas motores y la muerte neuronal reduciendo la supervivencia de los animales transgénicos frente a aquellos con expresión normal del receptor, confirmando su papel neuroprotector (Rodríguez-Cueto et al., 2021). En conjunto, estos resultados confirman que el incremento de la expresión de los receptores CB₂ observados durante la progresión de la ELA es una respuesta endógena protectora y validan la activación de estos receptores como una potencial terapia para la enfermedad.

Por otro lado, como se ha mencionado previamente, el incremento en los niveles de endocannabinoides junto con la disminución de las enzimas de degradación de los cannabinoides en modelos de ELA sugiere un aumento en el tono endocannabinoide como una posible respuesta protectora durante la progresión de la enfermedad. Con el objetivo de potenciar esta respuesta neuroprotectora de aumento del tono endocannabinoide, se han llevado a cabo aproximaciones farmacológicas para inhibir las enzimas de degradación, pero también mediante la delección genética de estas enzimas. Por un lado, en el modelo murino SOD1^{G93A}, la inhibición farmacológica de MAGL retrasó el inicio de los síntomas y mejoró la progresión de la enfermedad y la supervivencia de los animales (Pasquarelli et al., 2017). Por otro lado, en este mismo modelo, la ablación genética de la enzima FAAH condujo a un aumento de los niveles de endocannabinoides

y a un retraso en los signos de la enfermedad en los animales $SOD1^{G93A}$, aunque no se observaron mejoras significativas en su supervivencia (Bilsland et al., 2006). En conjunto, estos resultados demuestran que la inhibición de las enzimas de degradación de endocannabinoides puede tener un efecto neuroprotector en la ELA al incrementar el tono cannabinoide. Sorprendentemente, la ablación genética del receptor CB_1 no afectó el inicio de la enfermedad en ratones $SOD1^{G93A}$, pero prolongó su esperanza de vida (Bilsland et al., 2006), lo que sugiere que los efectos positivos observados con el aumento del tono endocannabinoide en el modelo $SOD1^{G93A}$ no son principalmente mediados por este receptor, sugiriendo así un papel más importante del receptor CB_2 en estos efectos.

Dadas las evidencias a nivel preclínico del potencial de los cannabinoides en la ELA se hace necesario el estudio del potencial terapéutico de los cannabinoides en pacientes. Sin embargo, la mayoría de los ensayos llevados a cabo han evaluado principalmente el efecto de estos compuestos en los síntomas de los pacientes en lugar de centrarse en sus efectos sobre la progresión de la enfermedad. Así, los primeros estudios realizados se basaron en el análisis observacional de pacientes que se automedicaban con cannabis (Amtmann et al., 2004). Estos ensayos fueron seguidos de ensayos clínicos controlados destinados a evaluar el efecto de la administración de Δ^9 -THC sobre algunos de los síntomas de la enfermedad como los calambres y las fasciculaciones, mostrando buena tolerancia al Δ^9 -THC pero sin lograr una reducción de estos síntomas de la ELA (Weber et al., 2010; Joerger et al., 2012).

Por otro lado, un ensayo clínico más reciente examinó el uso de Sativex, un extracto 1:1 de THC y CBD utilizado para tratar la espasticidad en la esclerosis múltiple, en pacientes con ELA. Los resultados mostraron un perfil aceptable de seguridad y tolerabilidad, junto con efectos positivos en la espasticidad asociada a la ELA (Riva et al., 2019). Además, actualmente se está desarrollando otro ensayo clínico, conocido como "ensayo EMERALD", para examinar eficacia de un extracto de cannabis con una alta concentración de CBD en pacientes con ELA en Australia (Urbi et al., 2019). Los estudios en fase II demostraron buena tolerancia en todas las dosis terapéuticas y actualmente se está realizando el reclutamiento de pacientes para la fase III.

A pesar de disponer de estos estudios, el número de ensayos clínicos todavía es insuficiente para obtener datos fiables sobre la eficacia de estos compuestos en pacientes de ELA, lo que subraya la necesidad de estudios adicionales y más amplios para confirmar y ampliar estos hallazgos.



OBJETIVOS

A pesar de los esfuerzos en investigación dedicados a la búsqueda de tratamientos efectivos para la cura de la ELA, los mecanismos patogénicos subyacentes a la enfermedad aún no se comprenden completamente y las opciones terapéuticas disponibles son limitadas y ninguna de ellas puede detener ni revertir la progresión de la enfermedad. Actualmente, los tratamientos disponibles, solo ofrecen un ligero aumento de la esperanza de vida o alivio sintomático. Por tanto, es necesario desarrollar nuevas terapias que no solo alivien los síntomas, sino que también modifiquen la progresión de la enfermedad.

Teniendo en cuenta esta necesidad, y considerando que el sistema endocannabinoide participa en la modulación de muchos de los eventos patológicos de la enfermedad, la hipótesis de la presente Tesis Doctoral es que la modulación (directa o indirecta) de ciertos elementos del SEC puede ser una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de la ELA.

El objetivo principal es, por tanto, profundizar en los mecanismos de acción y el potencial terapéutico de la modulación del sistema endocannabinoide en la esclerosis lateral amiotrófica. Para ello, se plantearon 3 objetivos específicos, que se presentan en esta Tesis Doctoral en 3 capítulos diferentes:

Objetivo #1: Evaluar el potencial neuroprotector de la ablación genética y de la inhibición farmacológica de la enzima de degradación de cannabinoides FAAH en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T}.

Objetivo #2: Estudiar el impacto de la activación de los receptores CB₂ periféricos, es decir, no localizados en el SNC, en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}.

Objetivo #3: Analizar los efectos de la ablación parcial de la proteína de unión a inmunoglobulinas BiP, un nuevo interactador del receptor CB₁, en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Todos los animales utilizados en este trabajo estuvieron alojados en el CAI Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, en habitaciones con periodos controlados de luz (8:00 a 20:00 horas) y temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con acceso a agua y comida de manera continua.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas europeas (directriz 2010/63/EU) y aprobadas por el comité ético de la universidad y la institución reguladora (ref. PROEX 056/19 y 201.8/22). Todos los experimentos fueron llevados a cabo en ratones macho para evitar la variabilidad asociada al sexo. Durante el desarrollo de la Tesis Doctoral se han empleado dos modelos murinos transgénicos de ELA: TDP43^{A315T} y SOD1^{G93A}; y dos modelos que contienen deleciones genéticas en elementos relacionados con el SEC.

1.1. Modelo murino TDP43^{A315T}

Los animales del modelo B6. Cg-Tg (PrP-TARDBP^{A315T})95Balo/J, también conocidos como TDP43^{A315T}, fueron comprados inicialmente a *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EE. UU, #010700) y a partir de ellos se generó una colonia en el animalario mediante el cruce de machos heterocigotos TDP43^{A315T} con hembras WT C57B6/J.

El modelo TDP43^{A315T} está generado mediante la construcción de un vector que contiene el gen TRBP para la proteína humana TARDBP con una sustitución de un residuo de alanina por treonina en la posición 315 de la cadena peptídica (A315T), bajo la regulación del promotor de la proteína priónica (PrP). El modelo transgénico resultante expresa la proteína TDP43 humana con la mencionada mutación en todo el organismo, pero en niveles mayores en cerebro y médula espinal, siguiendo el patrón de expresión del promotor de la PrP (Wegorzewska et al., 2009). Esta sobreexpresión alcanza hasta tres veces los niveles normales en neuronas y células gliales del cerebro y la médula espinal. La presencia de esta proteína mutada en estas células desencadena una neurodegeneración progresiva característica de la ELA, con alteraciones motoras, pérdida de motoneuronas superiores e inferiores, formación de agregados de proteínas ubiquitinadas en las neuronas motoras espinales y activación de astrocitos y microglía locales (Wegorzewska et al., 2009).

Su expresión en el plexo mientérico del colón produce una disminución en la motilidad intestinal y una reducción en la esperanza de vida asociada a problemas de obstrucción intestinal (Hatzipetros et al., 2014). Para evitar o disminuir estos efectos se alimenta a estos animales con una dieta especial en gel desde el destete (DietGel Boost, ClearH2O, Portland, ME, EE. UU.).

1.2. Modelo murino FAAH^{-/-}

Los animales 129SvJ-C57BL/6- FAAH^{-/-}, también conocidos como FAAH^{-/-}, fueron cedidos amablemente por el Dr. Julián Romero de la Universidad Francisco de Victoria y a partir de ellos generamos una colonia en el animalario mediante el cruce de machos FAAH^{-/-} con hembras FAAH^{-/-}. Los ratones FAAH KO tienen niveles cerebrales elevados de anandamida en comparación con los ratones de tipo salvaje. También muestran un comportamiento reducido de dolor y efectos conductuales similares a los del THC (Cravatt et al., 2001).

Por otro lado, para estudiar la implicación de la enzima de degradación de cannabinoides FAAH en la progresión de la enfermedad en este modelo animal de ELA, se generó un animal doble mutante, que presentaba por un lado la sobreexpresión de la proteína TDP43 humana mutada y, además, carecía de la enzima FAAH. La creación de este modelo incluyó cruces entre machos TDP43^{A315T} y hembras FAAH^{-/-}. Para este estudio se generaron 4 grupos de animales:

- ratones *wildtype* con expresión normal de la enzima FAAH (WT)
- ratones *wildtype* carentes de la enzima FAAH (FAAH^{-/-})
- ratones TDP43^{A315T} con expresión normal de la enzima FAAH (TDP43^{A315T})
- ratones TDP43^{A315T} carentes de la enzima FAAH (TDP43^{A315T}- FAAH^{-/-})

Se analizó el fenotipo patológico de estos animales mediante pruebas comportamentales e inmunohistoquímicas, así como su supervivencia.

1.3. Modelo murino SOD1^{G93A}

Por otro lado, en la presente Tesis Doctoral se han empleado ratones del modelo murino B6SJL-Tg (SOD1^{G93A})1Gur/J, comúnmente conocido como SOD1^{G93A}, adquiridos inicialmente a *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, EEUU, # 002726). La colonia se generó y se ha mantenido en el animalario mediante el cruce de hembras B6SJL F1/J con machos SOD1^{G93A}. Este modelo animal presenta una mutación en la posición 93 de la cadena peptídica, que consiste en la sustitución de una glicina por una alanina (G93A) en el gen *SOD1*, bajo la expresión de su promotor humano endógeno. Esta mutación resulta en una sobreexpresión de la enzima SOD1, provocando una pérdida significativa de neuronas en el asta ventral de la médula espinal (Gurney et al., 1994) acompañada de un evidente fenotipo de déficit motor y una disminución de la supervivencia. Este fenotipo se asemeja al que se observa en los pacientes con ELA, manifestando signos de debilidad muscular en las patas traseras a partir de las 12 semanas de edad y una parálisis total a las 16 semanas, correspondiente a la etapa final de la enfermedad previa al término de su vida.

1.4. Modelo murino BiP^{+/-}

Los ratones B6.129(Cg)-Hspa5tm1.1Alee/J también conocidos como BiP^{+/-} (Luo et al., 2006) fueron cedidos amablemente por el Dr. Manuel Guzmán de la Universidad Complutense de Madrid.

El gen Hspa5, también conocido como Grp78 y proteína de unión a inmunoglobulina, codifica una proteína chaperona molecular ubicada en el lumen del RE. Los ratones homocigotos experimentan una muerte embrionaria temprana y muestran defectos en la proliferación celular y apoptosis; mientras que los ratones heterocigotos, son viables y fértiles y presentan una disminución de un 40% de los niveles de proteína BiP. Para llevar a cabo nuestros estudios, se cruzaron machos SOD1^{G93A} con hembras BiP^{+/-} y se caracterizó el fenotipo de la generación F1. Se generaron 4 grupos experimentales:

- ratones *wildtype* con expresión normal de la proteína BiP (WT)
- ratones *wildtype* con delección de la proteína BiP en heterocigosis (BiP^{+/-})
- ratones SOD1^{G93A} con expresión normal de la proteína BiP (SOD1^{G93A})
- ratones SOD1^{G93A} con delección de la proteína BiP en heterocigosis (SOD1/BiP^{+/-})

Se analizó el fenotipo patológico de estos animales mediante pruebas comportamentales e inmunohistoquímicas, así como su supervivencia.

1.5. Genotipado

Se realizó una biopsia de oreja en todos los animales empleados para determinar, mediante un genotipado la presencia de los transgenes TDP43^{A315T}, SOD1^{G93A}, y de la delección genética de BiP y FAAH.

El ADN de las muestras obtenidas se extrajo y fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el kit comercial REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y empleando para ello oligonucleótidos específicos (Sigma-Aldrich) (**tabla 2**).

Las condiciones de los diferentes protocolos de PCR empleados para la amplificación de los genes se detallan en la **tabla 3**. Los productos de PCR obtenidos se resolvieron en geles de Agarosa al 2% en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Las bandas de ADN se marcaron utilizando Gel Red y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. El análisis de estos geles permite distinguir los genotipos posibles en función de las bandas obtenidas (**Figura 11**).

Colonia	Cebador	Secuencia
Colonia SOD1	<i>transgene forward</i>	CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA
	<i>transgene reverse</i>	CGC GAC TAA CAA TCA AAG TCA
	<i>control forward</i>	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TC
	<i>control reverse</i>	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC AT
Colonia TDP43	<i>transgene forward</i>	GGA TGA GCT GCG GGA GTT CT
	<i>transgene reverse</i>	TGC CCA TCA TAC CCC AAC TG
	<i>control forward</i>	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	<i>control reverse</i>	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT
Colonia BiP ^{-/-}	<i>mutant reverse</i>	TTT GTT AGG GGT CGT TCA CC
	<i>common</i>	CTG GCA CTA TTG CTG GAC TG
	<i>wildtype reverse</i>	TCA ATC CTT GCT TGA TGC TG
Colonia FAAH ^{-/-}	<i>common</i>	TAA CTA GGC AGT CTG ACT CTA G
	<i>wildtype reverse</i>	ACT CAA GGT CAG CCT GAA ACC

Tabla 2: Lista de cebadores empleados para el genotipado de las colonias de animales SOD1^{G943A}, TDP43^{A315T}, BiP^{-/-}, FAAH^{-/-}

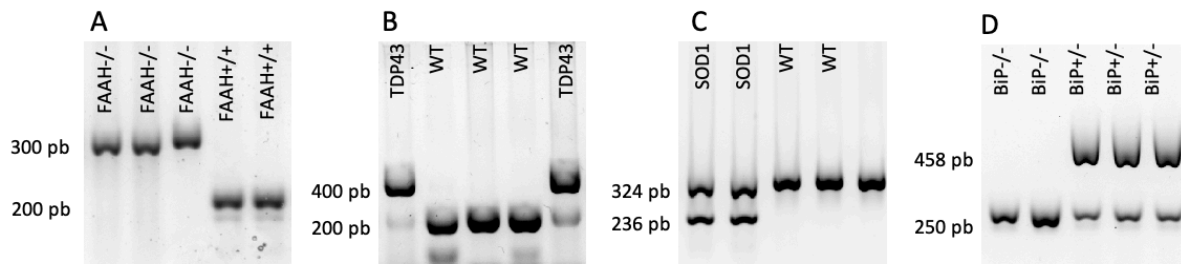


Figura 11: Resultados representativos de los genotipos obtenidos en el gel de agarosa. (A) Gel de genotipado para TDP43. La banda de 200pb corresponde al control interno y la banda a 400 pares de bases (pb) al transgén. (B) Gel de genotipado para FAAH. Los animales FAAH^{-/-} presentan una banda a 300 pb, mientras que los animales FAAH^{+/+} presentan una banda a 200pb. (C) Gel de genotipado para SOD1. La banda a 324pb corresponde al control interno y la banda a 236pb al transgén. (D) Gel de genotipado para BiP. Una banda de 250pb corresponde a un animal mutante BiP^{-/-} (no viables) y una de 458 a un animal BiP^{+/+} (*wildtype*). Los animales heterocigotos BiP^{+/-} presentan una banda a 458 pb y otra a 250 pb.

Parámetros PCR TDP43, BiP y SOD1			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	94	2 min	
2	94	20 s	-0,5°C/ciclo
3	65	15 s	
4	68	10 s	
5	Repetir pasos 2-4 x 10 ciclos		
6	94	15 s	
7	60	15 s	
8	72	10 s	
9	Repetir pasos 6-8 x 28 ciclos		
10	72	2 min	
11	10	∞	

Parámetros PCR FAAH		
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 min
2	94	1 min
3	53	1 min
4	72	1 min
5	Repetir pasos 2-4 x 35 ciclos	
6	72	10 min
7	4	∞

Tabla 3: Condiciones de los diferentes protocolos de PCR empleados para la amplificación de los genes TDP43, BiP, SOD1 y FAAH.

2. Pruebas comportamentales

Para evaluar el fenotipo de los animales utilizados a lo largo de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo una batería de ensayos conductuales, atendiendo a las principales características de cada uno de los modelos utilizados, que nos permitan examinar el estado neurológico de los animales: la prueba de rotarod, el reflejo de *clasping*, la escala clínica, el *hanging wire* y el test de la fuerza de agarre o *grip strength*. Estos ensayos nos permiten evaluar el impacto de la administración de fármacos y de las deleciones genéticas en la progresión de la enfermedad.

Además, en todos los experimentos se realizó una evaluación continua del estado de salud general de los animales mediante la observación de su apariencia física y el seguimiento de la progresión del peso. Se establecieron varios criterios de punto final para inducir la eutanasia y evitar el sufrimiento de los animales, que incluyeron: (i) pérdida de peso severa en comparación con su peso en el estadio PN60 (>25%); (ii) presencia de animales con pelaje erizado, ojos cerrados, letargo o inmovilidad; (iii) desarrollo de parálisis en ambas extremidades traseras; y (iv) incapacidad para caminar y falta de respuesta a la manipulación

2.1. Test de rotarod

La prueba del rotarod permite evaluar la debilidad muscular y la coordinación motora en los roedores. Para ello se utilizó un dispositivo LE8200 (Panlab, Barcelona, España) (**Figura 12**). Este aparato consiste en una estructura que sostiene un rodillo giratorio elevado y paralelo al suelo, el cual rota a una velocidad preestablecida. Este cilindro se divide en 5 carriles, lo que posibilita la evaluación simultánea de varios animales. Cada carril cuenta con una placa debajo que se activa con la caída del ratón, deteniendo un temporizador de manera automática. Esto permite el registro preciso de los tiempos de latencia de los animales en el rodillo. Durante toda la prueba, los animales se colocan sobre el cilindro con la cabeza orientada en sentido contrario a la rotación.

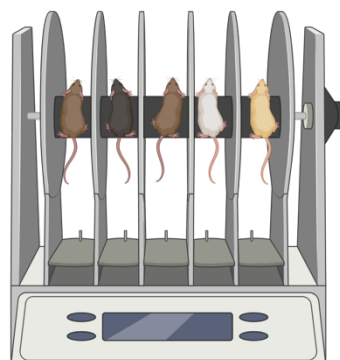


Figura 12: Aparato de rotarod. Imagen creada con BioRender.com

La prueba se realizó siguiendo el protocolo descrito por la *International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens (IMPRESS)*. Tras un periodo de habituación de 30 minutos a la sala de comportamiento, se inició la prueba comenzando con una fase de entrenamiento. Esta comprendió una primera sesión exploratoria, estática a 0 r.p.m., durante 1 minuto, seguida de tres sesiones de entrenamiento a velocidad constante a 4 r.p.m. de 1 minuto cada una, con pausas de 10 minutos entre ellas. Después de un descanso de 30 minutos, se llevaron a cabo tres medidas definitivas. En esta prueba, se evaluó el tiempo que los ratones permanecían en el rodillo con una aceleración de 4-40 r.p.m., con un máximo de 5 minutos para cada ocasión. Entre cada evaluación se realizaron intervalos de espera de 15 minutos. El valor final de permanencia en el rodillo se determinó mediante el cálculo de la media de las tres pruebas realizadas.

2.2. Reflejo de *clasp*

El reflejo de *clasp* de las patas traseras es un signo neurológico asociado con la distonía, uno de los síntomas presentes en los pacientes con ELA, que se caracteriza por movimientos y posturas involuntarias de torsión. Para evaluar el reflejo de *clasp*, se siguió el protocolo de Stephan J. Guyenet adaptado (Guyenet et al., 2010). En este procedimiento, se suspendieron los ratones boca abajo durante 10 segundos, sujetándolos por la cola, frente a una superficie lisa (**Figura 13**). La evaluación del reflejo de *clasp* se realizó mediante una escala según el grado de contracción de las patas hacia el abdomen. Se asignó un valor según los siguientes resultados: 0 cuando las patas permanecían extendidas horizontalmente, creando una forma de "T"; 1 cuando el ratón encogía una de las patas traseras hacia el abdomen; 2 cuando el ratón encogía ambas patas traseras hacia el abdomen; y 3 cuando el ratón encogía todo el tronco. La prueba se repitió tres veces con pausas de 10 minutos entre repeticiones, y el resultado final se determinó calculando la media de los tres ensayos realizados.



Figura 13: Test de *clasp*. Imagen creada con BioRender.com

2.3. Escala clínica

La escala clínica proporciona una evaluación integral del estado neurológico de los animales, abordando diversos aspectos de la patología. Se utilizó una escala previamente publicada (Rodríguez-Cueto et al., 2018) que varía de 0 a 15, donde una puntuación más alta indica un mayor grado de patología. La puntuación neurológica se obtuvo sumando los valores de tres subescalas (0-5) centradas cada una de ellas en la ambulación, el reflejo de *clasp* y la resistencia al arrastre de las patas traseras (**Tabla 4**). La evaluación de la ambulación se realizó colocando al ratón en un pasillo transparente (10 × 10 × 80 cm), que permite observar el control postural y la forma en que los miembros posteriores se inclinaban durante el movimiento. La prueba del reflejo de las patas posteriores se evaluó mediante el grado de capacidad del ratón para mantener las extremidades posteriores en la posición neutra normal, sin contraerlas, cuando estaba suspendido por la cola a 10 cm sobre la superficie. Por último, la resistencia de las patas traseras se midió según la capacidad del animal para arrastrarse y ofrecer resistencia cuando se tiraba suavemente de la cola en la dirección opuesta a su movimiento (**Figura 14**). Así, un puntaje neurológico de 0 indica animales asintomáticos, mientras que un puntaje de 15 corresponde a una pérdida funcional total del control postural y de las extremidades traseras.

	AMBULACIÓN	CLASPING	RESISTENCIA
0	Apoyan toda la planta de sus patas traseras al caminar	Extremidades posteriores posicionadas describiendo una T, patadas coordinadas	Las extremidades posteriores se mantienen por debajo del cuerpo o muy cerca de él. Responden al estímulo de tracción.
1	No apoyan toda la planta de sus patas traseras, caminan de puntillas	Pérdida progresiva de la posición T, patas descoordinadas	Los animales tienden a dividir sus extremidades posteriores del cuerpo y pierden progresivamente su respuesta de resistencia
2	Las extremidades posteriores no responden correctamente al caminar, se deslizan	Animales estiran las patas traseras hacia atrás (posición de caudal), patadas descoordinadas	Los miembros posteriores se separan del cuerpo (una pata)
3	Pérdida de la coordinación al caminar. Los animales andan lateralmente	Cuando se relajan las extremidades posteriores permanecen muy próximas entre sí y con tendencia a la parte anterior del cuerpo	Miembros posteriores se separaron marcadamente lejos del cuerpo (ambas patas)
4	Pérdida total del control motor de las extremidades posteriores	Los animales tienden a captar sus miembros posteriores juntos y tratar de subir a su cola pivotante frontalmente desde el eje principal del cuerpo	Los animales tienen muy poca fuerza en sus extremidades posteriores
5	Parálisis	Parálisis de las patas traseras	Ausencia total de la fuerza extremidades traseras

Tabla 4. Valores individuales para los parámetros evaluados en la escala clínica de los animales (Rodríguez-Cueto et al., 2018)

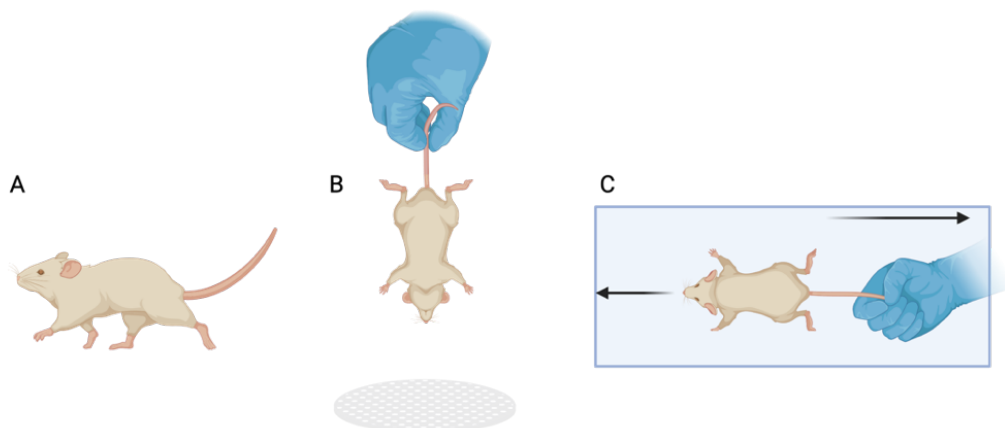


Figura 14: Imagen representativa de los parámetros analizados en la escala clínica: (A) ambulación, (B) clasping, (C) resistencia. Imagen creada con BioRender.com

2.4. *Hanging wire*

Esta prueba se utiliza para evaluar posibles déficits en la fuerza de las patas de los ratones. Se empleó una rejilla recubierta con cinta adhesiva en los bordes para evitar que el ratón trepe hacia el otro lado de la rejilla. El animal se colocó en la rejilla y se agitó suavemente para garantizar el agarre del ratón. Luego, la rejilla se invirtió, dejando al ratón boca arriba, suspendiéndolo a unos 30 cm del suelo para evaluar su latencia en esa posición durante un máximo de 60 segundos (Silva-Fernandes et al., 2014; Rodríguez-Cueto et al., 2018) (**Figura 15**). La prueba se repitió tres veces con pausas de 10 minutos entre pruebas, y tiempo de permanencia final en la rejilla se determinó calculando la media de los tres ensayos realizados.

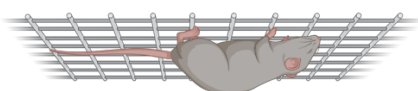


Figura 15: Test de *hanging wire*. Imagen creada con BioRender.com

2.5. Test de la fuerza de agarre.

Esta prueba ha sido comúnmente empleada para evaluar la fuerza muscular de las patas delanteras y traseras, centrándose en la medición de su pico de fuerza máxima, en modelos murinos de ELA (Ricketts et al., 2014; Joyce et al., 2015; Ali et al., 2023). El aparato consta de una rejilla metálica conectada a un transductor de fuerza vinculado a una computadora, que registra la fuerza máxima ejercida por los ratones al ser tirados de la cola en cada prueba. Durante el procedimiento, las cuatro patas del animal se posicionaron en la rejilla, y se tiró suavemente de la cola hacia atrás,

aplicando una fuerza a una velocidad e intensidad constantes, siguiendo las instrucciones del fabricante y estudios previos en modelos murinos de ELA (Ali et al., 2023) (**Figura 16**). El transductor registra la fuerza máxima justo antes de que el ratón se suelte. La medida final de la fuerza máxima se obtuvo calculando el promedio de tres medidas, tomadas con al menos 15 minutos de intervalo entre cada una de ellas. Además, se realizó una corrección basada en el peso del animal para asegurar una evaluación correcta de la fuerza muscular ya que el peso del animal puede influir en la fuerza que ejerce sobre la rejilla durante la prueba de agarre.

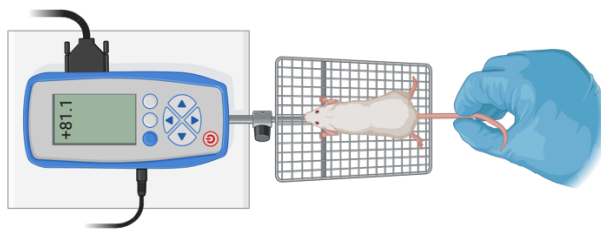


Figura 16: Test de la fuerza de agarre. Imagen creada con BioRender.com

3. Análisis de supervivencia

En la caracterización de los modelos $TDP43^{A315T}$ -FAAH^{-/-} y $SOD1/BiP^{+/-}$, se evaluó la supervivencia de estos ratones mediante una curva de Kaplan-Meier (Kaplan & Meier, 1958). Se establecieron varios criterios de punto final para la eutanasia, que incluyeron: (i) pérdida de peso severa en comparación con su peso en el estadio PN60 (>25%); (ii) presencia de animales con pelaje erizado, ojos cerrados, letargo o inmovilidad; (iii) desarrollo de parálisis en ambas extremidades traseras; y (iv) incapacidad para caminar y falta de respuesta a la manipulación. Los animales control para $TDP43^{A315T}$ -FAAH^{-/-} (WT, FAAH^{-/-}) fueron sacrificados a los 250 días, mientras que los controles del modelo $SOD1/BiP^{+/-}$ (WT, BiP^{-/-}) lo fueron a los 200 días, como criterio de punto final.

4. Tratamientos farmacológicos

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo dos experimentos farmacológicos. Por un lado, en el modelo de $SOD1^{G93A}$, para analizar el efecto de la activación de receptores CB₂ periféricos; y, por otro lado, en el modelo de $TDP43^{A315T}$, para evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de la enzima FAAH. Con el objetivo de evaluar el efecto de la activación de receptores CB₂ a nivel periférico se administraron en el modelo $SOD1^{G93A}$ dos agonistas del receptor CB₂ desarrollados por Roche Pharma: Ro-6871304, un ligando incapaz de atravesar la BHE y que, por tanto, se une exclusivamente a receptores periféricos; y Ro-6866945, que atraviesa la BHE y puede actuar tanto a nivel central como periférico. La administración de los compuestos testados se llevó a cabo desde un estadio presintomático (PN60), hasta etapas sintomáticas

(PN120), diariamente, siguiendo un diseño experimental similar al utilizado con este modelo en estudios previos de nuestro grupo (Rodríguez-Cueto et al., 2018) (**Figura 17**). Estos compuestos son muy específicos para los receptores CB₂ y presentan escasa afinidad hacia los receptores CB₁. La **tabla 5** contiene las constantes de afinidad de los ligandos que pueden unirse a los receptores CB₁ y CB₂, así como sus valores de EC₅₀, los cuales indican la potencia de estos fármacos sobre los receptores CB₁ y CB₂.

Por otro lado, en el modelo TDP43^{A315T} se investigó el impacto de la inhibición de la enzima FAAH. Para ello, se administró un inhibidor selectivo irreversible de esta enzima, el compuesto URB597. Los animales se trataron desde un estadio presintomático (PN65) hasta una etapa sintomática (PN95), de acuerdo con diseños experimentales previos (Espejo-Porras et al., 2019) (**Figura 17**).

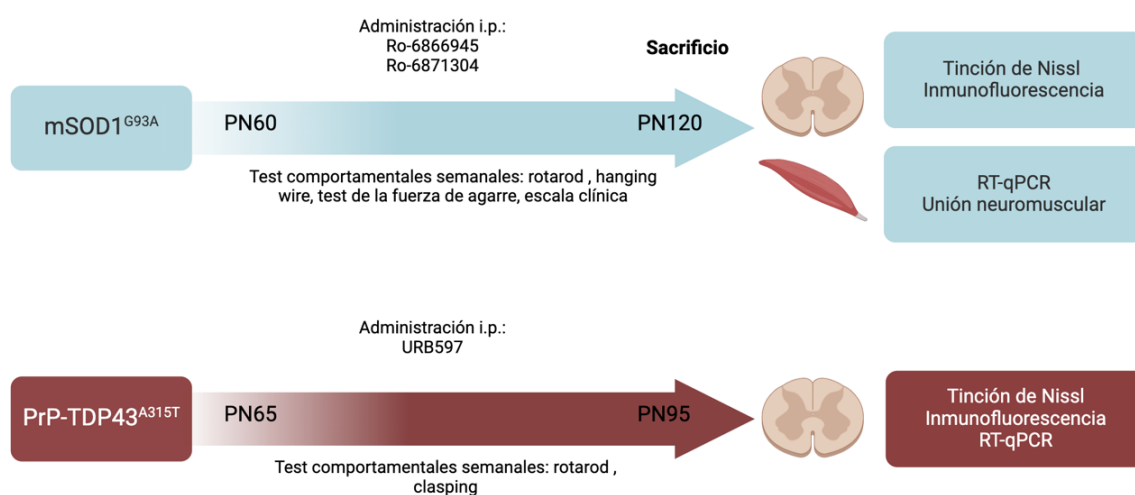


Figura 17: Diseño experimental de los tratamientos farmacológicos seguidos en los modelos animales SOD1^{G93A} y TDP43^{A315T}

Ambos experimentos incluyeron grupos *wildtype* control tratados con vehículo. Todos los compuestos se disolvieron en etanol o DMSO y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Para la administración se añadieron los surfactantes Tween20 o *Cremophor* y se mezcló para permitir la formación de micelas. Tras esto se evaporó el etanol en caso de haber sido empleado y se añadió solución salina 0,9%. Los detalles relativos a la preparación, dosis y vía de administración de los compuestos empleados se encuentran recogidos en la **tabla 6**.

Compuesto	Ki receptor CB ₁ (nM)	Ki receptor CB ₂ (nM)	EC ₅₀ receptor CB ₁ (nM)	EC ₅₀ receptor CB ₂ (nM)	Referencia
Ro-686945	>10000	7	-	0,2	Proporcionado por F. Hoffmann-La Roche Ltd.
Ro-6871304	>10000	19	-	0,5	Proporcionado por F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Tabla 5: Afinidad y potencia de los ligandos cannabinoides

Compuesto	Mecanismo	Dosis (mg/kg)	Vía de administración	Vehículo	Casa comercial
Ro-6866945	Agonista selectivo CB ₂	30	i.p.(diario)	Etanol, 5,26% Tween 20, salino 0,9%	Roche, Basilea, Suiza
Ro-6871304	Agonista selectivo CB ₂	10	i.p.(diario)	Etanol, 5,26% Tween 20, salino 0,9%	Roche, Basilea, Suiza
URB597	Inhibidor irreversible selectivo de la enzima FAAH	0,2	i.p. (diario)	3,33% DMSO, 6% Cremophor, Salino 0,9%	Tocris, Bristol, RU

Tabla 6: Compuestos administrados junto con sus dosis, vehículos y vías de administración

5. Preparación de las muestras

Una vez concluido cada uno de los experimentos, los animales se sacrificaron por decapitación rápida y se extrajeron la médula espinal y dos músculos: el glúteo y el tibial anterior. Las muestras se procesaron de distinta manera según se fueran a utilizar para técnicas histológicas o técnicas de Biología Molecular.

Por un lado, la médula espinal se diseccionó en diferentes regiones. La zona L3-L6, destinada a histología (tinción de Nissl y análisis inmunohistoquímico) se fijó durante 24 horas a 4 °C en paraformaldehído (PFA) al 4% preparado en solución salina tamponada con fosfato (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) 0.1 M, pH 7.4. Posteriormente, se crioprotegió sumergiéndola en una solución al 30% de sacarosa en PBS 0.1 M, pH 7.4 durante 24 horas y se almacenó finalmente a -80 °C. Por otro lado, la región lumbar entre la L1 y L2 y el músculo glúteo fueron destinados a técnicas bioquímicas (qPCR y western blot). En ese caso, las muestras fueron congeladas rápidamente tras la disección, sumergiéndolas en 2-metilbutano frío y almacenándolas a -80 °C. Por otro lado, el músculo tibial anterior se fijó durante 24 horas a 4 °C en PFA al 4% en PBS y posteriormente se conservó en PBS a 4°C hasta su utilización.

6. Técnicas histológicas

Las médulas espinales se embebieron en Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek, CA, EE. UU.) y se cortaron en un criostato LEICA CM1950 (Leica, Metilar, Alemania), para obtener secciones de 20 μm , que se recogieron en portas previamente gelatinizados y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Por otro lado, las muestras del músculo tibial anterior, previamente almacenadas en PBS, fueron diseccionadas en sus haces musculares, manteniendo las fibras musculares unidas a través del tendón en todo momento. Posteriormente, se volvieron a almacenar en PBS a 4°C hasta su utilización en estudios de inmunofluorescencia.

6.1. Tinción de Nissl

La tinción de Nissl es una técnica histológica que marca los cuerpos de Nissl presentes en las motoneuronas, permitiendo su posterior conteo. Para ello, las secciones de tejido se tiñeron con violeta de cresilo al 0,5% (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en agua destilada acidificada con ácido acético al 0,3% (Sigma-Aldrich, Madrid, España), previamente calentado a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Tras 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, se eliminó el violeta de cresilo con agua destilada y se secaron las muestras a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. Luego, los cortes fueron sometidos a lavados sucesivos para su deshidratación con etanol (al 96% durante 1 minuto y etanol 100% durante 1 minuto) seguido de xilol durante 5 minutos. Posteriormente, las secciones se montaron en medio no acuoso (Depex) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

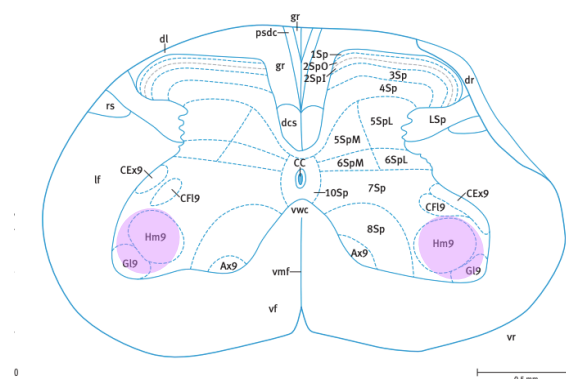


Figura 18: Esquema de una sección de médula espinal transversal en la región L4. Imagen adaptada del *Allen Brain Atlas*. La región analizada aparece sombreada en morado.

Para llevar a cabo el conteo de las motoneuronas en la tinción de Nissl, se visualizó el asta ventral de la médula espinal mediante un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania)

acoplado a una cámara DFC300Fx (Leica) utilizando un objetivo 10X (**Figura 18**). Las motoneuronas α se cuantificaron mediante el conteo de las células teñidas que presentaban un área grande del soma celular y un núcleo visible. Se analizaron al menos 6 imágenes por animal en estudios ciegos para establecer la media de todos los animales estudiados en cada grupo.

6.2. Inmunofluorescencia

Sobre las secciones de médula espinal se realizaron estudios de marcaje con anticuerpos específicos para la detección y cuantificación de diferentes proteínas.

Tras dejar atemperar los cortes, los tejidos se permeabilizaron durante 1 hora con una solución de tampón salino Tris (TBS) con Triton X-1000 0,1%. Posteriormente, se incubaron durante 24 horas con el anticuerpo primario diluido en TBS con Triton X-100 al 0,01%, pH 7.5 (ver detalles en la **Tabla 7**). Tras ello, se realizaron sucesivos lavados con TBS seguidos de una incubación durante 2 h a 37°C con el anticuerpo secundario (**Tabla 7**). Tras lavar el anticuerpo secundario, se deshidrataron, se montaron en medio acuoso (Dako, CA, EE. UU.) y se almacenaron a 4°C y en oscuridad hasta su observación al microscopio.

Sobre los haces musculares se realizó una inmunofluorescencia en flotación, pues debido al gran tamaño del tejido, facilita el acceso de los anticuerpos. Los haces se dispusieron en una placa de 96 pocillos y los tejidos se permeabilizaron en PBS, Triton (TX) X-100 2%. Posteriormente, se bloqueó el tejido en PBS con albúmina de suero bovino (BSA, del inglés bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) 5%, Triton X-100 1% y suero normal de cabra (NGS) (Milford, MA, EE. UU.) 10%, durante 1 hora. Con el objetivo de disminuir el marcaje de fondo debido a la presencia de inmunoglobulinas de ratón, las muestras se incubaron durante 24 horas con MouseOnMouse (Vector, CA, EE. UU.) en PBS. Tras ello, las muestras se incubaron 24 horas con agitación suave con los anticuerpos primarios para el marcaje de la presinapsis que incluye el marcaje de los neurofilamentos y de las vesículas sinápticas (mediante el marcaje de la sinaptofisina) diluidos en PBS con 5% BSA, y TX-100 al 1% (**Tabla 7**). Tras el lavado de los anticuerpos primarios con PBS, se añadieron los anticuerpos secundarios en PBS junto con el ligando del receptor de acetil colina alfa-bungarotoxina (BTX) a una concentración de 1,2 μ g/ml (BTX- Alexa fluor™ 488, B13422, ThermoFisher Scientific, MA, EE. UU.). Estas muestras se lavaron con PBS y finalmente con agua y se montaron sobre un porta utilizando medio acuoso (Dako, CA, EE. UU.) y se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta su posterior observación al microscopio.

Anticuerpo primario	Origen	Dilución	Referencia	Casa comercial
Anti-Iba1	Conejo	1:500	019-19741	Wako Chemicals, VA, EEUU
Anti-GFAP	Conejo	1:200	Z0334	Dako, CA, EE. UU.
Anti-ChAT	Cabra	1:100	Ab144P	Millipore, MA, EE. UU.
Anti-CD68	Rata	1:200	MCA1957	AbD Serotec, Oxford, RU
Anti-neurofilament 200	Conejo	1:100	N4142	Millipore, MA, EE. UU.
Anti- Synaptophysin	Ratón	1:250	MAB5258-I	Millipore, MA, EE. UU.
Anticuerpo Secundario	Origen	Dilución	Referencia	Casa comercial
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	Burro	1:200	A21206	Invitrogen, MA, EE. UU.
Alexa Fluor 488 anti-rat	Burro	1:200	A21208	Invitrogen, MA, EE. UU.
Alexa Fluor 488 anti-goat	Pollo	1:200	A21467	Invitrogen, MA, EE. UU.
Alexa Fluor 594 anti-rabbit	Burro	1:200	A21207	Invitrogen, MA, EE. UU.
Alexa Fluor 594 anti-mouse	Burro	1:200	A11005	Invitrogen, MA, EE. UU.

Tabla 7: Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de inmunofluorescencia en médula espinal y tibial anterior.

6.2.1. Análisis de poblaciones celulares en la médula espinal

La inmunofluorescencia realizada en los cortes de médula espinal se visualizó y fotografió empleando un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara DFC300Fx (Leica), o un microscopio Imager.M2 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se capturaron imágenes de alta resolución con una cámara Axiocam 705 mono (Zeiss, Alemania). Las imágenes tomadas para analizar la densidad de la inmunorreactividad de cada marcador se tomaron a 10X y 20X, respectivamente (según el microscopio) y se analizaron con el software ImageJ (US National Institutes of Health, MA, EE. UU.). La densidad media de la inmunotinción se midió en el asta ventral de la médula espinal en un área fija, utilizando al menos 6 secciones por animal.

Para el análisis morfológico de las células gliales se empleó un microscopio Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara DFC300Fx (Leica). Se capturaron imágenes a 20X del asta ventral de la médula espinal y se analizaron utilizando el software *ImageJ* (Institutos Nacionales de Salud de EE. UU., MA, EE. UU.) para evaluar el área del cuerpo celular y la longitud de los procesos celulares. Para evaluación del grado de activación glial de las células positivas para GFAP o Iba1, se adoptó un criterio morfológico, distinguiendo entre células en estado de reposo o activadas. Este criterio se basó en la relación calculada entre el área del cuerpo celular y la longitud del proceso celular, conforme a estudios previamente publicados (Ceprián et al., 2017).

6.2.2. Análisis de las uniones neuromusculares en el tibial anterior

Las inmunofluorescencias realizadas en haces de músculo se visualizaron y fotografiaron con un microscopio Imager.M2 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y se capturaron imágenes de alta

resolución con una cámara Axioncam 705 mono (Zeiss, Alemania). Las imágenes fueron visualizadas con un objetivo 60X y se clasificaron en: enervadas (cuando el receptor acetilcolinérgico aparece íntegro y se aprecia tinción del neurofilamento y las vesículas sinápticas), parcialmente enervadas (cuando el receptor se encuentra fragmentado y ligeramente difuso y aparece marcaje del neurofilamento o las vesículas sinápticas) o denervadas (cuando el receptor aparece muy difuso y sin marcaje del neurofilamento o las vesículas sinápticas) (**Figura 19**). Se analizaron al menos 50 uniones neuromusculares por animal.

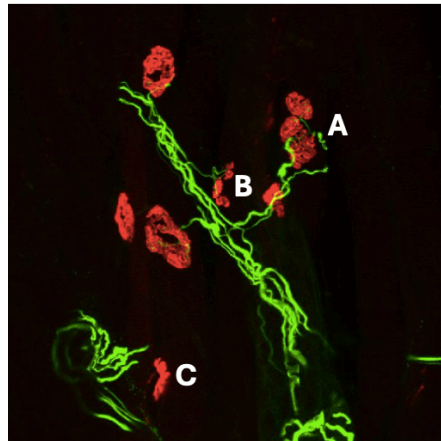


Figura 19: Inmunotinción de la unión neuromuscular donde se observan fibras enervadas (A), parcialmente enervadas (B) y denervadas (C).

7. Técnicas de biología molecular

7.1. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR

La expresión de genes específicos se evaluó mediante PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés *quantitative PCR*) en tiempo real. El tejido (médula espinal o glúteo) se disgregó mecánicamente en Tri Reagent® (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para la extracción del ARN total. La cantidad total de ARN extraído se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm en un lector de placas (Synergy HTX multi-mode reader, Biotek, Winooski, EE. UU.), y la pureza se determinó calculando la relación entre los valores de absorbancia a 260 y 280 nm. Durante la reacción de retrotranscripción de ARN a ADN complementario (ADNc), y para prevenir la contaminación con ADN genómico, se eliminó este ADN con Wipeout Buffer (Qiagen, Madrid, España), y se sintetizó ADNc de hebra simple a partir de 0.8-1 µg de ARN total utilizando el kit comercial Rneasy Mini Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Madrid, España). El ADNc obtenido se almacenó congelado a -80°C hasta la amplificación enzimática.

Para los ensayos de qPCR en tiempo real, se utilizó el kit FastStart TaqMan Probe Master Mix (Roche, Madrid, España) junto con sondas TaqMan de Applied Biosystems (Madrid, España) para cuantificar los niveles de ARNm de los diversos genes de interés (**Tabla 8**). El gen de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se empleó como control endógeno para la normalización del control de carga. Se incluyeron muestras sin la enzima retrotranscriptasa como control de retrotranscripción y muestras sin ADN como control de contaminación de la PCR. Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el termociclador 7300 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), y el ciclo umbral (Ct) se calculó mediante el software del instrumento (7300 Fast System, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Los niveles de expresión se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para su presentación, los datos se transformaron al porcentaje sobre la media obtenida en el grupo *wildtype* para cada gen.

Gen	Proteína	Referencia Applied Biosintesis
CNR1	CB ₁ R	Mm00432621_s1
CNR2	CB ₂ R	Mm00438286_m1
FAAH	FAAH	Mm00515684_m1
CALM1	Calm1	Mm00486655_m1
GSR	Gsr	Mm00833903_m1
MEF2C	Mef2c	Mm00600423_m1
SNX1	Snx10	Mm00511049_m1
COL19A1	Col19a1	Mm00511049_m1
TREM2	TREM2	Mm00451744_m1
CX3CR1	CX3CR1	Mm00438354_m1
CLEC7A	Dectina-1	Mm0183349_m1
APOE	Apo-E	Mm01307192_m1
P2RY12	P2Y12	Mm00446026_m1
TMEM119	TMEM119	Mm00525305_m1
GAPDH	GAPDH	Mm99999915_g1

Tabla 8: Sondas Taqman usadas en los ensayos de qPCRs en tiempo real.

8. Western blot

Los niveles de expresión proteica del receptor CB₁ en las muestras de médula espinal se analizaron mediante western blot. Las muestras de médula espinal congeladas (L1-L2) se homogeneizaron en un tampón de lisis en frío, conocido como tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), que contenía Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicólico sódico al 0.5%, dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.1%, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM como inhibidor de proteasas e inhibidor de fosfatasas (Halt™ Phosphatase Cocktail 100X, ThermoFisher Scientific, MA, EE. UU.).

Los homogeneizados obtenidos se centrifugaron a 10,000xg durante 15 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante que contenía las proteínas. La concentración de proteínas se cuantificó mediante el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad DC (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.), utilizando BSA para realizar la curva de calibrado. Posteriormente, se calentaron 15 µg de proteína a 95 °C

durante 10 minutos en un tampón Laemmli (10% de glicerol, 5% de SDS, 5% de β -mercaptoetanol, 0.01% de azul de bromofenol y 125 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Estas proteínas se cargaron en un gel de acrilamida al 12% (TGX Stain-free Gel FastCast; Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) que se sometió a una electroforesis a una intensidad constante de 25 mA por gel. Las proteínas se transfirieron a membranas de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, MA, EE. UU.) utilizando una cubeta de transferencia electroforética mini Trans-Blot (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) mediante el modo de transferencia de pesos moleculares mixtos (1,3A, hasta 25V, durante 7 minutos). Luego, se tomó una foto de la membrana que contiene la proteína total y las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con solución salina con TBS que contenía BSA al 5% y Tween-20 al 0.1%, y se incubaron durante la noche a 4 °C con agitación suave con el anticuerpo policlonal anti-CB₁ (CB1-Rb-Af380, Frontier Institute, Hokkaido, Japón) utilizado a una dilución de 1/10000.

Finalmente, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario completo de peroxidasa de rábano picante ECL (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, RU) a una dilución de 1/10000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas reactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia con el reactivo *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, RU). Las imágenes se analizaron con el software *Image Lab* (Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.). Los datos se calcularon como la relación entre las densidades ópticas de la banda de proteína específica y la proteína total medida en las membranas, y luego se normalizaron como porcentajes sobre los valores obtenidos para el grupo de los ratones *wildtype*.

9. Estudios HPLC-MS

Los agonistas del CB₂R, Ro-6866945 y Ro-6871304, utilizados en los tratamientos farmacológicos para evaluar el efecto de la activación periférica de los receptores CB₂, fueron sometidos a estudios farmacocinéticos para ver su presencia en el sistema nervioso y en la periferia en el modelo SOD1^{G93A}.

Para llevar a cabo estos estudios, se administró una única dosis intraperitoneal de los compuestos en el modelo SOD1^{G93A}, siguiendo las dosis y vehículos especificados en la **tabla 6**. Los animales fueron sacrificados a intervalos de 30, 180 y 360 minutos tras la administración del fármaco para la obtención de muestras de cerebro, médula espinal y plasma. La presencia de estos compuestos en las muestras se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS, del inglés *High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) utilizando un espectrómetro de masas triple cuadrupolo AB Sciex Qtrap 6500 (AB Sciex, MA, EE. UU.) junto con un sistema de cromatografía líquida Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japón). La cuantificación de los compuestos en las muestras se llevó a cabo utilizando muestras de

calibración estándar. Los resultados de concentración de los compuestos se expresan en ng/g para las muestras de cerebro y médula espinal en ng/mL para las muestras de plasma.

10. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el software *GraphPad Prism*® (versión 9.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Se comprobó que los datos tenían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se evaluaron mediante ANOVA de una vía o dos vías, según corresponda, seguido del test de Tukey o Bonferroni. Los datos de supervivencia se evaluaron mediante la prueba de Log-Rank. Se consideró un valor de p menor a 0.05 como el límite para la significancia estadística. El tamaño de cada muestra, el test estadístico empleado y los valores p se especifican en cada figura.



RESULTADOS

1. Capítulo 1: Estudio de la enzima FAAH en la fisiopatología del modelo murino de ELA TDP43^{A315T}

Varios estudios han destacado el potencial terapéutico del SEC en la patogénesis de la ELA por su capacidad para disminuir la neuroinflamación, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo (Urbi et al., 2019; Lacroix et al., 2023), sugiriendo algunos de ellos, que los cambios en los niveles de endocannabinoides observados en los tejidos afectados en la enfermedad desempeñan un papel protector en la enfermedad. Concretamente, en el modelo murino de SOD1^{G93A}, se observó un aumento en los niveles de expresión de los endocannabinoides 2-AG y anandamida en la médula espinal tras la aparición de los síntomas (90 días) (Witting et al., 2004; Bilsland et al., 2006), interpretado como una respuesta protectora destinada a contrarrestar la progresión de la enfermedad. Apoyando esta hipótesis, la manipulación genética para eliminar la enzima FAAH en ratones transgénicos SOD1^{G93A} condujo a un incremento en la fuerza muscular, la supervivencia de las motoneuronas y el número de uniones neuromusculares en comparación con los animales transgénicos SOD1^{G93A} con expresión normal de la enzima FAAH (Bilsland et al., 2006). Este hallazgo demostró la importancia de aumentar el tono endocannabinoide como una estrategia neuroprotectora en este modelo, así como el potencial de la enzima FAAH como diana farmacológica en esta patología.

Para validar el potencial terapéutico de esta diana en la ELA, y considerando la heterogeneidad de esta enfermedad, quisimos investigar el impacto de la inhibición de la enzima FAAH en modelos de ELA relacionados con la proteína TDP43. En particular, empleamos el modelo murino transgénico TDP43^{A315T}, cuyos machos presentan una disminución en los niveles de expresión de la enzima FAAH en estadios presintomáticos (PN 70-80), acompañada de una elevación de los niveles de anandamida y 2-AG. Sin embargo, este efecto desaparece en etapas más avanzadas de la enfermedad (PN 100-110) (Espejo-Porras et al., 2015). Este hallazgo sugiere que la reducción en los niveles de la enzima FAAH podría representar una respuesta neuroprotectora en las etapas iniciales de la enfermedad, reflejado en el incremento de los niveles de los endocannabinoides. No obstante, con la progresión de la enfermedad, los mecanismos de compensación podrían volverse menos efectivos o estar sobrepasados por los procesos patológicos.

Por tanto, para mejorar la comprensión del papel de la enzima FAAH en la ELA, es importante contar con evidencias en más de un modelo de la enfermedad. Aunque el modelo SOD1^{G93A} es y sigue siendo muy útil para los estudios preclínicos, es cada vez más necesario que se realicen estudios y análisis en más de un modelo con orígenes etiopatogénicos diferentes. Es por ello por lo que uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido investigar el impacto de la inhibición de la enzima FAAH en el modelo TDP43^{A315T}, tanto en la aparición como en la progresión

de la enfermedad. Para ello, empleamos dos enfoques distintos: la ablación genética y la inhibición farmacológica.

1.1. Ablación genética

En primer lugar, para estudiar el papel de la enzima FAAH cruzamos ratones con ablación genética total del gen *FAAH* (*FAAH*^{-/-}) con ratones transgénicos TDP43^{A315T}, para generar ratones dobles mutantes (TDP43^{A315T}-*FAAH*^{-/-}). Con el fin de evaluar el impacto de la pérdida de esta enzima, estos ratones fueron sometidos a una evaluación exhaustiva del fenotipo patológico que incluye un estudio de supervivencia, evaluación del peso y de la actividad motora. Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio histológico donde se analizó el impacto en la conservación de la población neuronal y en la actividad glial mediante estudios inmunohistoquímicos.

1.1.1. Análisis de la supervivencia

Debido a la rápida progresión de la ELA en los pacientes, que resulta en una corta esperanza de vida, la evaluación de la supervivencia en modelos animales de ELA es importante para estudiar el impacto de las alteraciones así como de los tratamientos en la progresión de la enfermedad y la eficacia potencial de nuevas terapias.

Por ello, generamos una primera cohorte de animales sobre los que evaluamos el efecto de la delección de la enzima FAAH en la supervivencia de los ratones TDP43^{A315T}. La ausencia de la enzima FAAH produjo una mayor supervivencia en estos animales en comparación con los animales con expresión normal de la enzima. Los animales TDP43^{A315T} con expresión normal de FAAH murieron entre los días 105 (semana 15) y 147 (semana 21) y presentaron una supervivencia media de 136 días, lo cual es consistente con la supervivencia media de 147 ± 27 días observada previamente en estudios similares con machos. En contraste, en los animales TDP43^{A315T}-*FAAH*^{-/-}, la esperanza de vida se prolongó, situándose entre los 105 días (15 semanas) y los 190 días (27 semanas) y mostraron una supervivencia media de 161 días. Esto indica que la ausencia de FAAH produce un aumento en la supervivencia de nuestro modelo de ELA (**Figura 20**).

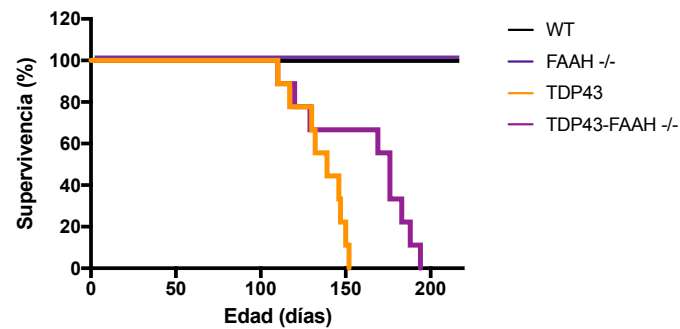


Figura 20: Análisis de la supervivencia de los animales TDP43^{A315T} y *wildtype* con presencia normal o ablación de la enzima FAAH. Los datos de la supervivencia de los animales se representaron como una gráfica de Kaplan-Meier y se evaluaron mediante la prueba de Chi-cuadrado ($\chi^2 = 5,595$, $p < 0,05$).

1.1.2. Análisis del fenotipo patológico

Para evaluar la aparición de los síntomas y la progresión de la enfermedad, se realizó, en una nueva cohorte de animales, un seguimiento de su peso corporal ya que, en pacientes con ELA se ha observado que la pérdida de peso está relacionada con una peor progresión de la enfermedad (Li et al., 2022) y una menor supervivencia (Wei et al., 2021). Además, en estos animales se llevaron a cabo pruebas conductuales, incluido el test de rotarod para evaluar la actividad y coordinación motora, y el test de *clasping*, que permite determinar el grado de distonía en los animales.

En relación con el peso, como era esperable se observó una pérdida de peso significativamente mayor en los animales del grupo experimental TDP43^{A315T} en comparación con los animales control a partir de las 15 semanas de edad. Esta pérdida persistió durante todo el experimento, aunque se fueron perdiendo animales gradualmente, hasta que todos los animales del grupo experimental murieron a las 21 semanas. Este resultado se corresponde con lo observado en la gráfica de supervivencia obtenida de la primera cohorte, donde todos los animales morían a las 21 semanas. La ausencia de la enzima FAAH en los animales transgénicos TDP43^{A315T}, sin embargo, condujo a una ganancia de peso similar a la observada en los animales *wildtype* y los ratones carentes de la enzima FAAH (Figura 21)

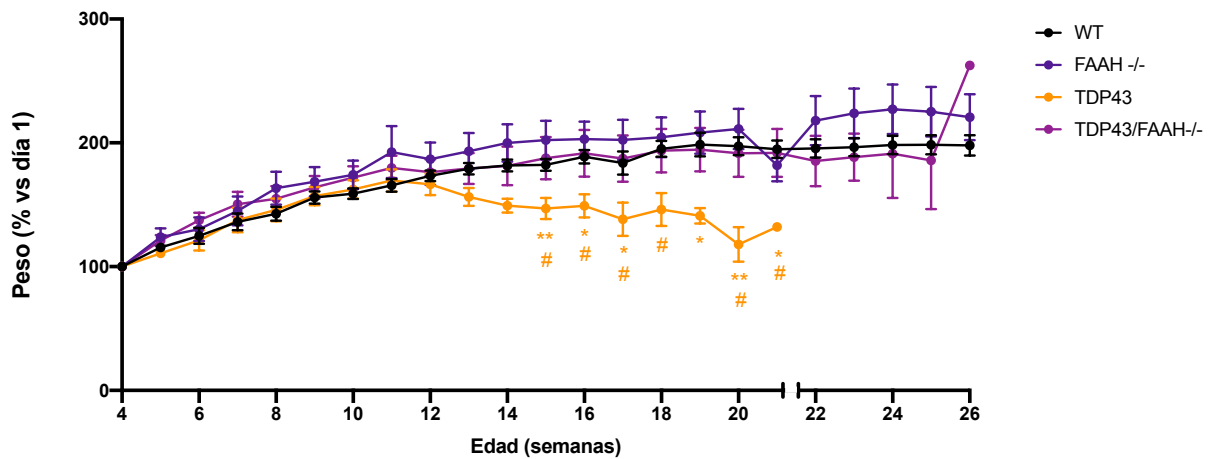


Figura 21: Evolución del peso en el modelo TDP43^{A315T}. Representación gráfica de la ganancia de peso en el periodo de 4 a 21 semanas de edad en ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y de 4 a 26 semanas para ratones macho transgénicos TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}, *wildtype* y FAAH^{-/-}. Los valores representan la media \pm SEM de 8-9 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vías, seguido por la prueba post-hoc de Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. ratones WT; # $p < 0.05$ vs. ratones FAAH^{-/-}). A partir de la semana 21 los análisis compararon únicamente los grupos experimentales WT, FAAH^{-/-} y TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}).

Por otro lado, en el test de rotarod, se observó que los animales transgénicos TDP43^{A315T} mostraron una disminución en la coordinación motora a partir de la semana 16, en comparación con los controles *wildtype*. A pesar de la mejora en el peso observada, los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} comenzaron a manifestar síntomas motores ya a las 12 semanas. Sin embargo, si se observa la fluctuación de la actividad motora en el tiempo de análisis realizado al completo, podemos observar cómo los animales transgénicos TDP43^{A315T} presentaron un marcado declive en los tiempos de latencia desde la aparición de los síntomas en la semana 16, que persistió hasta la semana 21. Por otro lado, en el caso de los dobles mutantes, a pesar de que la sintomatología comenzó antes, se mantuvo estable durante más tiempo, ralentizando, por tanto, la progresión de la enfermedad. Las alteraciones más graves no se observaron en los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} hasta la semana 21 y se extendieron hasta la semana 26 (**Figura 22A**). Por tanto, la delección de FAAH adelantó la aparición de alteraciones en la coordinación motora, pero atenuó la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, para determinar el grado de distonía de los animales realizamos el test de *claspings*. Los animales TDP43^{A315T} presentaron un aumento de la puntuación a partir de la semana 18, mientras que en los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} no se evidenció hasta la semana 24. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas que confirmen un retraso similar en la aparición de los síntomas (**Figura 22B**). No obstante, cabe destacar que el *claspings* no es el indicador más sensible de patología en el modelo TDP43^{A315T}, por lo que los resultados los hay que combinarlos en su evaluación con los del peso y la actividad motora.

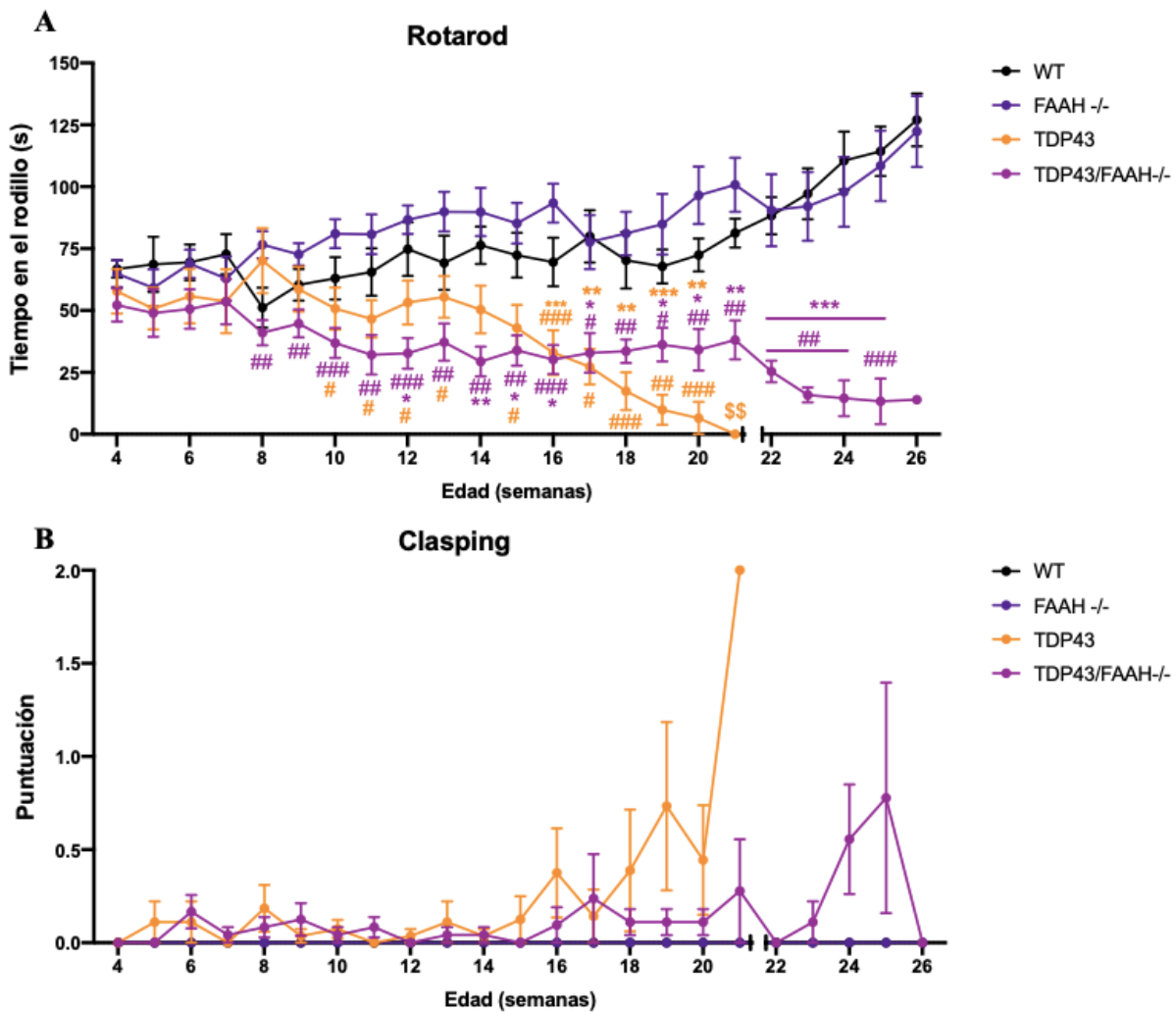


Figura 22: Evaluación del fenotipo patológico en el modelo TDP43^{A315T}. Representación gráfica del rendimiento en el test de rotarod (A) y en el test de clasping (B), en el periodo de 4 a 21 semanas de edad en ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y de 4 a 26 semanas para ratones macho transgénicos TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}, *wildtype* y FAAH^{-/-}. Los valores representan la media ± SEM de 8-9 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vías, seguido por la prueba post-hoc de Tukey (* p < 0.05, ** p < 0.01, ***p<0.001 vs. ratones WT; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p<0.001 vs. ratones FAAH^{-/-}; \$\$ p < 0.01 vs ratones TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}). A partir de la semana 21 los análisis compararon únicamente los grupos experimentales WT, FAAH^{-/-} y TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}).

1.1.3. Análisis histopatológicos en el asta ventral de la médula espinal

Una vez caracterizado el efecto de la ablación de FAAH a nivel comportamental, sacrificamos una cohorte adicional de animales a la semana 14, equivalente al PN95, una etapa en la que ya se ha descrito previamente la pérdida de motoneuronas en este modelo (Espejo-Porras et al., 2019; Rodríguez-Cueto et al., 2021) y realizamos estudios histológicos para estudiar a nivel celular el efecto de la delección de la enzima FAAH.

Concretamente, mediante tinción de Nissl identificamos y analizamos el número de motoneuronas presentes en el asta ventral de la médula espinal, donde se localizan los cuerpos celulares de las motoneuronas espinales inferiores afectadas en nuestro modelo de ELA y en la patología. Así, los animales transgénicos TDP43^{A315T} presentaron una mayor muerte neuronal, con

un 70% de motoneuronas detectadas con respecto a los grupos control. Sin embargo, la ausencia de la enzima FAAH en este modelo produjo un efecto protector, ya que como se puede observar en la **Figura 23**, hay un incremento significativo en el número de motoneuronas comparadas con los animales TDP43^{A315T}, que, de hecho, se aproxima a los valores de los controles utilizados.

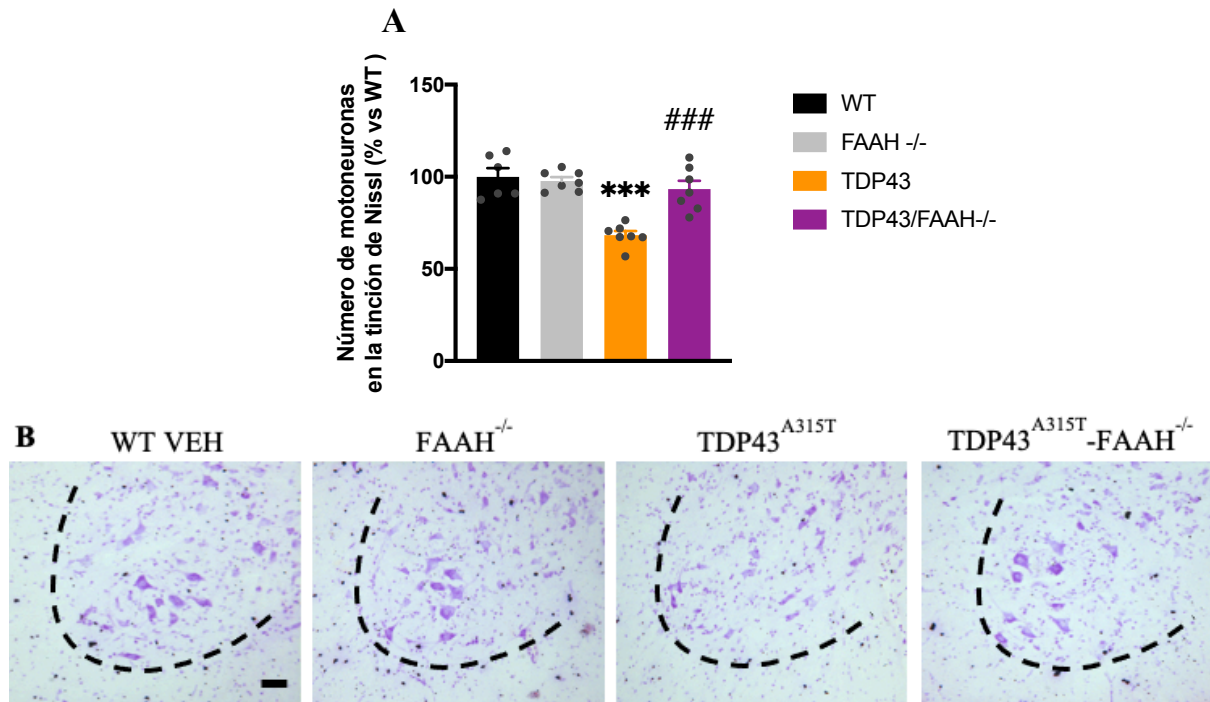


Figura 23: Efecto de la ablación de la enzima FAAH sobre la supervivencia de las motoneuronas en el modelo TDP43^{A315T}. Análisis del número de motoneuronas teñidas con Nissl (A), incluyendo imágenes representativas (B) (escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y *wildtype* con presencia normal o ausencia de la enzima FAAH. Los valores representados son la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo experimental. Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (** $p < 0.005$ vs. ratones WT; ### $p < 0.005$ vs. ratones FAAH^{-/-}; \$\$\$ $p < 0.005$ vs. ratones TDP43^{A315T}).

Otro aspecto importante que valorar es el impacto de la ablación en la gliosis asociada con el desarrollo de la patología, que ha sido ampliamente caracterizado en el modelo TDP43^{A315T}. Por ello, realizamos análisis inmunohistoquímicos para estudiar la inmunorreactividad glial utilizando los marcadores clásicos Iba1 y GFAP, los cuales permiten identificar específicamente células microgliales y astrogliales, respectivamente. Así, se observó que el aumento de la muerte neuronal presente en los animales transgénicos TDP43^{A315T} iba acompañado en estos animales de un incremento de la inmunorreactividad de ambos marcadores gliales, en comparación con los animales control. Sin embargo, la delección de FAAH en el modelo TDP43^{A315T} produjo una disminución significativa de la microgliosis (**Figura 24A, 24C**) y, en menor medida, una reducción de la inmunorreactividad del marcador astrocitario GFAP (**Figura 24B, 24D**).

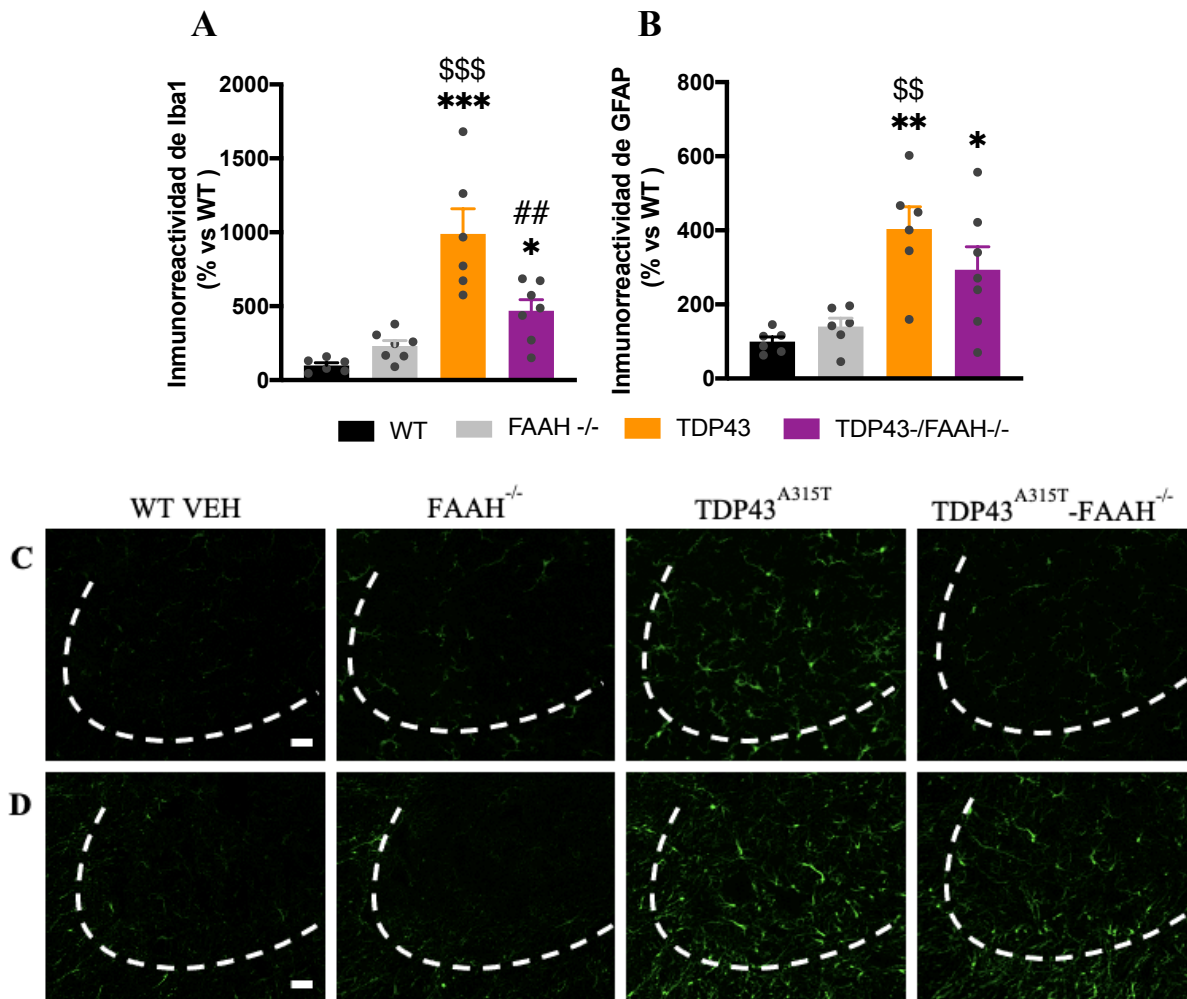


Figura 24: Efecto de la ablación de la enzima FAAH sobre la gliosis en el modelo TDP43^{A315T}. Cuantificación de la inmunoreactividad de Iba1 (A) y GFAP (B), incluyendo imágenes representativas (C y D, respectivamente; escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y *wildtype* con presencia normal o ausencia de la enzima FAAH. Los valores representan la media \pm SEM de 6-7 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005 vs. ratones WT; ## p < 0.01, ### p < 0.001 vs. ratones FAAH^{-/-}; \$\$ p < 0.01 vs. ratones TDP43^{A315T})

Por lo tanto, la ablación de FAAH en el modelo TDP43^{A315T} produjo efectos neuroprotectores, evidenciados por un aumento de la preservación de las motoneuronas y una disminución en la gliosis del asta ventral de la médula espinal en los TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} en comparación con los controles TDP43^{A315T}. Estos efectos se tradujeron en una mayor esperanza de vida y un retraso en la progresión de la enfermedad.

1.2. Inhibición farmacológica de la enzima FAAH

A la vista de los resultados obtenidos, quisimos dilucidar el papel de la FAAH en etapas más avanzadas de la progresión de la enfermedad. De esta forma, si con la anterior aproximación experimental podemos analizar el impacto de la eliminación de la FAAH desde el desarrollo,

teniendo en cuenta que se pueden producir respuestas adaptativas, es importante conocer el impacto de su bloqueo durante el curso de la patología. Es por esta razón, que realizamos un segundo experimento con una aproximación, en esta ocasión de tipo farmacológico, mediante la administración desde PN65 del inhibidor de la FAAH URB597 a una dosis de 0,2mg/kg

1.2.1. Análisis del fenotipo patológico

En esta ocasión, para examinar el efecto de la administración del inhibidor de la enzima FAAH URB597 sobre la patología en el modelo TDP43^{A315T}, comenzamos la administración en una etapa presintomática (PN65) hasta una etapa sintomática (PN95) y durante este periodo analizamos diferentes parámetros en los que se incluye el peso, la actividad motora y la distonía.

En las primeras fases del tratamiento, no se observaron diferencias entre los grupos experimentales hasta el día 25 de tratamiento. A partir de este punto, ambos grupos transgénicos experimentaron reducciones en el peso al compararlos con los animales controles, si bien en este caso los animales tratados con URB597 mostraron una pérdida de peso más pronunciada (**Figura 25A**). En cuanto a la coordinación motora, reflejada en el test de rotarod, los animales transgénicos tratados con vehículo o con URB597 mostraron un peor desempeño en esta prueba con respecto a los animales *wildtype* tratados con vehículo, sin diferencias entre los transgénicos tratados con vehículo o URB597 (**Figura 25B**). Por otro lado, en el test de clasping no se detectaron diferencias entre los distintos grupos experimentales analizados en el estudio (**Figura 25C**).

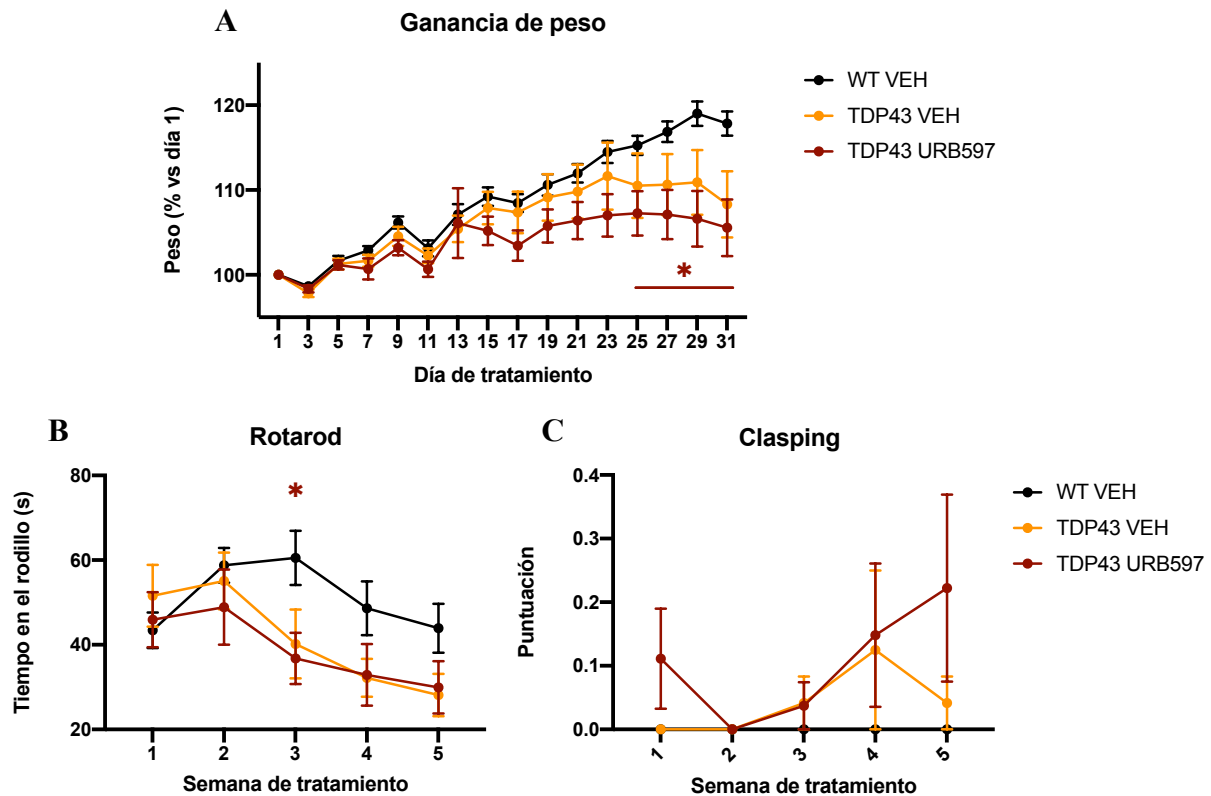


Figura 25: Evaluación del tratamiento con el inhibidor URB597 sobre el fenotipo patológico en el modelo TDP43^{A315T}. Representación gráfica de la ganancia de peso (A), desempeño en el test de rotarod (B) y puntuación en el test de Claspings (C) en ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y *wildtype*. Los valores representan la media ± SEM de 8–11 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vías (con medidas repetidas), seguido por la prueba post-hoc de Tukey (* p < 0.05 vs. ratones WT VEH.)

1.2.2. Análisis histopatológicos en el asta ventral de la médula espinal

Tras finalizar el tratamiento sacrificamos los animales y realizamos estudios histológicos en el asta ventral de la médula espinal para estudiar el efecto a nivel celular de la inhibición farmacológica de la enzima FAAH. Por un lado, mediante la tinción de Nissl analizamos el número de motoneuronas en este tejido. El conteo de las motoneuronas con la tinción de Nissl reveló un aumento de la muerte neuronal en los animales TDP43^{A315T} tratados con vehículo, que presentaron un 50% de motoneuronas en comparación con los animales *wildtype*. La administración del inhibidor de la enzima FAAH en los animales TDP43^{A315T} aumentó la supervivencia de las motoneuronas con respecto a los animales transgénicos tratados con vehículo, detectando un 80% de las motoneuronas observadas en los animales *wildtype* (Figura 26)

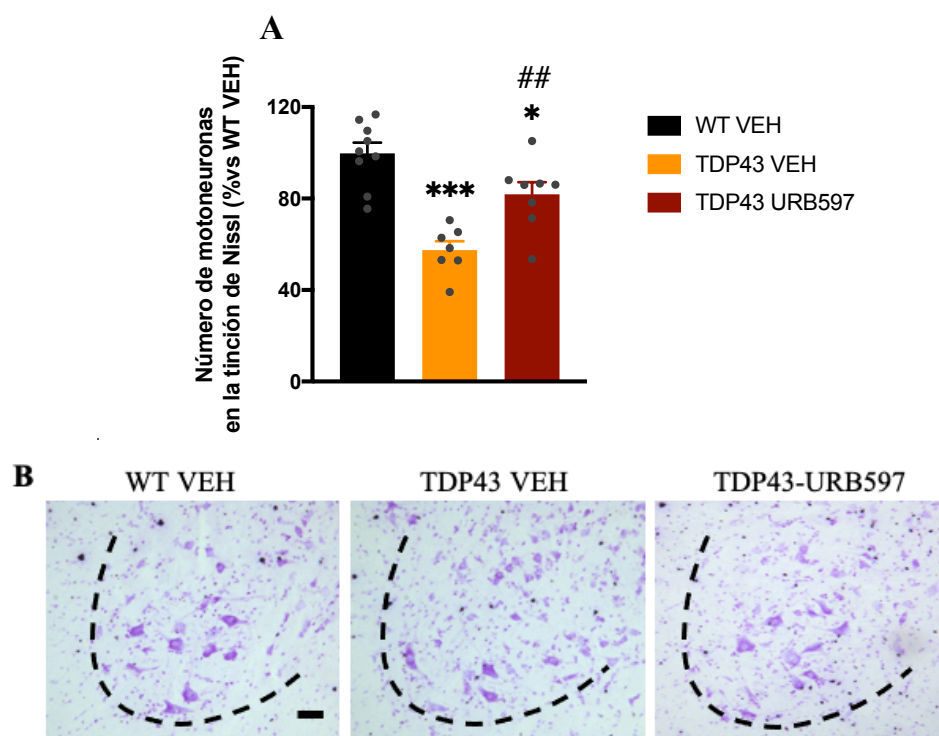


Figura 26: Estudio del efecto del inhibidor URB597 sobre la supervivencia de las motoneuronas en el modelo TDP43^{A315T}. Análisis del número de motoneuronas teñidas con Nissl (A), incluyendo imágenes representativas (B; escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal en ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y wildtype. Los valores representados son la media \pm SEM de 7–9 animales por grupo experimental. Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs. ratones WT VEH; ## $p < 0.01$ vs. ratones TDP43 VEH).

De manera similar a lo realizado en el experimento anterior, evaluamos el efecto de la inhibición farmacológica de la enzima FAAH en la gliosis asociada con el desarrollo de la patología. Para ello, se analizó mediante estudios de inmunofluorescencia la expresión de los marcadores gliales Iba1 y GFAP para identificar las células microgliales y astrogliales, respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en los niveles de inmunorreactividad para Iba1 y GFAP en los animales TDP43^{A315T} tratados con vehículo, que correlaciona con la muerte neuronal observada en estos animales. En cuanto a la inhibición de la enzima FAAH, el tratamiento con URB597 en los animales transgénicos no mostró diferencias en los niveles de inmunorreactividad para el marcador de microglía Iba1 (**Figura 27B, 27D**). Sin embargo, la administración del inhibidor sí que disminuyó la astrogliosis, medida por el marcador GFAP (**Figura 27A, 27C**), respecto a sus controles transgénicos tratados con vehículo.

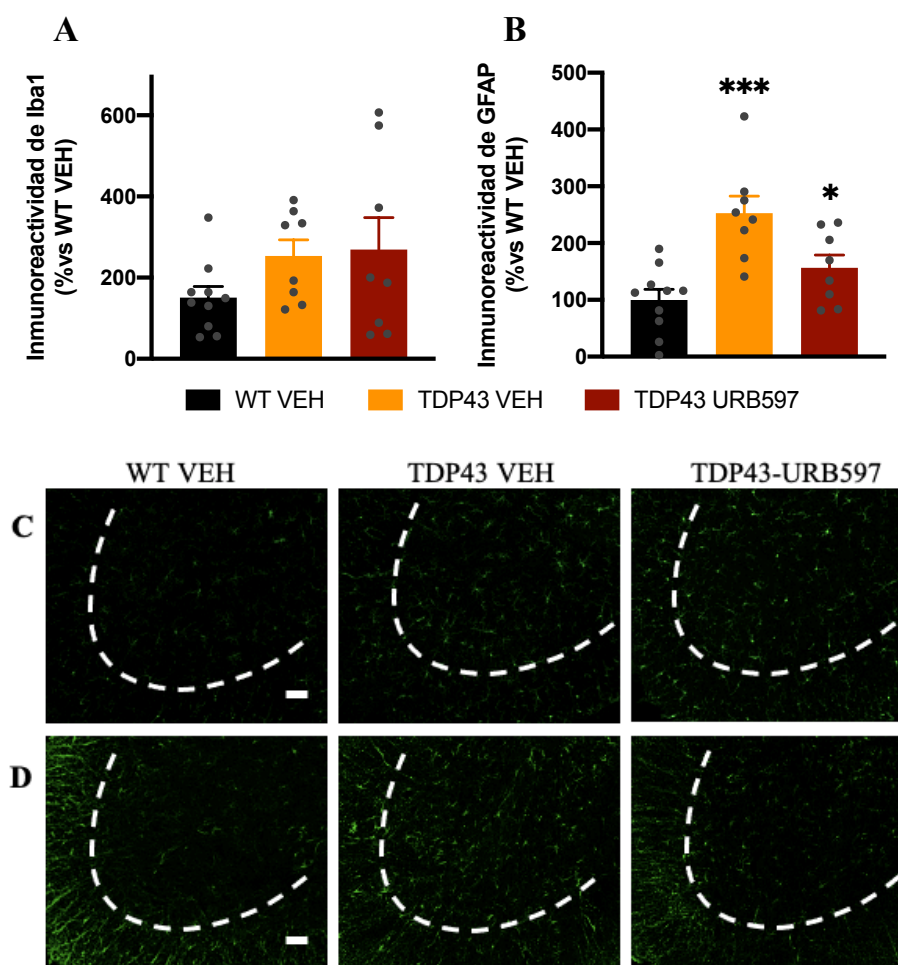


Figura 27: Análisis del efecto del inhibidor URB597 sobre la gliosis en el modelo TDP43^{A315T}. Cuantificación de la inmunoreactividad de Iba1 (A) y GFAP (B) incluyendo imágenes representativas (C y D, respectivamente; escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal en ratones macho transgénicos TDP43^{A315T} y *wildtype*. Los valores representan la media \pm SEM de 8-10 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs. ratones WT VEH).

1.2.3. Análisis bioquímico en la médula espinal

Con el propósito de profundizar en el efecto producido por la inhibición de la enzima FAAH en un tratamiento crónico, sobre los procesos de neuroinflamación asociados al desarrollo de la patología, se llevó a cabo un estudio de marcadores específicos de un fenotipo microglial asociado a enfermedad (DAM). Aunque tradicionalmente los fenotipos de las células de microglía han sido clasificados en proinflamatorios o antiinflamatorios, investigaciones recientes abogan por la existencia de múltiples fenotipos reactivos, cuya manifestación varía según el contexto, el entorno, la etapa de la enfermedad y su gravedad (Paolicelli et al., 2022).

Estos fenotipos se caracterizan por la expresión diferencial de diferentes genes microgliales. Entre los distintos fenotipos microgliales descritos, destaca el fenotipo asociado a enfermedad (DAM), frecuentemente observado en patologías del SNC como la enfermedad de Alzheimer (Paolicelli et al., 2022). Este estado se caracteriza por la disminución en la expresión de marcadores

homeostáticos de microglía (*CX3CR1*, *P2RY12*, *TMEM119*) y la sobreexpresión de marcadores implicados en las funciones inmunomoduladoras de la microglía (*CLEC7A*, *APOE*, *TREM2*). Concretamente, *TREM2* parece ser responsable de la transición al fenotipo DAM (Krasemann et al., 2017). Este fenotipo DAM también se ha identificado en varios modelos murinos de ELA, como en el modelo *SOD1^{G93A}*, donde se encontró una disminución en la expresión de genes homeostáticos como *P2RY12* y *CX3CR1*, y un aumento en *TREM2* (Keren-Shaul et al., 2017) o en el modelo *rNLS8*, donde se observó también un incremento de genes implicados en fagocitosis (Hunter et al., 2021). Además, estudios recientes han confirmado la presencia del fenotipo DAM en pacientes con ELA, mostrando un aumento en los niveles de *TREM2* y *APOE* (Jauregui et al., 2023).

Para determinar la presencia de este fenotipo en nuestra microglía, llevamos a cabo un análisis de expresión génica mediante qPCR de los marcadores DAM mencionados, en la médula espinal de nuestros ratones. El análisis de los resultados obtenidos no mostró diferencias en los niveles de ARNm de los genes *CX3CR1*, *APOE* y *TMEM119* entre los diferentes grupos experimentales (Figura 28B, 28D, 28F). Sin embargo, se observó una variación al alza en los niveles de expresión de los genes *TREM2* y *CLEC7A* en los animales *TDP43^{A315T}* con respecto a los animales *wildtype*, acompañado de cierta disminución de la expresión de *CLEC7A* tras el tratamiento con el inhibidor (Figura 28A, 28C). Además, se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de *P2RY12* en los animales transgénicos tratados con el vehículo, con respecto a los animales *wildtype*, mientras que se observó una tendencia al aumento de estos niveles después de la administración del inhibidor URB597 (Figura 28E)

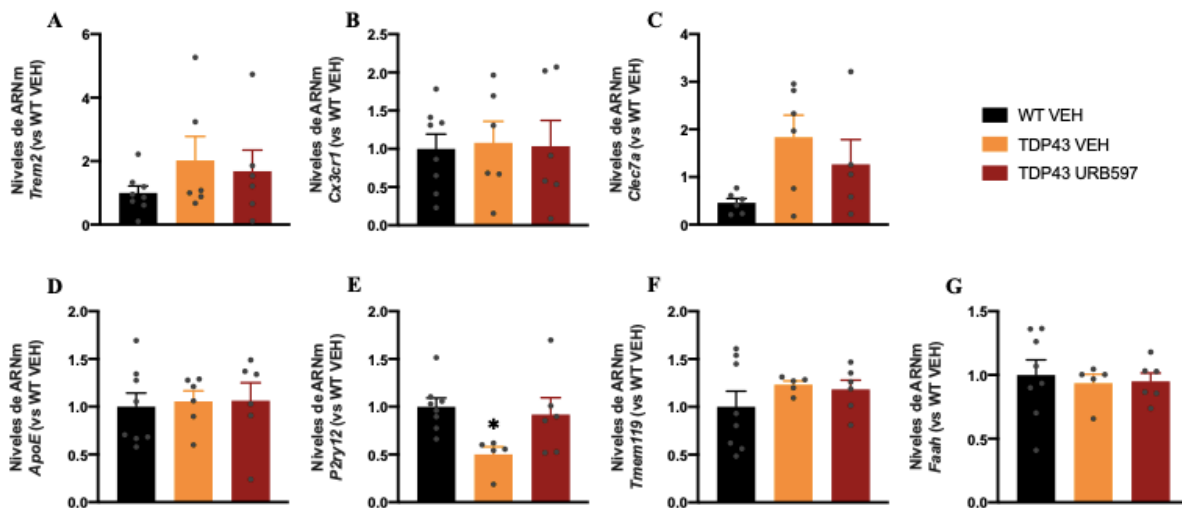


Figura 28: Efecto del inhibidor URB597 sobre los marcadores DAMs en el modelo *TDP43^{A315T}*. Cuantificación de los niveles de expresión de ARN mensajero de genes específicos de microglía (A-F) y de la enzima FAAH (G) medido en la médula espinal de ratones macho transgénicos *TDP43^{A315T}* y *wildtype*. Los valores representan la media ± SEM de 5-8 animales por grupo. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (*p < 0.05 vs. ratones WT VEH).

Por otro lado, quisimos estudiar el efecto que la administración de URB597 tiene sobre la propia expresión de la enzima FAAH. No observamos cambios en la expresión de la enzima FAAH en los animales TDP43^{A315T} tratados con vehículo en comparación con los controles, ni tampoco tras la administración del inhibidor (**Figura 28F**). Es decir, no se evidenció una respuesta compensatoria de expresión de la FAAH como resultado del tratamiento.

Por tanto, nuestros resultados indican que la inhibición farmacológica de la enzima de degradación FAAH, utilizando el inhibidor URB597 en nuestro modelo murino TDP43^{A315T}, mejora la supervivencia de las motoneuronas y reduce la inmunorreactividad de GFAP, además de revertir parcialmente el fenotipo DAM. No obstante, estos efectos no se traducen en mejoras significativas comportamentales en nuestro experimento.

2. Capítulo 2: Estudio del papel de receptores CB₂ periféricos en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}

El receptor CB₂ desempeña un papel esencial en el SNC y, durante los últimos años, se ha descrito una implicación clave de este receptor en varias enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington o la ELA (Fernández-Ruiz et al., 2007; Shoemaker et al., 2007), donde se ha visto que aumenta su expresión en diferentes estadios de la enfermedad como parte de una respuesta neuroprotectora (Benito et al., 2003; Palazuelos et al., 2009).

En concreto, en la ELA este incremento se ha observado en las regiones principalmente afectadas en la enfermedad, tanto en muestras *post mortem* de pacientes (Yiangou et al., 2006; Espejo-Porras et al., 2018) como en modelos animales. En el caso de los modelos animales, se ha podido profundizar en el tipo celular donde tiene mayor presencia, particularmente en las células gliales, microglía (Espejo-Porras et al., 2015) y astrocitos, aunque no exclusivamente (Espejo-Porras et al., 2015; Fernández-Trapero et al., 2017; Espejo-Porras et al., 2019). Además, la activación farmacológica del receptor CB₂ mediante agonistas totales o parciales, en modelos transgénicos murinos de ELA, como SOD1^{G93A} y TDP43^{A315T}, ha demostrado retrasar la aparición de síntomas, aumentar la esperanza de vida y mejorar los síntomas motores (Kim et al., 2006; Shoemaker et al., 2007; Espejo-Porras et al., 2019). Por otro lado, la implicación del receptor CB₂ en la progresión de la ELA se pudo demostrar dado que su eliminación mediante manipulación genética en el modelo TDP43^{A315T} adelantó la aparición de síntomas y agravó la patología, lo que resultó, además, en una reducción en la supervivencia de los ratones (Rodríguez-Cueto et al., 2021). Estos resultados confirmaron el papel neuroprotector de la activación del receptor CB₂, incluso desde etapas tempranas en la ELA, y la importancia de diseñar terapias dirigidas a este receptor.

Aunque se ha explorado el papel del receptor CB₂ en la ELA en el SNC, este receptor no se encuentra exclusivamente en este sistema, sino que, de hecho, se expresa principalmente en el sistema inmune, donde cumple una papel importante en la regulación de la inflamación. Además, está presente en tejidos periféricos, incluyendo el sistema cardiovascular, bazo, hígado, huesos (Turcotte et al., 2016) o el músculo esquelético entre otros (Cavuoto et al., 2007). Este último tejido es de especial relevancia en esta enfermedad, ya que se ve afectado gravemente durante el curso de la enfermedad. Además, como se ha comentado en la introducción, investigaciones recientes por varios grupos apuntan a que el músculo esquelético puede ser incluso el origen del daño primario, según la denominada hipótesis de la muerte retrógrada en la ELA (Loeffler et al., 2016). Por lo tanto, es importante comprender la función de los receptores CB₂ localizados en tejidos y sistemas periféricos en la progresión de la enfermedad para elucidar los mecanismos subyacentes a los efectos neuroprotectores ya descritos para este receptor en la ELA y poder, además, contribuir al desarrollo de terapias. Es por ello por lo que en la presente Tesis Doctoral uno de nuestros

objetivos principales ha sido estudiar el papel de los receptores CB₂ periféricos en los efectos centrales observados. Para ello, decidimos investigar el efecto de la activación de los receptores CB₂ periféricos mediante la administración, en el modelo transgénico de ELA SOD1^{G93A}, de dos agonistas del receptor CB₂ proporcionados por la compañía farmacéutica Roche (Roche LTD, Suiza): Ro-6871304 (abreviado como Ro-304), un ligando CB₂ incapaz de atravesar la BHE, y que por tanto solo es capaz de actuar sobre los receptores CB₂ periféricos; y Ro-6866945 (abreviado como Ro-945), que atraviesa la BHE, y que por tanto, es capaz de actuar a nivel central y periférico.

2.1. Análisis comportamental del fenotipo patológico

El efecto de la administración crónica de los compuestos en la progresión de la enfermedad se estudió mediante el seguimiento de la ganancia de peso, el análisis del estado clínico de los ratones y la evaluación de varias pruebas comportamentales. El modelo transgénico SOD1^{G93A} presenta varias alteraciones durante la progresión de la enfermedad que son medibles a través de varias pruebas comportamentales, entre las que se incluyeron el test de rotarod para evaluar la coordinación motora, el test del *grip strength* y el test de *hanging wire* para medir la fuerza muscular. Estas pruebas, junto con el estudio del estado neurológico de los animales mediante una escala clínica que evalúa su ambulación, resistencia y distonía, permiten determinar el estado patológico de los animales. Todas las pruebas se llevaron a cabo semanalmente durante las 8 semanas de duración del tratamiento (desde PN60 a PN120) a excepción del test del *grip strength* que se realizó únicamente entre las semanas 6 y 8 de tratamiento, que corresponden con las etapas sintomatológicas de los animales.

Por un lado, el registro de la evolución del peso reveló, como era de esperar, una pérdida de peso en los animales transgénicos SOD1^{G93A} a partir de la semana 6 de tratamiento con respecto a los animales *wildtype*. Los animales tratados con el agonista periféricamente restringido (Ro-304), presentaron una evolución del peso similar a los animales SOD1^{G93A}. Sin embargo, el tratamiento con el agonista que atraviesa la BHE (Ro-945), produjo una pérdida de peso más temprana (semana 5 de tratamiento) en los animales SOD1^{G93A} con respecto a los animales *wildtype*. No obstante, a partir de la semana 6, todos los animales transgénicos presentan una disminución del peso similar y significativa en comparación con los animales *wildtype* independientemente del tratamiento recibido (**Figura 29**).

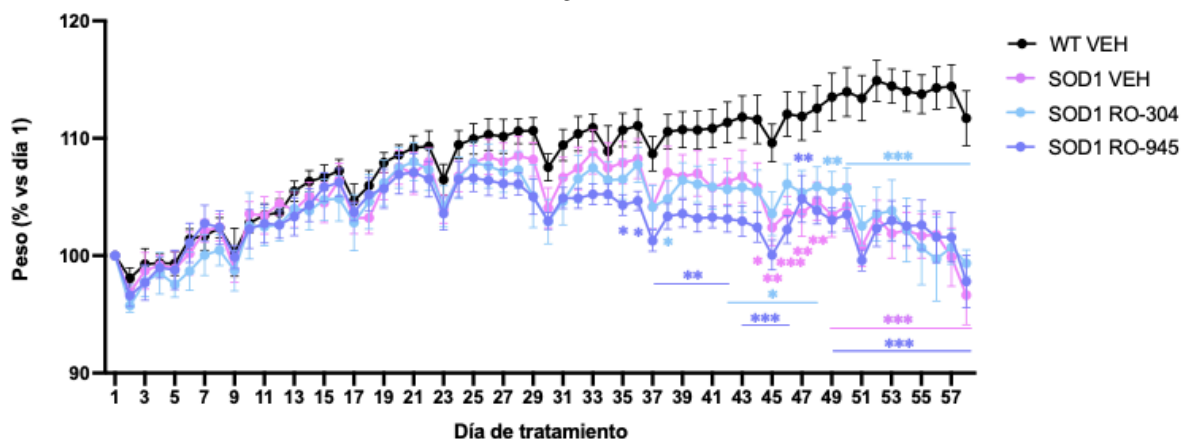


Figura 29: Análisis de la ganancia de peso diaria en ratones SOD1^{G93A} tratados con agonistas CB₂ (Ro-304 y Ro-945) y sus respectivos controles. Los valores representan la media \pm SEM de 6–10 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vías (con medidas repetidas), seguido por la prueba de Tukey (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005 vs. ratones WT VEH.)

Respecto a la prueba del rotarod, los ratones SOD1^{G93A} exhibieron una disminución en el tiempo de permanencia en el rotarod a partir de las 4 semanas de tratamiento (**Figura 30A**), y en el test del *hanging wire* en estadios finales (semanas 7 y 8 de tratamiento) (**Figura 30B**) en comparación con los animales *wildtype*. Sin embargo, el tratamiento con cualquiera de los dos tipos de agonistas CB₂ administrados no produjo cambios en estas pruebas comportamentales, que, de hecho, mostraron resultados similares a los observados en los ratones transgénicos tratados con vehículo.

En la evaluación de la escala clínica, indicativa del grado de afectación de la enfermedad, donde un valor de 15 indica el nivel más severo de la patología, los animales transgénicos SOD1^{G93A} tratados con vehículo obtuvieron puntuaciones significativamente más altas a partir de la semana 5 de tratamiento, en comparación con sus controles *wildtype*. Por otro lado, los animales tratados con los dos agonistas CB₂ mostraron resultados similares entre sí y similares a los obtenidos por los ratones SOD1^{G93A} tratados con vehículo. En ambos casos, la activación de los receptores CB₂, centrales y periféricos o exclusivamente de los receptores periféricos, experimentaron un aumento en sus puntuaciones a partir de la semana 6 de tratamiento, en relación con los controles *wildtype*; pero disminuyeron el score patológico a tiempos finales (semana 8 de tratamiento), respecto a los transgénicos tratados con vehículo (**Figura 30C**).

En la prueba del *grip strength*, los animales SOD1^{G93A} tratados con vehículo mostraron pérdida en la fuerza de agarre a partir de las 7 semanas de tratamiento con respecto a los animales *wildtype*. Sin embargo, los animales tratados con ambos agonistas CB₂ presentaron un aumento en la fuerza máxima en comparación con aquellos tratados con vehículo llegando a ser, estadísticamente significativo únicamente en el caso de los animales tratados con Ro-945 a las 7 semanas de tratamiento, aunque luego esta diferencia se perdió a medida que avanzaba la patología (**Figura 30D**).

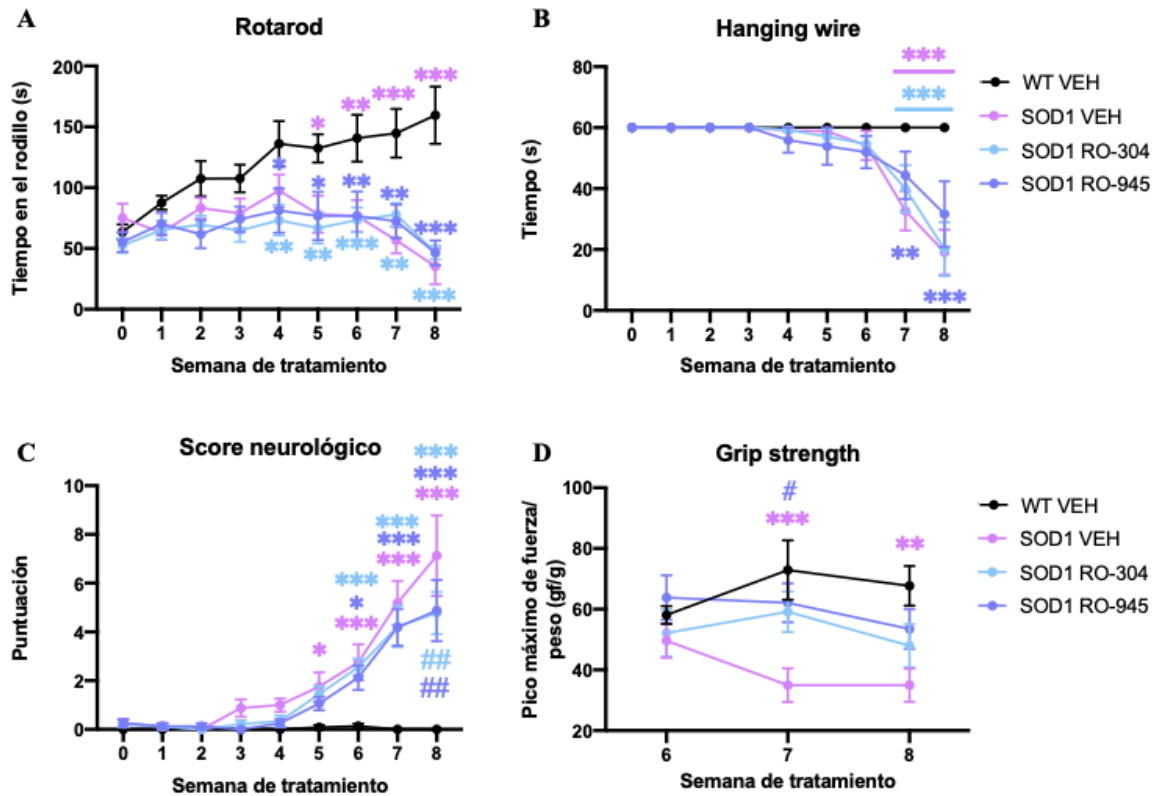


Figura 30: Evaluación del tratamiento con los agonistas del receptor CB₂ Ro-304 y Ro-945 sobre el fenotipo patológico en el modelo SOD1^{G93A}. Representación gráfica del desempeño en el test de rotarod (A), resultado del test hanging wire (B), puntuación neurológica (C) realizados semanalmente desde PN60 hasta PN120, y respuesta en el test del grip strength (D), realizadas semanalmente desde PN100 a PN120, en ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype*. Los valores representan la media ± SEM de 8–11 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vías, seguido por la prueba post-hoc de Tukey (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005 vs. ratones WT VEH; # p < 0.05 ## p < 0.01 vs. ratones SOD1 VEH).

2.2. Análisis histopatológico en la médula espinal

Tras finalizar el tratamiento farmacológico, realizamos estudios histológicos en las muestras de tejido de la médula espinal. Para ello, analizamos el número de motoneuronas en el asta ventral de la médula espinal. Las motoneuronas fueron identificadas mediante tinción de Nissl, que reveló muerte neuronal en los animales transgénicos tratados con vehículo en comparación con los animales *wildtype*. La activación de los receptores CB₂ por ambos compuestos, independientemente de su capacidad para atravesar la BHE, incrementó la supervivencia neuronal, en comparación con los ratones transgénicos tratados con vehículo (**Figura 31A, 31C**).

Aunque con la tinción de Nissl se pueden observar claramente los somas de las motoneuronas debido a sus características, quisimos confirmar estos resultados, llevando a cabo un marcaje más específico utilizando un anticuerpo contra la enzima acetilcolintransferasa (ChAT, del inglés *Choline Acetyltransferase*), ya que esta enzima se encuentra predominantemente en las neuronas colinérgicas como las motoneuronas. La acetilcolintransferasa se sintetiza en el soma de estas células y es transportada hasta los terminales axonales. En las figuras **31B y 31D**, se puede

observar como la administración crónica de ambos tipos de agonistas CB₂, tiene un impacto en la preservación de las motoneuronas en el asta ventral en los estadios finales. Así, si el descenso en el número de motoneuronas alcanza el 50% con los ratones transgénicos SOD1 tratados con vehículo, este se reduce en aproximadamente un 25% en los ratones tratados con cualquiera de los dos tipos de compuestos. Sorprendentemente, nuestros resultados confirmaron que ambos compuestos, a pesar de que uno de ellos no atraviesa la BHE, son capaces de mitigar de forma similar la muerte neuronal observada en los animales SOD1^{G93A}.

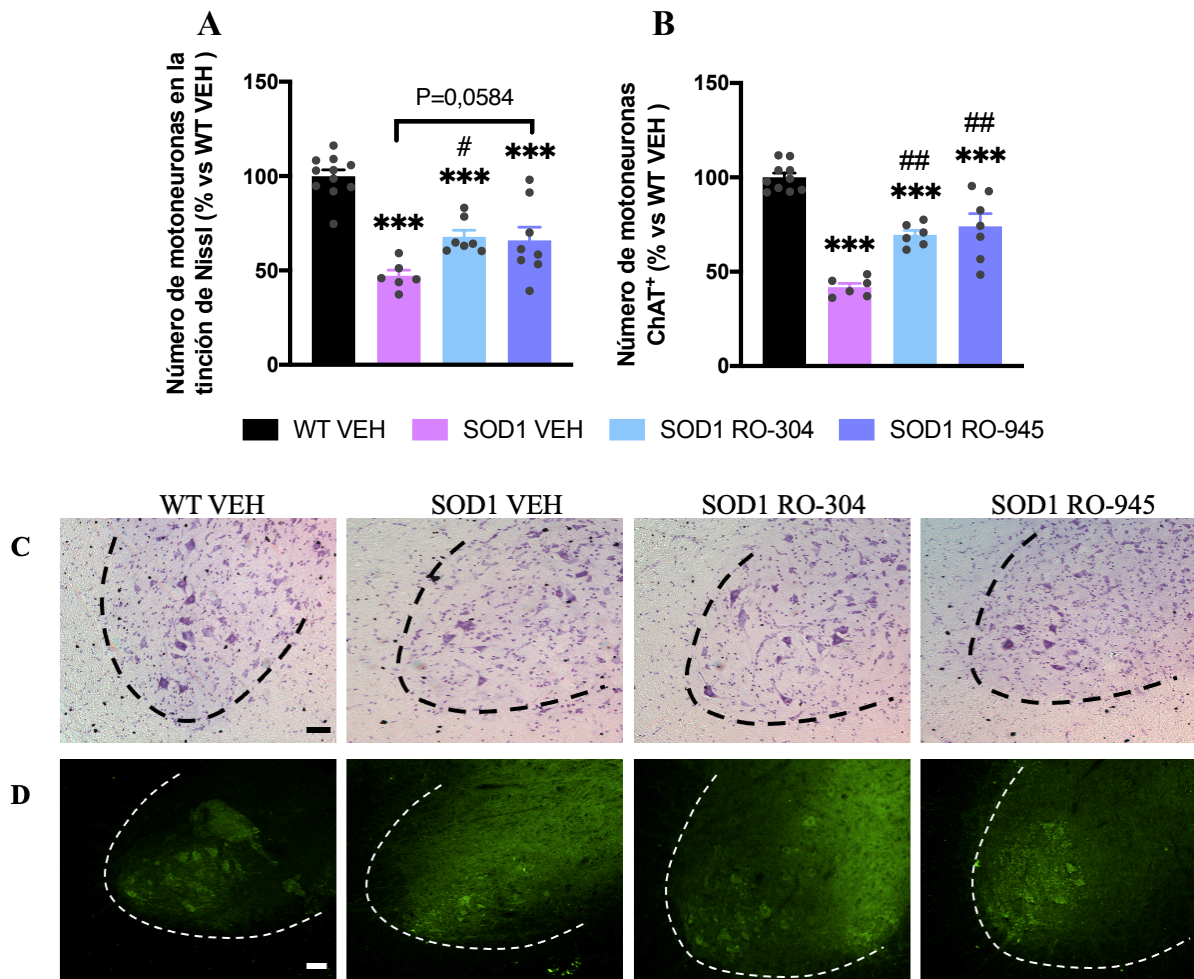


Figura 31: Estudio del efecto de los agonistas del receptor CB₂ Ro-304 y Ro-945 sobre la supervivencia de las motoneuronas en el modelo SOD1^{G93A}. Cuantificación del número de motoneuronas teñidas con Nissl (A), incluyendo imágenes representativas (C; escala = 100 μm) o con ChAT+ (B) incluyendo imágenes representativas (D; escala = 100 μm), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype*. Los valores son la media ± SEM de 6–10 animales por grupo experimental. Los datos se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (** p < 0.005 vs. ratones WT VEH; # p < 0.05 ## p < 0.01 vs. ratones SOD1 VEH).

Otro factor importante en la etiopatogénesis de la ELA es la inflamación, por lo que es necesario evaluar el impacto de los tratamientos en la glía. La muerte neuronal observada en los animales transgénicos tratados con vehículo se asoció, como ya se ha descrito anteriormente, con una mayor inmunorreactividad del marcador microglial Iba1 en comparación con los animales *wildtype*. Curiosamente, solo el tratamiento con el agonista exclusivamente periférico Ro-304 logró

reducir los niveles de marcaje de Iba1 (**Figura 32A, 32D**). Para validar este efecto sobre las células de microglía, se analizó otro marcador, CD68, que específicamente marca macrófagos activados o células de microglía con capacidad fagocítica. En este caso, los animales transgénicos tratados con vehículo también exhibieron un aumento en los niveles de inmunorreactividad de CD68, y tanto Ro-945 como Ro-304 mostraron un efecto similar al reducir el marcaje para esta proteína en comparación con sus controles transgénicos tratados con vehículo (**Figura 32B, 32E**). Es decir, al combinar los resultados obtenidos con los dos marcadores utilizados, se observa un efecto inmunomodulador del tratamiento de la microglía. Sin embargo, en el caso del estudio sobre los astrocitos se observó un aumento en la inmunorreactividad del marcador GFAP en los animales $SOD1^{G93A}$ tratados con vehículo; sin embargo, ninguno de los dos agonistas del receptor CB_2 redujo estos niveles (**Figura 32C, 32F**).

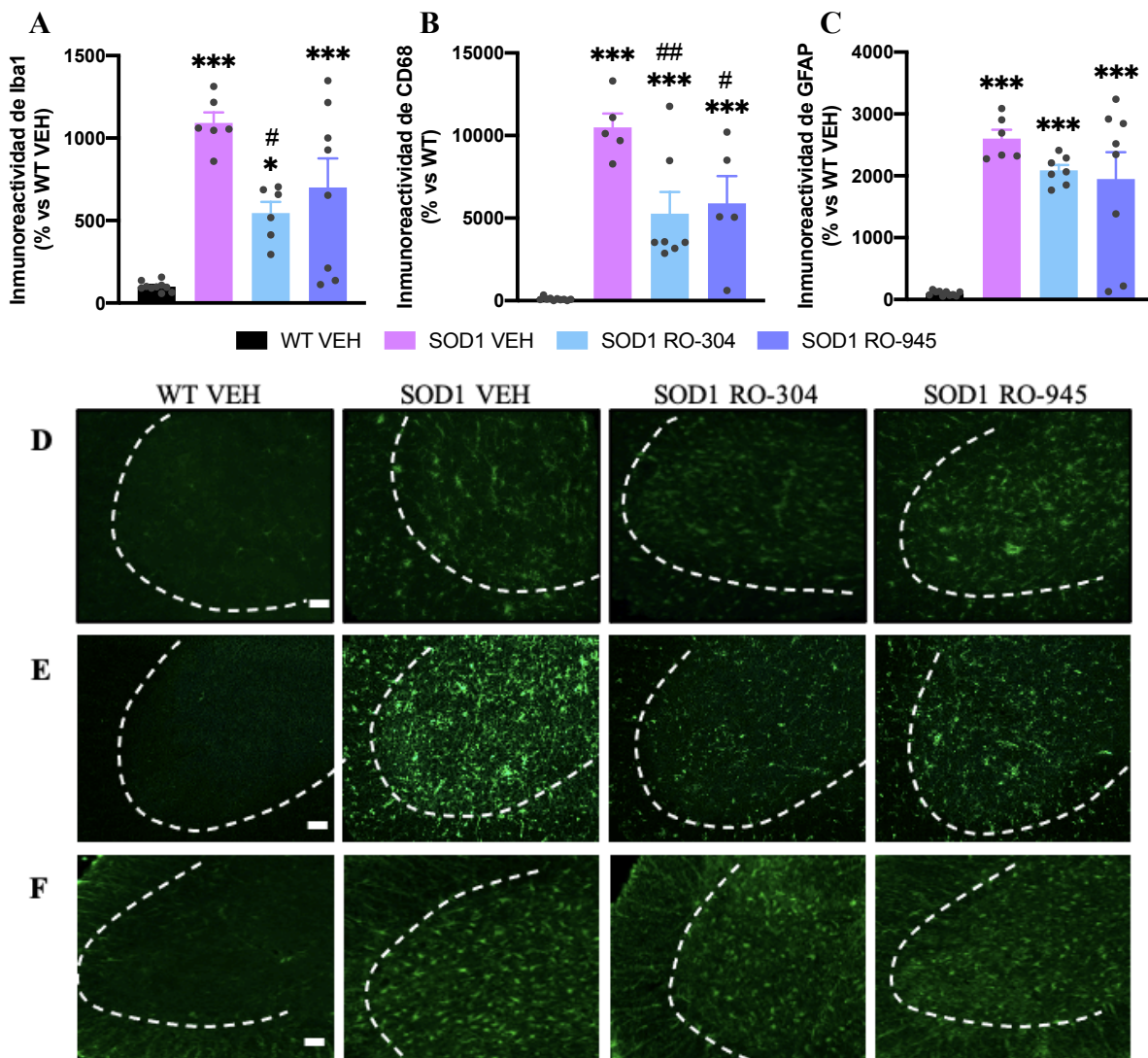


Figura 32: Análisis del efecto los agonistas del receptor CB_2 Ro-304 y Ro-945 sobre la gliosis en el modelo $SOD1^{G93A}$ Cuantificación de la inmunorreactividad de los marcadores gliales Iba1 (A), CD68 (B) y GFAP (C) incluyendo imágenes representativas (D y E y F, respectivamente; escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal en ratones macho transgénicos $SOD1^{G93A}$ y *wildtype*. Los valores representan la media \pm SEM de 5-10 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs. ratones WT VEH; # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$ vs. ratones SOD1 VEH).

2.3. Análisis bioquímico en músculo esquelético

Como ya se ha comentado, el receptor CB₂ se encuentra expresado, entre otros tejidos periféricos, en el tejido muscular esquelético, particularmente relevante en el contexto de la ELA. Cabe destacar, que en estudios previos hemos observado, mediante estudios de inmunohistoquímica, un aumento de los niveles de este receptor en el músculo gastrocnemio de ratones SOD1^{G93A} (figura 33).

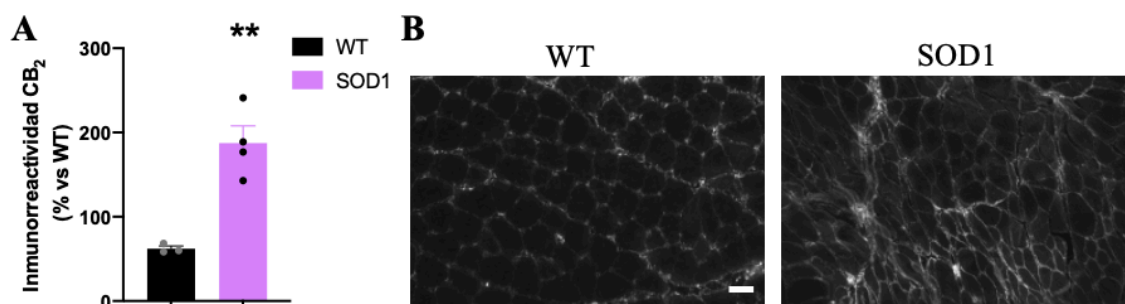


Figura 33: Análisis de los niveles de proteína del receptor CB₂ en el músculo gastrocnemio del modelo SOD1^{G93A} Cuantificación de la inmunorreactividad del receptor CB₂ incluyendo imágenes representativas (B); escala = 100 µm), en el músculo gastrocnemio en ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype*. Los valores representan la media ± SEM de 3-4 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante t- test (** p < 0.01 vs. ratones WT VEH)

Teniendo en cuenta estos datos preliminares, junto con la neuroprotección ejercida por el compuesto que no atraviesa la BHE, surgió la hipótesis de que la activación de este receptor en el compartimento muscular, al activar los receptores CB₂ periféricos, podría desempeñar un papel en estos efectos neuroprotectores observados. Por consiguiente, se llevó a cabo un estudio para investigar el impacto de la activación de los receptores CB₂ periféricos en el músculo esquelético. En primer lugar, decidimos investigar los niveles de expresión en el glúteo conforme a estudios previos realizados (Calvo et al., 2012).. De manera interesante, al igual que en los niveles de inmunorreactividad, observamos un aumento en los niveles de ARNm del receptor CB₂ en los animales SOD1^{G93A} tratados con vehículo. Los dos agonistas, independientemente de su capacidad para atravesar la BHE mostraron cierta capacidad para disminuir los niveles de expresión de ARNm del receptor (Figura 34A).

Además, realizamos en el glúteo estudios de expresión de ARNm de diferentes biomarcadores de enfermedades musculares, previamente validados en el modelo de SOD1^{G93A}, cuya expresión se induce al alza durante la progresión de la enfermedad en este modelo murino (Calvo et al., 2012). Estos marcadores abarcan diversos mecanismos relacionados con la actividad muscular, incluyendo la diferenciación y regeneración muscular evaluadas por el Factor de Mejora de Miocitos 2c (*MEF2C*) y el Colágeno tipo XIX alfa 1 (*COL19A1*); el estrés oxidativo, indicado por los

niveles de Glutación Reductasa (*GSR*); la endocitosis, medida mediante la Nexina 10 (*SNX10*); y la modulación de calcio, señalada por los niveles de Calmodulina-1 (*CALM1*).

Como se había descrito previamente, detectamos un incremento en la expresión de los cinco biomarcadores en los animales *SOD1^{G93A}* al compararlo con los controles. El tratamiento con ambos agonistas tuvo efectos similares sobre los niveles de expresión de los marcadores *GSR* y *COL19A*, donde se observó una pérdida de la significancia en los niveles de ARNm de estos genes en los ratones *SOD1^{G93A}* tratados con agonistas en comparación con los tratados con vehículo, siendo mayor el efecto del tratamiento con Ro-304 (agonista periféricamente restringido) en la expresión del gen *COL19A* (Figura 34B-C).

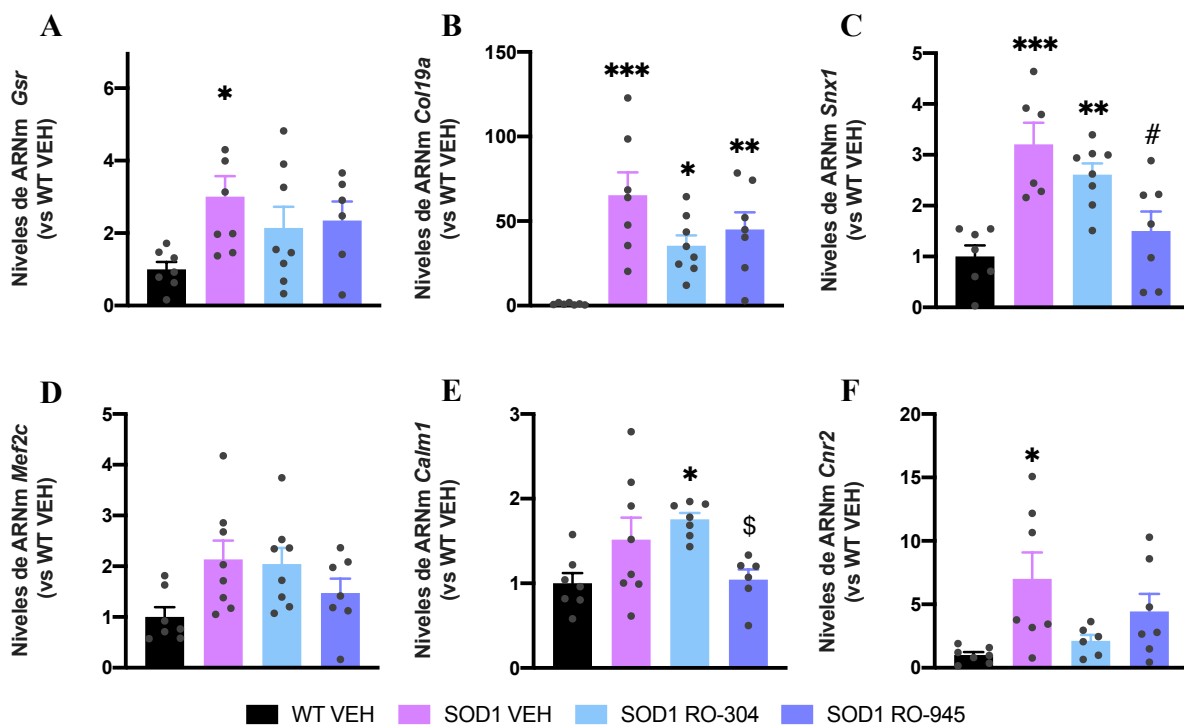


Figura 34: Efecto del tratamiento con los agonistas del receptor CB₂ Ro-304 y Ro-945 en la funcionalidad muscular en el modelo *SOD1^{G93A}*. Cuantificación de los niveles de expresión de ARN mensajero de genes relacionados con la funcionalidad y el mantenimiento del músculo esquelético (A-E) y del receptor CB₂ (F) medido en el glúteo de animales transgénicos *SOD1^{G93A}* y *wildtype*. Los valores representan el valor medio ± SEM de 6-8 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey (*p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.005 vs. ratones WT; \$ p < 0.05 vs. ratones *SOD1* Ro-304).

Respecto a la expresión de *SNX1*, ambos compuestos redujeron los niveles de expresión observados en el grupo de transgénicos tratados con vehículo, sin embargo, en el caso del tratamiento con el agonista Ro-304, incapaz de atravesar la BHE, el efecto fue menor, marcado por la pérdida de un nivel de significancia con respecto a los transgénicos vehiculos; mientras que fue el agonista Ro-945, capaz de atravesar la BHE, el que en este caso produjo una disminución significativa de los niveles de ARNm del marcador *SNX1* (Figura 34D). Por otro lado, solo el agonista Ro-945, con capacidad de unirse a receptores tanto centrales como periféricos, fue capaz de

reducir los niveles de ARNm de *MEF2C* y *CALM1*, con respecto a los animales *SOD1^{G93A}* tratados con vehículo, siendo este efecto significativo únicamente sobre la expresión de *CALM1* (Figura 34E-F).

2.4. Estudio histopatológico en músculo esquelético.

Adicionalmente, para investigar si la activación de los receptores CB₂ a nivel muscular podría estar influyendo en la preservación de las motoneuronas en la médula espinal, llevamos a cabo estudios histológicos de las uniones neuromusculares en el músculo tibial anterior de estos ratones. Los animales transgénicos *SOD1^{G93A}* presentaron un mayor número de fibras denervadas, es decir, aquellas en las que la conexión con la neurona motora está completamente ausente, en comparación con los controles *wildtype*. Además, los dos agonistas CB₂ tuvieron un efecto positivo en la preservación de la enervación en las uniones neuromusculares (Figura 33). Es decir, ambos agonistas CB₂ aumentaron el número de fibras que mantenían una conexión completa con las motoneuronas, lo que permite la transmisión del impulso nervioso a la fibra y con ello la contracción muscular.

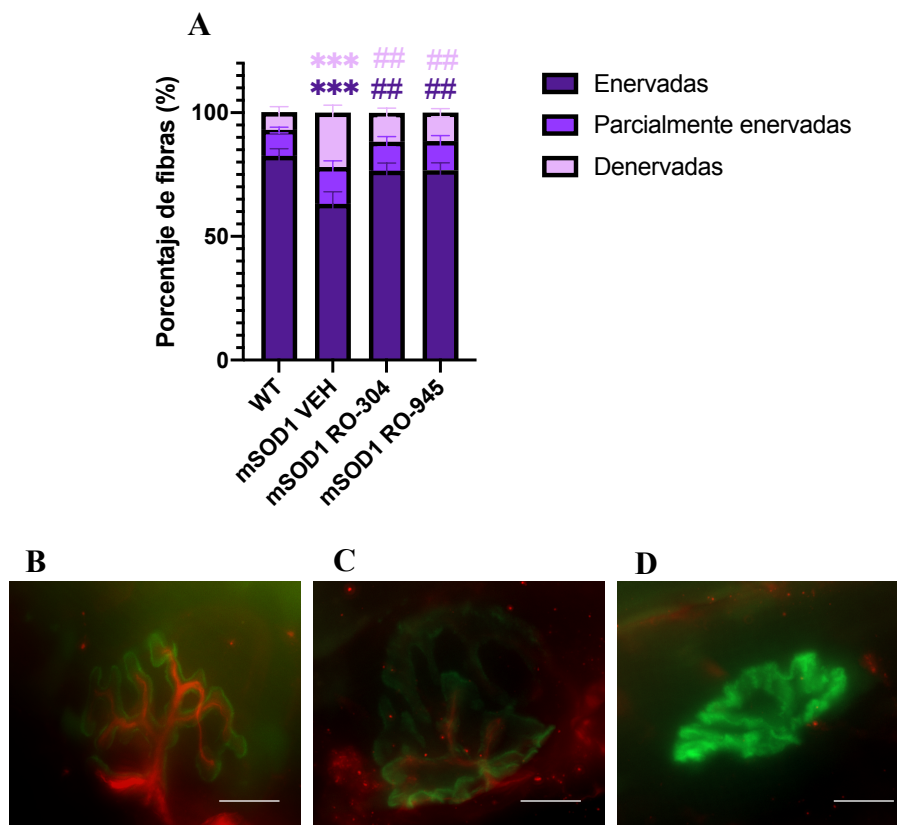


Figura 33: Efecto del tratamiento con los agonistas del receptor CB₂ Ro-304 y Ro-945 en la preservación de la unión neuromuscular en el modelo *SOD1^{G93A}*. Cuantificación del porcentaje de fibras enervadas, parcialmente enervadas y denervadas presentes en el tibial anterior de animales transgénicos *SOD1^{G93A}* y *wildtype*; incluyendo imágenes representativas de las uniones neuromusculares enervadas (A), parcialmente enervadas (B) y denervadas (C); escala = 100 μ m). En las imágenes, el marcatejo en rojo indica el neurofilamento y sinaptofisina, marcadores correspondientes al terminal axonal y las vesículas sinápticas, mientras que el marcatejo en verde señala la bungarotoxina, que identifica la placa motora. Los valores representan la media \pm SEM de 5-8 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante

análisis de varianza de dos vías seguido de la prueba de Tukey (***) $p < 0.005$ vs. ratones WT; ## $p < 0.01$ vs. ratones SOD1^{VEH}; el color del símbolo corresponde al grupo sobre el que se ha hecho la comparación).

2.5. Estudios farmacocinéticos: HPLC-MS

Debido a que nuestros resultados muestran una acción neuroprotectora, tanto si el agonista puede actuar a nivel sistémico como si está restringido sin posibilidad de atravesar la BHE y, por lo tanto, actuar directamente en el SNC, surge la necesidad de profundizar en el análisis de estos resultados. De esta forma, una de las hipótesis que nos propusimos explorar fue si el compuesto restringido periféricamente efectivamente no estaba pasando al SNC debido a posibles alteraciones en la BHE durante el curso de la enfermedad. Algunos estudios han descrito una ruptura de la BHE en pacientes con ELA (Winkler et al., 2013; Garbuzova-Davis & Sanberg, 2014; Vu & Bowser, 2017), y, en el modelo murino SOD1^{G93A}, se han documentado cambios estructurales en la BHE en la médula espinal pero sin alteraciones en las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares (Garbuzova-Davis, et al., 2007a; Garbuzova-Davis, et al., 2007b). Una posible ruptura, o alteración en la permeabilidad de la BHE permitiría el paso del compuesto Ro-304 al SNC y podría explicar los efectos neuroprotectores derivados de su administración. Aunque estos compuestos han sido previamente evaluados a nivel farmacocinético en ratones sanos por Roche, demostrando su incapacidad para atravesar la BHE, los resultados paradójicos encontrados en nuestro estudio nos llevaron a reevaluar algunos aspectos de su farmacocinética en nuestro modelo SOD1^{G93A}. Para ello, se realizó un nuevo estudio en una nueva cohorte de animales transgénicos utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) para determinar la presencia de los compuestos en plasma, médula espinal y cerebro en distintos tiempos tras una única administración intraperitoneal de Ro-945 (30 mg/kg) o Ro-304 (10 mg/kg) a PN120.

En el análisis de los niveles de los compuestos en el plasma, observamos que tanto Ro-304 como Ro-945 alcanzaron su concentración máxima a los 30 minutos tras la administración, para luego decrecer completamente a los 180 y 360 minutos. Este comportamiento se replicó en la médula espinal y el cerebro tras la administración de Ro-945, el agonista capaz de atravesar la BHE. En contraste, se pudo comprobar que Ro-304 (agonista periférico) no estaba presente en el SNC a los diferentes tiempos analizados (**Figura 34**), lo cual confirma, que el compuesto periférico no atraviesa la BHE, ejerciendo así su acción exclusivamente a nivel periférico, también en el contexto de la patología.

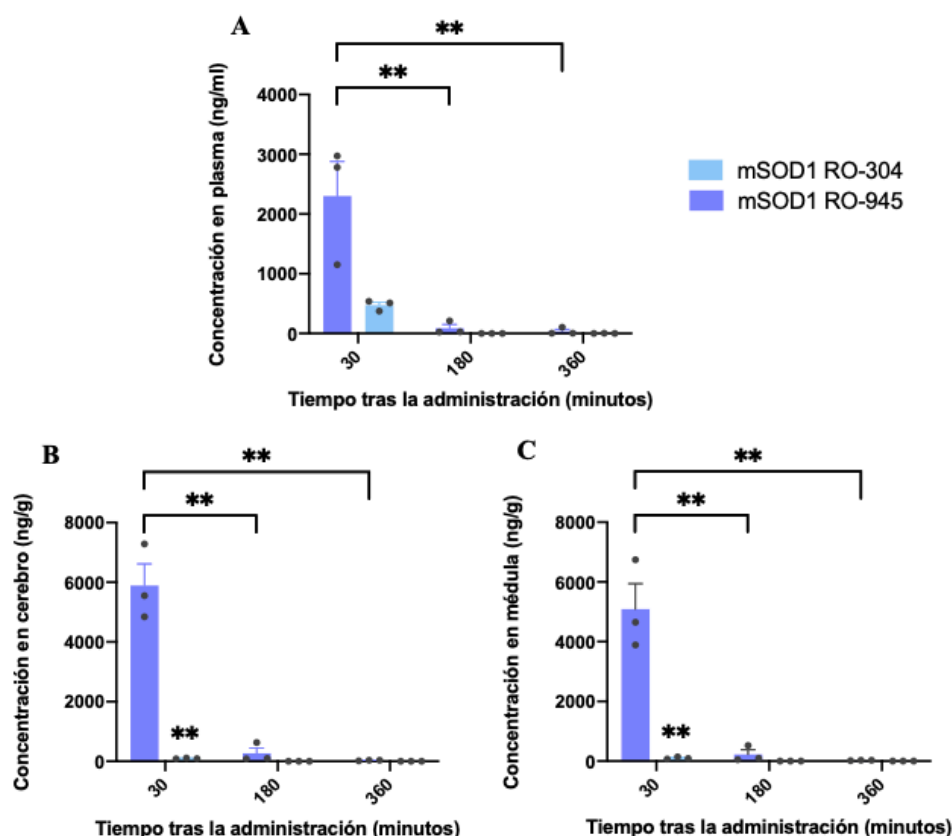


Figura 34: Determinación de los niveles de los compuestos Ro-304 y Ro-945 en plasma, cerebro y médula espinal tras la administración aguda en el modelo SOD1^{G93A}. Cuantificación de la concentración de Ro-945 y Ro-304 en plasma (A), cerebro (B) y médula espinal (C), tras 30, 180 y 360 minutos de la administración. Los valores representan la media \pm SEM de 3 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vía seguido de la prueba de Sidak (** $p < 0.01$ vs ratones SOD1 Ro-945)

En resumen, en el modelo de SOD1^{G93A} los tratamientos con los agonistas Ro-945 y Ro-304 tuvieron efectos similares tanto a nivel comportamental, mejorando en algunos aspectos el fenotipo patológico, como a nivel histológico en la médula espinal, donde los dos compuestos aumentaron la supervivencia neuronal y redujeron la microgliosis. Además, confirmamos que el compuesto Ro-304 no atraviesa la BHE. Estos resultados sugieren, por tanto, que la activación de los receptores CB₂ periféricos tienen efectos neuroprotectores, y podrían ser responsables, en parte, de los efectos beneficiosos observados sobre la progresión de la enfermedad en estudios preclínicos con agonistas CB₂. Estos efectos beneficiosos podrían ser el resultado de la activación directa de los receptores CB₂ periféricos presentes en el músculo esquelético, o bien de la activación periférica del sistema inmune, tanto por la posible infiltración de células inmunes en el SNC como por la acción inmunomoduladora de estas células sobre el músculo esquelético afectado

3. Capítulo 3: Estudio del papel neuroprotector de un nuevo interactador del receptor CB₁, BiP, en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}

La activación del receptor CB₁ constituye una potencial estrategia neuroprotectora para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, ya que está implicado en la modulación de diferentes mecanismos en el sistema nervioso; incluyendo la regulación de la transmisión sináptica y la autofagia. Así, sus propiedades neuroprotectoras son debidas, por un lado, a los efectos antiexcitotóxicos derivados de su activación. La unión de los endocannabinoides liberados por las neuronas postsinápticas a los receptores CB₁ en las neuronas presinápticas inhibe la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato, evitando la excitotoxicidad. De hecho, la delección de este receptor en un modelo de hipoxia-isquemia, aumentó la excitotoxicidad y los déficits neurológicos asociados (Marsicano et al., 2003). Por otro lado, experimentos *in vitro* así como en un modelo de ratón de envejecimiento CB₁ *knockout*, han demostrado que la activación del receptor CB₁ ejerce efectos neuroprotectores al regular la activación lisosomal y la degradación mediante la inhibición de la vía de AKT/mTORC1 (Costa et al., 2016).

En el contexto de la ELA, el receptor CB₁ ha demostrado efectos neuroprotectores derivados de su papel en el control de la excitotoxicidad. Por ejemplo, se observó que la activación de este receptor con Δ^9 -THC en cultivos neuronales primarios de médula espinal reducía la excitotoxicidad inducida por kainato, un agonista de los receptores de glutamato (Abood et al., 2001). Además, en el modelo murino SOD1^{G93A} el tratamiento con Δ^9 -THC retrasó la pérdida de funciones motoras y prolongó la supervivencia, gracias a la capacidad del Δ^9 -THC para reducir el daño oxidativo y ejercer un efecto antiexcitotóxico (Raman et al., 2004). Por otro lado, se han identificado cambios en los niveles de expresión del receptor CB₁ en motoneuronas en pacientes y modelos de ELA que parecen contribuir a la patología de la ELA. Concretamente, la expresión de este receptor se encontró disminuida en la médula espinal de muestras *post mortem* de pacientes de ELA (Espejo-Porras et al., 2018) y en el modelo murino de SOD1^{G93A}, acompañado, además, de un aumento de los receptores de glutamato (Zhao et al., 2008), lo que sugiere su contribución a la excitotoxicidad.

No obstante, los mecanismos moleculares derivados de la activación del receptor CB₁ son muy variados y dependen del contexto fisiopatológico y del tipo celular en el que se encuentra expresado. Es necesario comprender mejor cómo actúa el receptor CB₁ en función del contexto fisiológico para poder aprovechar mejor su potencial terapéutico en el tratamiento de la ELA y así mejorar las terapias dirigidas a su activación. En este sentido, se están desarrollando nuevas estrategias farmacológicas que buscan una activación más selectiva del receptor CB₁, como el uso de moduladores alostéricos. Estas estrategias parecen más prometedoras al evitar los efectos secundarios no deseados al mismo tiempo que potencian los efectos terapéuticos del receptor CB₁ (Yang et al., 2022). Además, se están haciendo esfuerzos para comprender las interacciones

intracelulares del receptor CB₁ con proteínas interactoras. De hecho, en los últimos años se ha descrito que la modulación de este receptor está mediada por proteínas interactoras como la CRIP1a, las β-arrestinas o la GASP (Oliver et al., 2020). Recientemente, se ha identificado un nuevo interactor y regulador del receptor CB₁, la chaperona BiP (Costas-Insua et al., 2021). Se ha observado que BiP interacciona con CB₁ específicamente en las neuronas gabaérgicas, donde dicha interacción bloquea la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR al acoplarse con proteínas Gα/q11. Por tanto, dado que la activación del receptor CB₁ ha mostrado efectos neuroprotectores en modelos de ELA, la interacción entre BiP y el receptor CB₁ podría desempeñar un papel crucial en la patología de esta enfermedad.

Por otro lado, cabe destacar que se han identificado variaciones en los niveles de BiP en varios modelos de ELA (Bruening et al., 1999; Chen et al., 2012; François-Moutal et al., 2022), mientras que la sobreexpresión en modelos animales de la enfermedad ha demostrado reducir los agregados proteicos, lo que resulta en una mayor supervivencia neuronal y una mejora en la función motora (Gifondorwa et al., 2007; François-Moutal et al., 2022), demostrando efectos beneficiosos de la expresión de esta proteína.

Con base a estos datos, quisimos profundizar en la relevancia de esta proteína en la ELA. Por ello, nuestro objetivo en este capítulo ha sido examinar la implicación de la proteína BiP en la progresión de la patología en el modelo murino de ELA más investigado hasta la fecha, el SOD1^{G93A}. Hipotetizamos que la delección parcial de BiP contribuirá a la progresión de la enfermedad, empeorando el fenotipo de los animales SOD1^{G93A}. Para ello, empleamos ratones con delección genética parcial del gen BiP (BiP^{+/-}), ya que los ratones con ablación total del gen mueren en fase embrionaria. Estos ratones BiP^{+/-} se cruzaron con ratones transgénicos SOD1^{G93A} para generar ratones dobles mutantes (SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}) sobre los que evaluar la progresión de la patología tanto a nivel comportamental como a nivel molecular y celular.

3.1. Análisis de la supervivencia

Para analizar el impacto de la delección parcial de la proteína BiP en el modelo murino SOD1^{G93A}, se analizó la supervivencia en una primera cohorte de animales. Los resultados mostraron una mortalidad más temprana en los SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} en comparación con los ratones transgénicos SOD1^{G93A} con expresión normal de BiP. Así, se observó que, en los ratones SOD1^{G93A}, la mortalidad comenzó a PN 140 (20 semanas), con una supervivencia media de 147 días, y todos los animales habían muerto a PN 161 (23 semanas). En contraste, la delección parcial de BiP en estos ratones adelantó la muerte de los animales. Así, los ratones SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} comenzaron a morir a PN 105 (15 semanas), presentaron una supervivencia media de 136 días, y todos los animales habían muerto a PN 151 (21 semanas). (**Figura 35**).

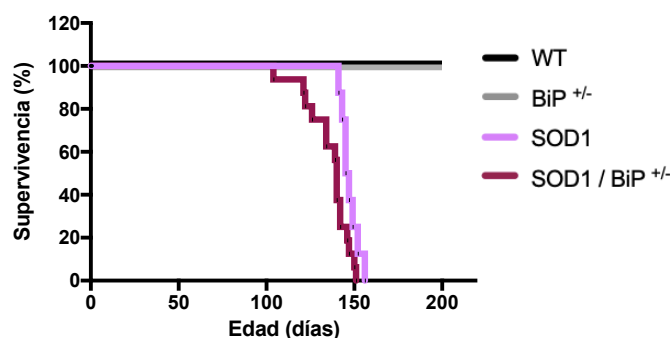


Figura 35: Análisis de la supervivencia de los animales SOD1^{G93A} y *wildtype* con presencia normal o ablación parcial de la proteína BiP. Los datos de la supervivencia de los animales se representaron con una gráfica de Kaplan-Meier y se evaluaron mediante la prueba de Chi-cuadrado ($\chi^2 = 4.952$, $p < 0.05$).

3.2. Análisis del fenotipo patológico

Posteriormente, se evaluó en una segunda cohorte el efecto de la delección parcial de la proteína BiP sobre la progresión de la enfermedad en los ratones SOD1^{G93A}. Para ello, se llevó a cabo un seguimiento de la pérdida de peso y diversos tests comportamentales incluidos el test de rotarod, para evaluar la coordinación motora, y el test de *hanging wire*, para medir la debilidad muscular. Además, se aplicó una escala clínica para evaluar el estado neurológico de los animales. Estos análisis se realizaron entre las semanas 9 y 11 de edad en los cuatro grupos experimentales, correspondientes a estadios presintomáticos en el modelo SOD1^{G93A}.

En primer lugar, el seguimiento de la evolución del peso con respecto al primer día no reveló cambios en el peso de los animales SOD1^{G93A} respecto a los controles. Sin embargo, a las 11 semanas, los ratones SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} mostraron una tendencia hacia una mayor pérdida de peso, en comparación con los demás genotipos. No obstante, la gran variabilidad de los datos no permite llegar a una conclusión definitiva (**Figura 36A**). En el caso del test de *hanging wire* no se observaron diferencias en el tiempo de latencia en la rejilla entre los animales transgénicos SOD1^{G93A} y los controles. Sin embargo, los SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} presentaron un tiempo de latencia significativamente menor a las 11 semanas, en comparación con los animales *wildtype* con presencia normal o ablación parcial de la proteína BiP (**Figura 36B**). Además, en la escala clínica, que permite evaluar el estado neurológico, los animales SOD1^{G93A} no mostraron diferencias en la puntuación obtenida en comparación con los animales *wildtype* y BiP^{+/-}; mientras que los dobles mutantes obtuvieron puntuaciones más altas a las 11 semanas, en comparación con el resto de genotipos, aunque no se observaron diferencias significativas (**Figura 36C**). De manera similar, los animales SOD1^{G93A} no mostraron diferencias en la coordinación motora con respecto a los genotipos control. Sin embargo, los animales SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} presentaron un desempeño significativamente peor en la semana 11 en comparación con los animales *wildtype* (**Figura 36D**).

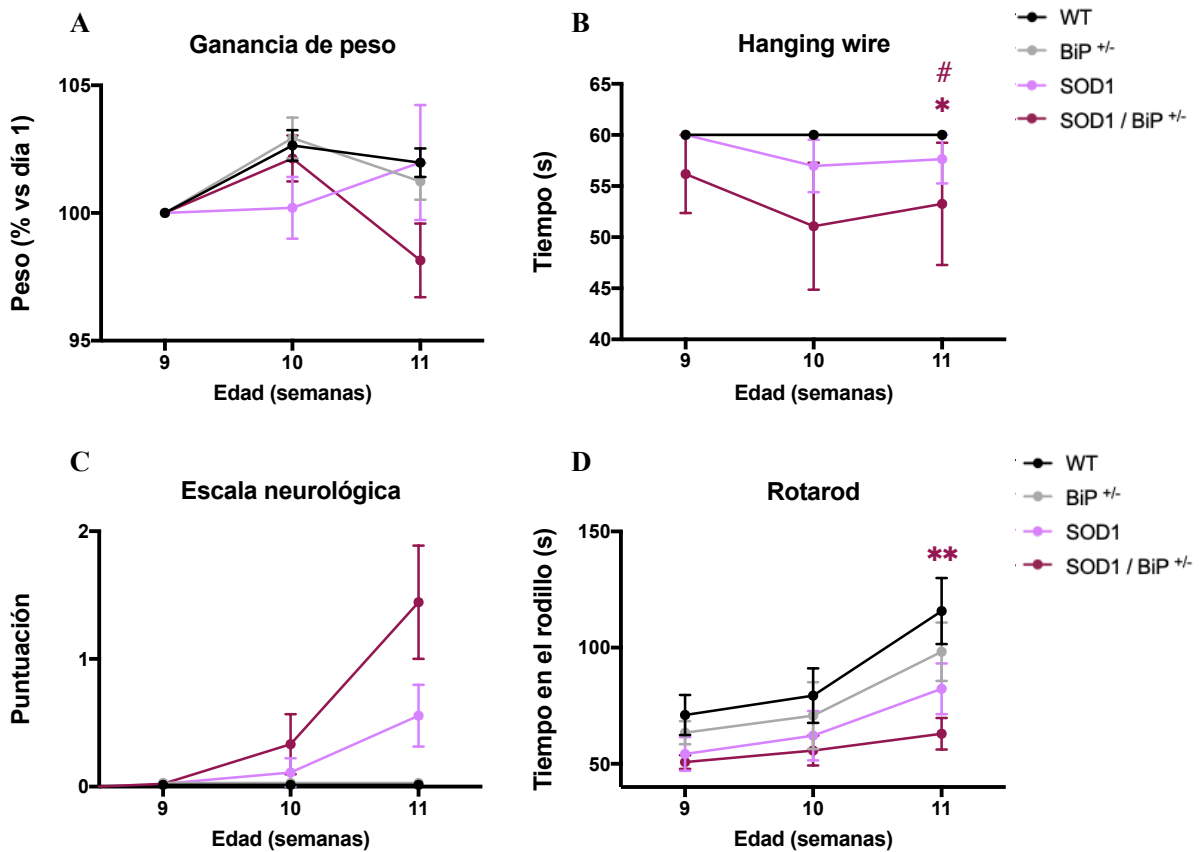


Figura 36: Evaluación del fenotipo patológico en el modelo SOD1^{G93A}/BiP^{-/-}. Representación gráfica de la ganancia de peso semanal (A), el resultado del *hanging wire* (B), la escala clínica (C) y el rendimiento en el test de rotarod (D), en ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype* con presencia normal o ablación parcial de la proteína BiP. Los valores representan la media ± SEM de 6–10 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de dos vías (con medidas repetidas), seguido por la prueba post-hoc de Tukey (* p < 0.05, ** p < 0.01 vs. ratones WT; # p < 0.05 vs. ratones BiP^{-/-}).

3.3. Análisis histopatológicos en el asta ventral de la médula espinal

Al concluir la caracterización comportamental a las 11 semanas, se sacrificaron los animales para realizar estudios histológicos en el asta ventral de la médula espinal y determinar el efecto de la delección parcial de BiP sobre la supervivencia de las neuronas. La cuantificación de las motoneuronas marcadas mediante tinción de Nissl indicó una pérdida neuronal similar en los ratones SOD1^{G93A} y SOD1^{G93A}/BiP^{-/-}, con aproximadamente un 50% de muerte neuronal en comparación con los grupos control (Figura 37).

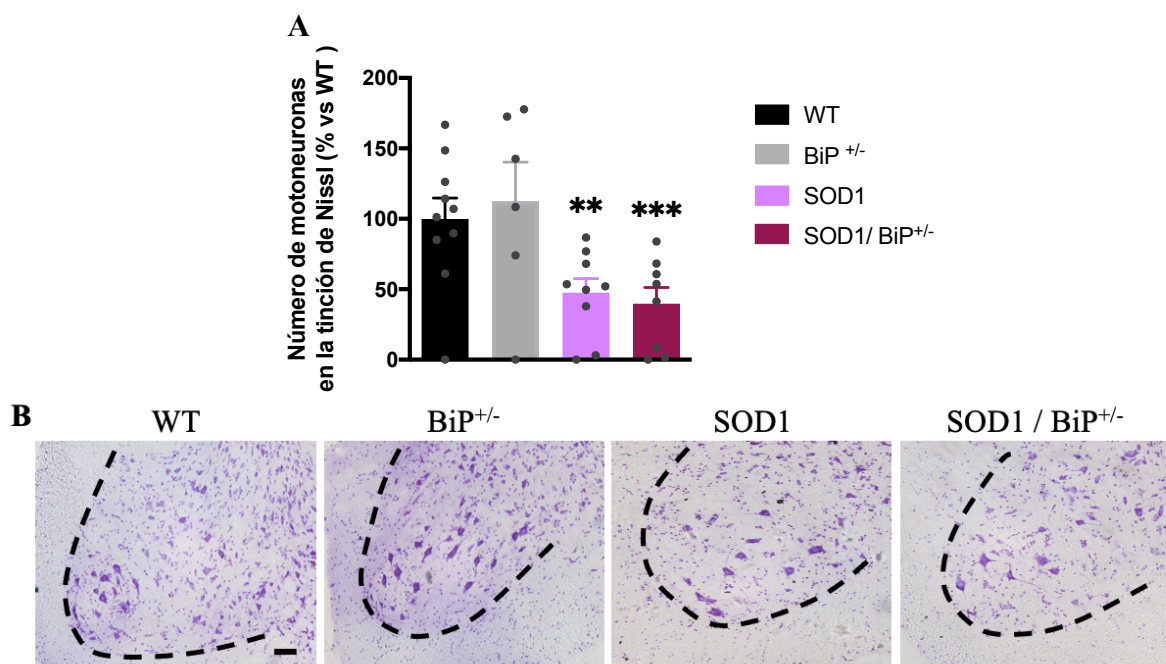


Figura 37: Efecto de la delección parcial de BiP sobre la supervivencia de las motoneuronas en el modelo SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}. Análisis del número de motoneuronas teñidas con Nissl (A), incluyendo imágenes representativas (B) (escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype* con presencia normal o ausencia parcial de la proteína BiP. Los valores son medias \pm SEM de 5-7 animales por grupo y se evaluaron mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ vs. ratones WT o BiP^{+/-}).

Además, se realizó un estudio de la expresión de marcadores gliales mediante inmunofluorescencia, concretamente de Iba1 y GFAP para identificar las células microgliales y astrogliales, respectivamente. Observamos que la pérdida neuronal observada en los ratones transgénicos SOD1^{G93A}, ya sea con expresión normal o delección parcial de BiP, estaba asociada a un aumento en los niveles de inmunorreactividad de Iba1 con respecto a los genotipos control. Sin embargo, este incremento fue mayor en el caso de los dobles mutantes que en los ratones SOD1^{G93A} con expresión normal de BiP (**Figura 38A, 38C**). De manera similar, los animales SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} y SOD1^{G93A} exhibieron una mayor inmunorreactividad de GFAP en comparación con sus controles; con unos niveles más elevados en los animales SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}, en comparación con los ratones SOD1^{G93A} (**Figura 38B, 38D**).

Debido el impacto encontrado con la pérdida de función parcial de BiP en el modelo transgénico de SOD1, creimos interesante poder profundizar en este fenómeno neuroinflamatorio. De esta forma, se llevó a cabo un estudio morfológico con el fin de determinar el estado de activación de las células positivas para Iba1 y GFAP. En un estado activado, estas células presentan un área elevada del soma y una reducción en la longitud de las ramificaciones (Ceprián et al., 2017). Para comprender mejor estos resultados, se analizaron morfológicamente estas dos poblaciones celulares.

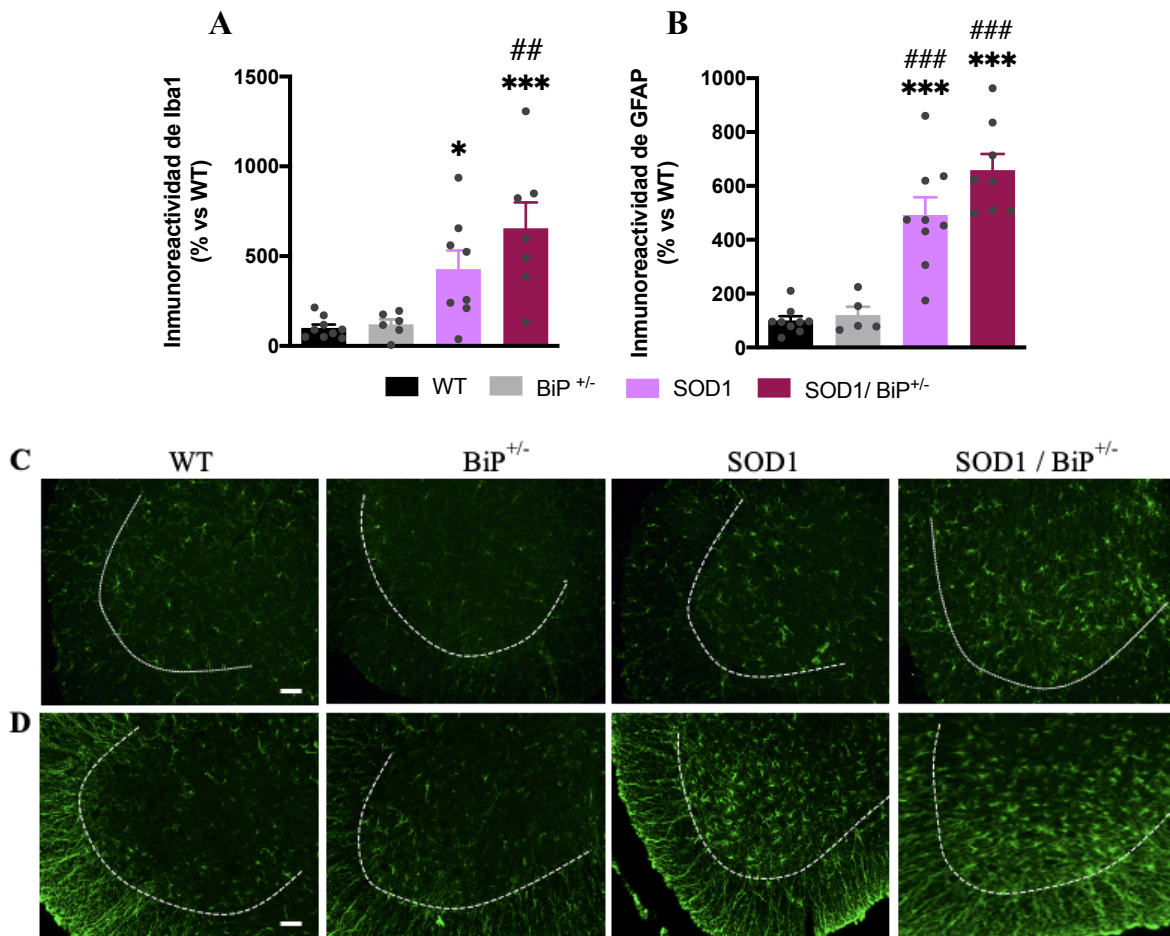


Figura 38: Efecto de la delección parcial de BiP sobre la gliosis en el modelo $mSOD1^{G93A}/BiP^{-/-}$. Cuantificación de la inmunorreactividad de Iba1 (A) y GFAP (B), incluyendo imágenes representativas (C y D, respectivamente; escala = 100 μ m), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos $SOD1^{G93A}$ y *wildtype* con presencia normal o ausencia parcial de la proteína BiP. Los valores representan la media \pm SEM de 5-7 animales por grupo. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs. ratones WT; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.005$ vs. ratones $BiP^{-/-}$)

El análisis morfológico de las células positivas para Iba1 reveló en ambos genotipos $SOD1^{G93A}$ una mayor activación de estas células, en comparación con los animales *wildtype* o $BiP^{-/-}$. Además, se observó una activación mayor en los ratones $SOD1^{G93A}/BiP^{-/-}$ con respecto a los animales $SOD1^{G93A}$ con expresión normal de BiP (**Figura 39**). En el análisis de las células GFAP positivas se detectaron resultados similares. Los ratones $SOD1^{G93A}$ mostraron mayor activación de los astrocitos en comparación con los genotipos *wildtype* o $BiP^{-/-}$. Además, los animales $SOD1^{G93A}-BiP^{-/-}$ presentaron un aumento en los niveles de activación de las células GFAP positivas en comparación con los animales $SOD1^{G93A}$ con expresión normal de BiP (**Figura 40**).

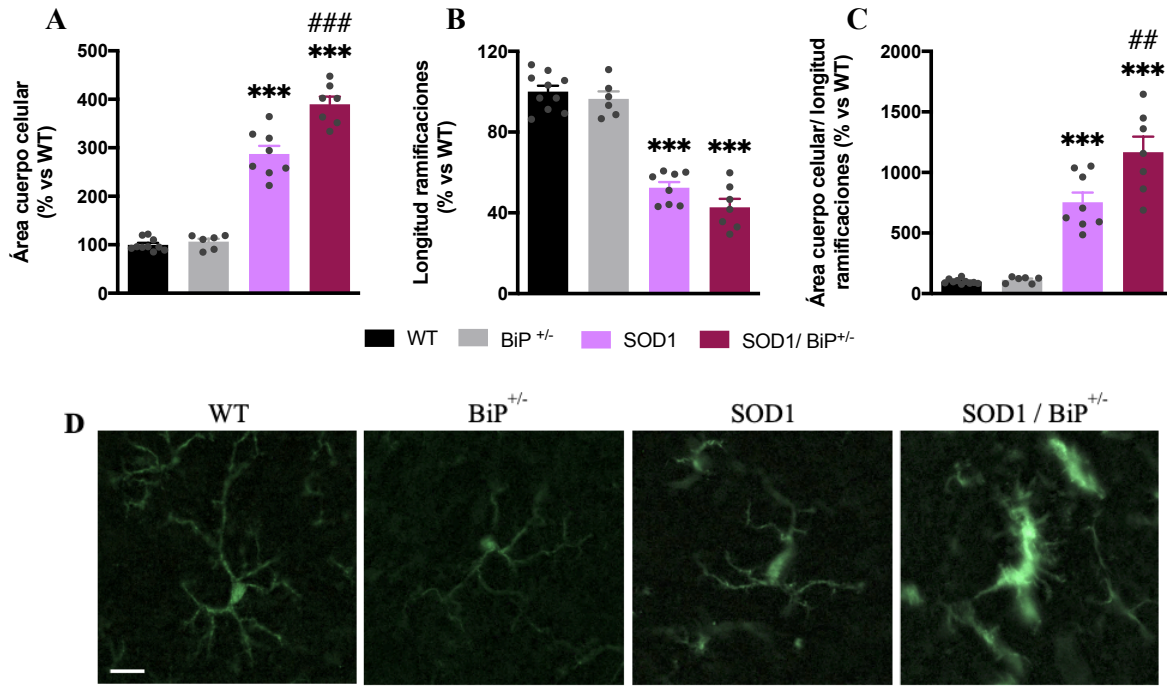


Figura 39: Estudio de la morfología de las células positivas para Iba1. Cuantificación de parámetros morfológicos (área del cuerpo celular (A), longitud de las ramificaciones (B) y su relación (C)), incluyendo imágenes representativas (D; escala = 25 μ m), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype* con presencia normal o ausencia parcial de la proteína BiP. Los valores representan la media \pm SEM de 5-7 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (** p < 0.005 vs. ratones WT y BiP^{+/-}; ## p < 0.01, ### p < 0.005 vs. ratones SOD1).

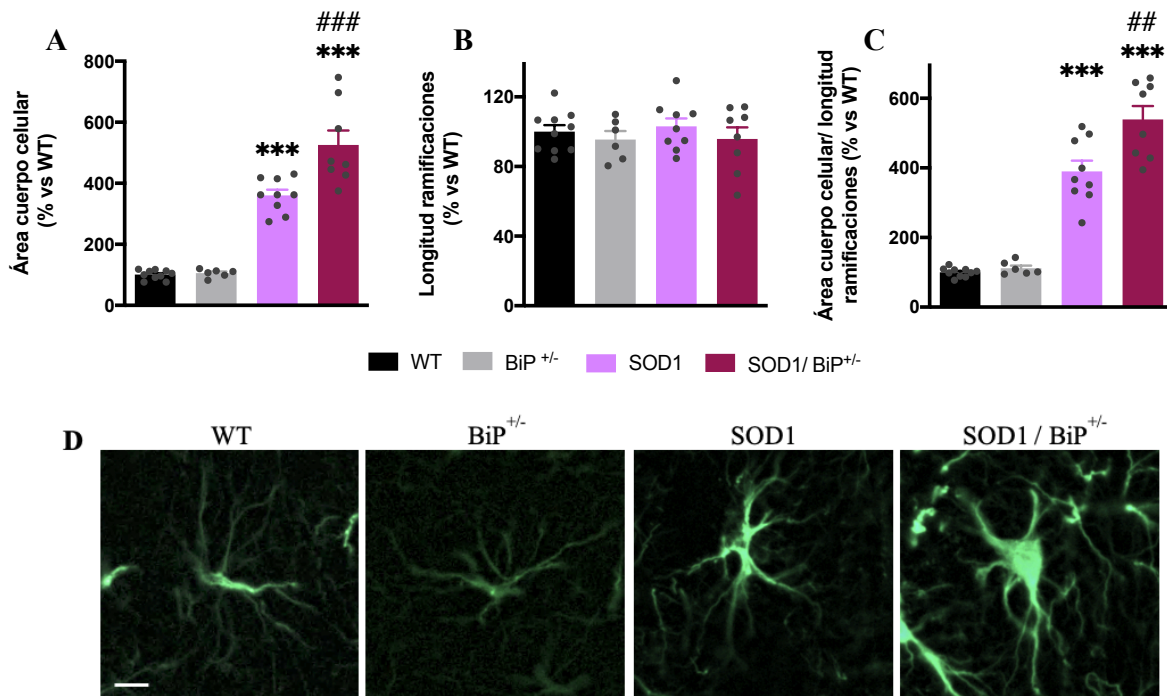


Figura 40: Estudio de la morfología de las células positivas para GFAP. Cuantificación de parámetros morfológicos (área del cuerpo celular (A), longitud de las ramificaciones (B) y su relación (C)), incluyendo imágenes representativas (D; escala = 25 μ m), en el asta ventral de la médula espinal de ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype* con presencia normal o ausencia parcial de la proteína BiP. Los valores representan la media \pm SEM de 5-7 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba post-hoc de Tukey (** p < 0.005 vs. ratones WT y BiP^{+/-}; ## p < 0.01, ### p < 0.005 vs. ratones SOD1).

3.4. Análisis bioquímicos en el asta ventral de la médula espinal.

Como ya se ha comentado previamente, BiP se ha descrito recientemente como un nuevo interactivo y modulador de CB₁, específicamente en neuronas gabaérgicas donde bloquea la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR al acoplarse con proteínas Gα/q11 (Costas-Insua et al., 2021). Basándonos en estos hallazgos previos, decidimos analizar los posibles efectos de la delección de BiP sobre la expresión génica y los niveles de la proteína del receptor CB₁. No se detectaron diferencias en los niveles de expresión de ARNm de este receptor entre los grupos experimentales (Figura 41C). Sin embargo, aunque en el análisis de los niveles de proteína no se observaron diferencias en los niveles de expresión de CB₁ en los animales SOD1^{G93A} con respecto a los grupos control, los animales SOD1^{G93A}- BiP^{+/-} sí que presentaron una disminución del receptor CB₁ en comparación con los ratones *wildtype* (Figura 41A, 41B).

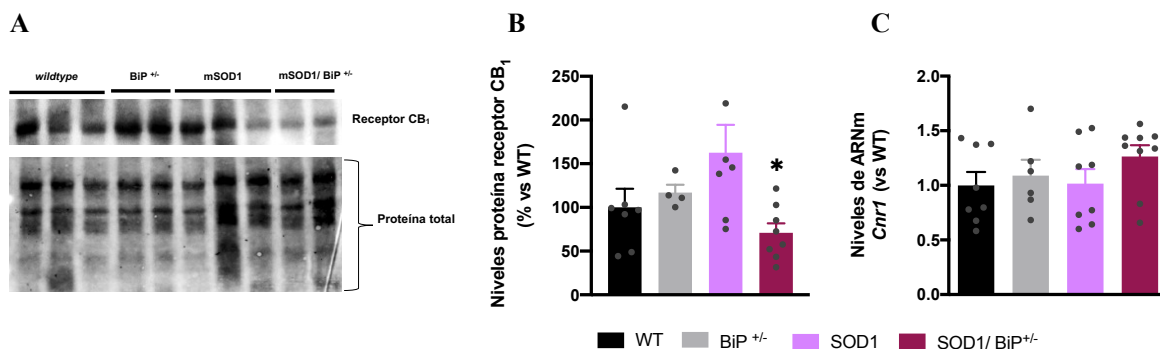


Figura 41: Análisis de los niveles de ARNm y proteína del receptor CB₁ tras la ablación parcial de BiP en el modelo de SOD1. Niveles de proteína del receptor CB₁ (B) e imagen representativa (A); y niveles de expresión de ARN mensajero (C) en la médula espinal de ratones macho transgénicos SOD1^{G93A} y *wildtype* con presencia normal o ausencia parcial de la proteína BiP. Los valores representan la media ± SEM de 5-7 animales por grupo experimental. Los datos fueron evaluados mediante análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey (* p < 0.05 vs. ratones SOD1).

En resumen, nuestros resultados revelan que la delección parcial de BiP conlleva un agravamiento a nivel comportamental en nuestro modelo animal, evidenciado por un aumento en la puntuación de la escala patológica y un peor desempeño motor. Este empeoramiento va acompañado además con una disminución en la supervivencia de estos animales. A nivel histológico, observamos, además, mayor neuroinflamación tanto de microglía como de astrocitos, pero, además, que el fenotipo predominante en el caso del doble mutante es un fenotipo de tipo activado de la microglía y los astrocitos, sin cambios en la supervivencia neuronal.



DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas, cuya prevalencia aumenta cada vez más debido al envejecimiento de la población global, representan actualmente un desafío creciente en la medicina. A pesar de los esfuerzos realizados en su investigación, la disponibilidad de terapias efectivas para estas enfermedades sigue siendo limitada. En particular, la ELA destaca por ser una enfermedad agresiva, con una esperanza de vida corta y carente de tratamientos eficaces, lo que en conjunto, resulta en una muerte temprana de los pacientes. La limitada eficacia de los tratamientos disponibles se debe, en parte, a la falta de enfoques terapéuticos multidiana que puedan abordar de manera integral los mecanismos patogénicos implicados en la enfermedad, tales como el estrés oxidativo, la agregación proteica y la excitotoxicidad, entre otros. En respuesta a esta necesidad urgente de fármacos, una parte de la investigación se ha enfocado en la modulación del SEC como una potencial estrategia terapéutica para esta enfermedad, ya que se sabe que este sistema está implicado en la regulación de varios de los procesos patológicos implicados en las enfermedades neurodegenerativas, y concretamente, en la ELA. Por lo tanto, explorar este sistema y desarrollar terapias que lo modulen podría ofrecer una vía prometedora para el tratamiento de la ELA.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral, como objetivo general se ha explorado el papel de algunos de los principales elementos del SEC (la enzima FAAH así como los receptores CB₂ y CB₁) en el desarrollo y progresión de la ELA, así como el potencial terapéutico de su modulación farmacológica en el tratamiento de esta enfermedad. Para ello, hemos llevado a cabo varias estrategias. En primer lugar, evaluamos el posible efecto beneficioso de la inhibición de la enzima FAAH, que está implicada en la degradación de los endocannabinoides, principalmente de la AEA, en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T}. A continuación, profundizamos en el papel de la activación de los receptores CB₂ en el modelo murino SOD1^{G93A}, concretamente explorando la implicación de la activación de este tipo de receptores en tejidos periféricos de especial relevancia para la ELA, como es el músculo esquelético. Finalmente, analizamos el efecto de la delección parcial de un nuevo interactor del receptor CB₁, la proteína BiP, sobre el desarrollo y progresión de la enfermedad en el modelo murino SOD1^{G93A}.

Partiendo de que investigaciones previas, incluidas las realizadas por nuestro grupo, han identificado que el SEC desempeña un papel crucial en la modulación de la neuroinflamación, la neuroprotección y otros procesos patológicos clave en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington y la ELA, existe un argumento sólido para investigar más a fondo el papel del SEC en esta última enfermedad.

En la ELA, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, se han observado alteraciones en los distintos componentes del SEC. Algunos de estos cambios se ha demostrado que corresponde a respuestas adaptativas del organismo destinadas a protegerse contra la progresión de la enfermedad. Sin embargo, también se ha sugerido que ciertos cambios en los

elementos del SEC podrían no reflejar una reacción protectora, sino desempeñar un papel activo en el desarrollo y avance de la enfermedad (Fernández-Ruiz et al., 2010).

Entre los cambios adaptativos en el SEC que parecen ejercer un efecto protector, se han identificado varias modificaciones significativas en modelos murinos de ELA. En el modelo murino de ELA más utilizado, $SOD1^{G93A}$, entre los cambios observados, se ha detectado un aumento en los niveles de los endocannabinoides 2-AG y AEA en la médula espinal en etapas sintomáticas, junto con un aumento en los niveles de la enzima de síntesis NAPE-PLD (Witting et al., 2004; Moreno-Martet et al., 2014). De manera similar, estudios llevados a cabo en el modelo murino $TDP43^{A315T}$ han detectado también una respuesta similar de aumento del tono endocannabinoide evidenciada, en este caso, en una reducción de los niveles de la enzima FAAH en etapas presintomáticas en la médula espinal, junto con un aumento de los niveles del endocannabinoide 2-AG y AEA (Espejo-Porras et al., 2015). El aumento del tono endocannabinoide supone una respuesta protectora ya que los endocannabinoides permiten la activación de vías antiinflamatorias, respuestas antiexcitotóxicas, disminuyen el estrés oxidativo e inhiben la autofagia. Al fomentar la activación de estas vías protectoras, los endocannabinoides disminuyen el daño neuronal y la consiguiente muerte de las neuronas. Aunque estas respuestas endógenas no son suficientes para detener completamente la progresión de la enfermedad, muchos investigadores han propuesto estrategias basadas en sostener estos efectos observados en diferentes momentos de la progresión de la enfermedad como una potencial terapia. Para lograrlo, se pueden emplear distintas estrategias, siendo una de las opciones la inhibición farmacológica mediante el uso de inhibidores de las enzimas de degradación de los endocannabinoides, tanto la enzima FAAH como MAGL. Además, para profundizar en los efectos del aumento sostenido del tono endocannabinoide, algunas investigaciones en esta y otras enfermedades han recurrido también a la ablación genética de estas enzimas de degradación de endocannabinoides.

Estudios previos en ratones C57BL/6J han demostrado que tanto la delección genética (Cravatt et al., 2001) como la inhibición farmacológica (Piomelli et al., 2006; Giacobazzo et al., 2019) de la enzima FAAH aumentan significativamente los niveles de AEA. De manera similar, la delección genética o la inhibición farmacológica de la MAGL han demostrado elevar los niveles de 2-AG en ratones C57BL/6J (Schlosburg et al., 2010; Pasquarelli et al., 2015) y en el modelo murino de ELA $SOD1^{G93A}$ de bajas copias. Por tanto, se puede anticipar que, al aplicar estas estrategias en diferentes modelos de ELA, se produzca también un incremento en el tono endocannabinoide que podrá ejercer un efecto neuroprotector frente a la enfermedad. De hecho, los estudios realizados hasta ahora dirigidos a la inhibición genética o farmacológica de las enzimas de degradación en modelos de ELA han confirmado estos efectos neuroprotectores en la enfermedad. Por ejemplo, la delección genética del gen *FAAH* en el modelo murino $SOD1^{G93A}$ para aumentar los niveles de endocannabinoides, demostró aumentar la supervivencia de las motoneuronas, preservar las unidades motoras y la fuerza muscular en una etapa sintomática temprana (Bilslund et al., 2006). Además, la inhibición de la MAGL en este modelo murino $SOD1^{G93A}$ produjo un aumento de los

niveles de 2-AG, lo cual retrasó el inicio de los síntomas y aumentó el rendimiento motor y la supervivencia de los animales (Pasquarelli et al., 2017). En definitiva, estos experimentos demuestran el efecto beneficioso de inhibir las enzimas de degradación MAGL y FAAH como estrategia para el tratamiento de la ELA. No obstante es importante destacar que estos estudios han sido realizados en el modelo de SOD1^{G93A}, modelo que sólo representa un porcentaje pequeño de la totalidad de los pacientes de ELA. Sin embargo, debido a la alta variabilidad interindividual, y la gran variedad de eventos patogénicos descritos, hace necesario confirmar estas terapias en más de un modelo experimental de la enfermedad para poder validar su eficacia y garantizar un éxito mayor en la posible traslación clínica.

Es por esta razón, que en esta Tesis Doctoral nos planteamos investigar el papel de la enzima de degradación FAAH, en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T}, ya que presenta una etiopatología diferente al modelo clásico SOD1^{G93A}. Para ello, en primer lugar, analizamos el efecto de la delección genética del gen FAAH en el modelo TDP43^{A315T}. Con este fin, cruzamos ratones con delección genética total del gen de la enzima FAAH (FAAH^{-/-}) con ratones transgénicos TDP43^{A315T}, para generar ratones dobles mutantes (TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}) sobre los que estudiamos la progresión de la enfermedad. Por otro lado, analizamos el efecto de la administración del inhibidor de la FAAH URB597 en el modelo TDP43^{A315T}. URB597 es un inhibidor selectivo de la enzima FAAH con un efecto inhibitorio rápido, evidenciándose la inhibición en menos de 15 minutos, con un efecto que persiste más de 12 horas tras su administración (Piomelli et al., 2006), y que produce un aumento local de los niveles de AEA y otras etanolaminas (Piomelli et al., 2006; Giacobazzo et al., 2019). Desde el punto de vista del tratamiento de los pacientes, la inhibición de la FAAH es más ventajosa en comparación con la administración de agonistas cannabinoideos exógenos, ya que evita los efectos secundarios típicos derivados del uso de agonistas totales o parciales de los receptores CB₁, como la hipolocomoción, hipotermia, analgesia y catalepsia (Piomelli et al., 2006).

Nuestros hallazgos han demostrado, por un lado, que la eliminación genética de la enzima FAAH en los animales transgénicos prolonga su esperanza de vida en comparación con los animales TDP43^{A315T} con expresión normal de la enzima, lo cual podría estar asociado al incremento del tono endocannabinoide en las fases avanzadas de la enfermedad. Otro efecto que hemos observado es que los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} presentan un retraso en la manifestación de las alteraciones neurológicas de los animales, lo cual se evidencia en un retraso en la manifestación de las deficiencias en el test de rotarod. Estos resultados son parcialmente consistentes con lo descrito previamente en el modelo de SOD1^{G93A}, donde la eliminación genética de la enzima FAAH también retrasó la progresión de la enfermedad, evidenciado por un aumento en la fuerza muscular en comparación con los controles SOD1^{G93A} con expresión normal de la enzima. Sin embargo, este efecto no se tradujo en un incremento en la supervivencia de los animales SOD1^{G93A} con ablación de la FAAH (Bilsland et al., 2006). Esta falta de mejora en la supervivencia de los animales SOD1^{G93A} puede justificarse por la naturaleza particularmente agresiva de la progresión de la enfermedad en el modelo SOD1^{G93A}, que puede limitar el impacto de las intervenciones terapéuticas en la

DISCUSIÓN

supervivencia de los animales a pesar de las mejoras en otros parámetros clínicos, como la fuerza muscular. En cuanto a los resultados obtenidos con la administración crónica durante 30 días con el inhibidor URB597 en el modelo TDP43^{A315T}, detectamos que no produjo cambios significativos en la coordinación motora medida mediante el test de rotarod, comparado con los animales tratados con vehículo, a diferencia de lo observado con la deleción genética. Estas diferencias entre las dos aproximaciones de bloqueo pueden justificarse por las diferentes etapas de la enfermedad en las que se realizaron. Así, en el caso del experimento con el inhibidor URB597, el tratamiento se aplicó en etapas presintomáticas o sintomáticamente tempranas (desde el día postnatal 65 al día postnatal 95). En contraste, el estudio de deleción genética de la FAAH evaluó el comportamiento de los animales desde un estadio más temprano y durante toda la progresión de la enfermedad (desde el día postnatal 30 hasta el día postnatal 180). Las diferencias a nivel comportamental en los animales TDP43^{A315T} con respecto a los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} no se manifestaron hasta PN110, tiempo en el que los animales TDP43^{A315T} mostraron un peor desempeño en la prueba, por lo que los resultados no son realmente comparables entre ambas aproximaciones. Por tanto, podemos hipotetizar que, en etapas más avanzadas de la enfermedad, el tratamiento con URB597 produciría una mejora en la coordinación motora. Sin embargo, para poder confirmarlo sería necesario repetir el tratamiento a tiempos más largos para confirmar esta posibilidad.

Las mejoras comportamentales observadas en los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-} posiblemente estén relacionadas con el aumento en la supervivencia de las neuronas motoras de la médula espinal que también observamos en estos animales. Estos resultados son acordes a lo descrito previamente en el modelo murino de ELA SOD1^{G93A}, así como en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson o la DFT, donde la inhibición o la ablación de la enzima FAAH ha mostrado también mejoras a nivel de la fuerza muscular, la función motora o cognitiva, respectivamente, acompañadas de un incremento en la supervivencia neuronal (Bilsland et al., 2006; Escamilla-Ramírez et al., 2017; Viveros-Paredes et al., 2019; Santos-García et al., 2023). Por su parte, la inhibición farmacológica de FAAH con URB597 también incrementó la supervivencia neuronal. No obstante, es importante señalar que la recuperación neuronal con el tratamiento farmacológico fue inferior a la obtenida con la deleción genética de la enzima. Mientras que la deleción genética casi revirtió por completo la muerte neuronal, la inhibición farmacológica solo alcanzó una recuperación del 80% de las motoneuronas. Por lo tanto, la eliminación genética de FAAH parece tener un efecto más pronunciado sobre la supervivencia neuronal.

Dado que previamente se ha demostrado que la deleción genética de *FAAH* conduce a un marcado aumento en los niveles de AEA en ratones *wildtype* (Cravatt et al., 2001) y que la AEA tiene mayor afinidad por los receptores CB₁, una posible explicación para los efectos protectores y el incremento en la supervivencia neuronal observados en nuestro experimento es que se deba a una disminución de la excitotoxicidad mediada por la activación de estos receptores (Marsicano et al., 2003). Considerando que la excitotoxicidad se ha descrito en este y otros modelos de ELA (Warita et al., 2002; Zhang et al., 2016), existen varios estudios a favor de esta hipótesis. Por un lado, se ha

observado que la activación de los receptores CB₁ protege *in vitro* a motoneuronas primarias derivados de médulas espinales de ratones de la excitotoxicidad inducida por kainato, un agonista de los receptores de glutamato que produce citotoxicidad (Abood et al., 2001). Asimismo, se han detectado propiedades citoprotectoras del URB597 en un modelo de rata de epilepsia durante el daño neuronal inducido por kainato (Mikheeva et al., 2017). De hecho, se ha demostrado que el tratamiento con URB597 reduce la apoptosis neuronal *in vivo* en un modelo de isquemia cerebral a través de la activación de los receptores CB₁ (Wang et al., 2021a). Asimismo, el tratamiento con URB597 en un modelo murino de Parkinson inducido por MPTP, previno la muerte neuronal y los déficits motores acompañado de una disminución de recetores NMDA en comparación con los grupos control, sugiriendo que los efectos observados podrían ser parte de un mecanismo antiexcitotóxico mediado por los receptores CB₁ (Escamilla-Ramírez et al., 2017). Además, al igual que lo observado con la delección genética, resultados previos de nuestro laboratorio con el agonista no selectivo de los receptores CB₁ y CB₂ WIN55,212-2 demostraron mejoras en la supervivencia neuronal y el comportamiento motor en el modelo de TDP-43, las cuales fueron mediadas parcialmente por el receptor CB₁ (Espejo-Porras et al., 2019). Esto sugiere también un posible papel importante de este receptor en los efectos beneficiosos observados en este experimento. Sin embargo, cabe destacar que, aunque diversos estudios hayan demostrado un papel relevante de CB₁ en los efectos beneficiosos de los cannabinoides en la ELA, la ablación de este receptor en el modelo murino de SOD1^{G93A}, mejoró la supervivencia de los animales. Estos resultados sugirieron una menor implicación del receptor CB₁ en las mejoras en la progresión de la enfermedad que se obtuvieron con la delección de FAAH en el modelo SOD1^{G93A}, proponiendo un papel más activo de los receptores CB₂ en los efectos neuroprotectores de los endocannabinoides (Bilsland et al., 2006). En esta línea, diversos estudios han destacado la importancia de los receptores CB₂ en la neuroprotección mediada por endocannabinoides en la ELA, ya que su activación ha demostrado mejorar la progresión de la enfermedad en distintos modelos preclínicos (Shoemaker et al., 2007; Espejo-Porras et al., 2019). Por el contrario, la delección del receptor CB₂ aceleró y agravó la progresión de la enfermedad (Rodríguez-Cueto et al., 2021), subrayando su papel en la modulación de los efectos neuroprotectores de los cannabinoides en la ELA. No obstante, para corroborar si los efectos neuroprotectores de nuestro experimentos se pueden atribuir a la activación de receptores CB₁ o CB₂, sería necesario comprobarlo mediante la administración de un antagonistas de estos receptores,

Por otro lado, el análisis de los procesos neuroinflamatorios, indica que tanto la delección genética como la inhibición farmacológica de la enzima FAAH reducen la neuroinflamación, ya que han demostrado reducir los niveles de inmunorreactividad de los marcadores de las dos principales células gliales, Iba1 y/o GFAP, marcadores de microglía y astrocitos, respectivamente, en comparación con los ratones TDP43^{A315T} control. Estos resultados se alinean con investigaciones previas que respaldan la efectividad antiinflamatoria al utilizar inhibidores de la enzima FAAH, como el URB597 en varios modelos experimentales. Por ejemplo, se ha demostrado que la activación indirecta de los receptores cannabinoides con la administración de URB597 en ratas envejecidas

disminuye la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α (Murphy et al., 2012). De manera similar, la inhibición farmacológica de la FAAH redujo también los niveles de GFAP, TNF- α , IL-1 β , COX-2 e iNOS, y la acumulación de ROS en ratas con hipoperfusión cerebral crónica (Su et al., 2017). En este sentido, la menor muerte neuronal observada en nuestros experimentos podría ser consecuencia de esta respuesta antiinflamatoria. Cabe destacar que, en la aproximación genética, el efecto antiinflamatorio observado ha sido mayor sobre la reducción de los niveles del marcador de microglía. Dada la presencia de los receptores CB₂ en este tipo celular y el efecto antiinflamatorio previamente demostrado derivado de su activación en estas células (Komorowska-Müller & Schmöle, 2020), podemos hipotetizar que el posible aumento del tono endocannabinoide generado con la delección de la enzima FAAH podría activar los receptores CB₂, promoviendo una respuesta antiinflamatoria. De hecho, así como la activación de los receptores CB₂ por endocannabinoides ha demostrado modular la polarización de la microglía hacia un fenotipo M2, aumentando la liberación de moléculas antiinflamatorias y reduciendo las citocinas proinflamatorias (Correa et al., 2010; Mecha et al., 2015), la inhibición de la enzima FAAH también ha mostrado un efecto similar. En concreto, en presencia del estímulo tóxico péptido β -amiloide (A β), la inhibición de esta enzima moduló la polarización de las células de microglía BV2 hacia un fenotipo tipo M2, más fagocítico y con menor capacidad de migración, acompañado de una disminución de las citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α y un aumento de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β (Grieco et al., 2021). Un efecto similar se observó en presencia de un estímulo inflamatorio en estas células, donde la inhibición de FAAH o su delección genética disminuyó la expresión de citocinas y enzimas proinflamatorias (Tanaka et al., 2019). De manera similar, en otro estudio utilizando un modelo de neurodegeneración inducida por etanol en ratas, se observó también la inducción de un efecto antiinflamatorio en la microglía tras el tratamiento con URB597, marcado por la disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL6, iNOS y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1, del inglés, *monocyte chemoattractant protein-1*) en las células microgliales del hipocampo (Rivera et al., 2018).

No obstante, la farmacología del SEC es compleja y, si bien a priori los efectos neuroprotectores descritos en nuestros experimentos podrían estar mediados por receptores CB₁ o CB₂, no se descarta la actuación a través de otras vías de señalización por la unión de los cannabinoides a otros receptores no canónicos o por mecanismos independientes de receptor, como se ha demostrado en casos específicos. Por ejemplo, en un estudio realizado por Tanaka y colaboradores, se demostró que en células BV2 estimuladas con LPS en las que se inhibió o silenció la enzima FAAH, se produjeron efectos antiinflamatorios que no se vieron afectados por el antagonismo de los receptores CB₁, CB₂ ni PPAR- γ , lo que sugiere que el efecto antiinflamatorio podría ser mediado por receptores TRPV1 o GPR55 (Tanaka et al., 2019). Aunque, a priori, podríamos presuponer que la disminución de la inmunorreactividad de Iba1 observada en nuestro trabajo se debe a una menor activación de las células de microglía, sería conveniente profundizar en el análisis del estado de activación de estas células por ejemplo mediante un análisis morfológico, la

evaluación de los niveles de citoquinas o estudios de secuenciación de ARN. Esto permitirá caracterizar mejor el efecto de la delección de FAAH en nuestro modelo sobre este tipo celular. Para confirmar si los efectos observados derivan de la activación del receptor CB₂, sería conveniente explorar los efectos del antagonismo del receptor CB₂ *in vitro* y/o *in vivo*.

En contraste con la reducción de inmunorreactividad de Iba1 observada en los ratones TDP-43 con la ablación genética de la enzima FAAH, nuestros hallazgos revelaron niveles similares de este marcador entre los animales transgénicos tratados con vehículo y URB597. Este efecto puede ser atribuido a un mayor metabolismo oxidativo de la anandamida por la vía de la COX-2 puesto que se ha descrito que, en ausencia de la actividad enzimática de FAAH, la AEA es metabolizada mediante la COX-2, generando prostamidas (Weber et al., 2004). Estos metabolitos están implicados en la mediación de respuestas inflamatorias y se ha observado que algunos, como la PGF_{2a}-EA, pueden inducir una respuesta proinflamatoria, que podría explicar la ausencia de efecto del inhibidor sobre los niveles de Iba1 (Gatta et al., 2012; Ligresti et al., 2014). Para evitar estos posibles efectos proinflamatorios, se está investigando para desarrollar inhibidores reversibles de esta enzima, que permiten una regulación más controlada de la actividad de la misma, o inhibidores alostéricos, que permiten una regulación más precisa, disminuyendo así estos efectos secundarios (Faridoon et al., 2023).

Para profundizar en el efecto de la inhibición farmacológica de la enzima FAAH sobre los procesos de neuroinflamación relacionados con la patología que involucran a la microglía, decidimos analizar diversos marcadores genéticos descritos recientemente asociados con un fenotipo de la microglía asociado a enfermedad. Entre los resultados obtenidos, destaca la disminución de los niveles del marcador homeostático *P2RY12* en los animales transgénicos TDP43^{A315T}, similar a lo descrito en el modelo murino SOD1^{G93A} (Keren-Shaul et al., 2017), así como el aumento de los niveles de *CLEC7A*, implicado en vías de fagocitosis, observado también en modelo reversible de TDP43h neuronal suprimible con doxiciclina. Estos cambios sugieren que la microglía presenta un fenotipo tipo DAM en nuestro modelo murino TDP43^{A315T}, caracterizado por una menor movilidad, una reducción en sus funciones de vigilancia y una mayor capacidad fagocítica. En cuanto al efecto del tratamiento con el inhibidor URB597, este compuesto aumentó los niveles del marcador *P2RY12* en los ratones transgénicos, revirtiendo parcialmente el fenotipo DAM observado en los ratones tratados con vehículo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el análisis de la expresión de estos genes se realizó en el conjunto de la médula espinal, es decir, no se realizaron experimentos de secuenciación de ARN de célula única, por lo que los resultados pueden reflejar la contribución de otras células en estos marcadores, potencialmente enmascarando un efecto mayor. Por tanto, son necesarios estudios adicionales ya sea *in vitro* o *in vivo* para poder comprender el impacto de este tipo de tratamientos en la microglía.

Por otro lado, los efectos observados sobre la inmunorreactividad de GFAP en ausencia de la enzima FAAH son más discretos. No obstante, podemos observar una reducción de un nivel de

significancia estadística de los niveles de este marcador en el caso de los animales TDP43^{A315T}-FAAH^{-/-}. De manera similar, en los animales transgénicos tratados con URB597 también se observó una pérdida de la inmunorreactividad de GFAP marcada por una reducción de dos niveles de significancia estadística en comparación con los animales tratados con vehículo. Este descenso en los procesos de astrogliosis observados en el tratamiento con URB597 estarían en línea con datos descritos previamente donde la AEA, el principal compuesto degradado por la FAAH, demostró ser capaz de reducir moléculas proinflamatorias como NO (Molina-Holgado et al., 1997) y TNF α y aumentar los niveles de moléculas antiinflamatorias como IL-6 (Molina-Holgado et al., 1998) en astrocitos primarios en cultivo, en presencia de estímulos como el LPS. Además, el tratamiento conjunto con AEA y CP-55940, un análogo sintético del Δ^9 -THC, de cultivos primarios de astrocitos previamente estimulados con LPS disminuyó los niveles de NO e inhibió la NOS de manera dependiente de CB₁ y CB₂ (Molina-Holgado et al., 2002). Otro estudio realizado con un inhibidor de la captación de AEA también mostró efectos antiinflamatorios en cultivos primarios de astrocitos mediados también en parte por estos receptores (Ortega-Gutiérrez et al., 2005). De acuerdo con estos resultados, y dada la mayor afinidad de la AEA por el receptor CB₁, así como la implicación de los receptores CB₂ en los procesos neuroinflamatorios, podríamos hipotetizar que los efectos observados en nuestro estudio son mediados por estos dos receptores, sin descartar, como se ha mencionado anteriormente, que podamos tener efectos a otros niveles. De hecho, los efectos antiinflamatorios derivados de la administración de AEA observados por Ortega-Gutiérrez y colaboradores no se bloqueaban completamente con la administración de antagonistas CB₁ y CB₂, sugiriendo la acción de otros mecanismos en las respuestas observadas. En este sentido, cabe destacar que, la delección de la FAAH en ratones C57 *wildtype* produjo un aumento también de las etanolaminas PEA y OEA, a niveles similares a los observados en la AEA (Cravatt et al., 2001). De hecho, el tratamiento agudo con AEA, PEA y OEA de astrocitos *wildtype* estimulados con A β produjo una respuesta antiinflamatoria de los astrocitos (Benito et al., 2012). Estas moléculas pueden ejercer acciones neuroprotectoras a través de su unión a receptores PPAR α cerebrales, TRPV1 y GPR55 (Hansen, 2010; Scherma et al., 2019; Cristino et al., 2020), que podrían ser también responsables de los efectos neuroprotectores observados en nuestro experimento. De hecho, se observó que la PEA disminuyó la inflamación en astrocitos primarios de rata expuestos a A β a través de receptores PPAR α (Scuderi et al., 2011), lo que aumentó la supervivencia de neuronas primarias en cocultivo con estos astrocitos primarios (Scuderi et al., 2012). Por tanto, como siguientes pasos en nuestros estudios, sería importante poder estudiar los cambios en los niveles de endocannabinoides, obtenidos como resultados de la inhibición de FAAH, para entender mejor los mecanismos implicados en nuestros experimentos en el modelo murino de ELA TDP43^{A315T}.

Sin embargo, es importante mencionar que nuestros resultados, así como los resultados previos descritos, son contrarios a los observados en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Alzheimer, donde la exposición a A β de astrocitos primarios de ratones con delección genética de la enzima FAAH desencadenó un fenotipo proinflamatorio marcado por una mayor expresión de COX-2, NOS

inducible y TNF- α , en comparación con la respuesta a A β en astrocitos primarios de ratones *wildtype*. Esta respuesta proinflamatoria no fue debida a la activación de receptores CB₁ ni CB₂, si no a un descenso en la activación de receptores PPAR- α , PPAR- γ , que limitó su capacidad antiinflamatoria, y a un aumento de la activación de los receptores TRPV1, responsables de mediar estos efectos perjudiciales (Benito et al., 2012).

En resumen, nuestros resultados demuestran que inhibir farmacológica o genéticamente la FAAH tiene un efecto neuroprotector y antiinflamatorio en el modelo TDP43^{A315T} y es una potencial diana selectiva para tratamiento de la ELA. Nuestros datos muestran que la delección genética de FAAH produce un mayor efecto neuroprotector con respecto a la inhibición farmacológica de la enzima, considerando el momento en que se inicia el tratamiento. Este hallazgo es consistente con estudios previos que mostraron en un modelo murino de Alzheimer que la inhibición farmacológica de FAAH tuvo efectos menores en la reducción de los procesos inflamatorios, la deposición de placas y las alteraciones cognitivas, con respecto a la delección genética de FAAH (Vázquez et al., 2015). Una posible explicación para estas diferencias radica en la naturaleza de las estrategias empleadas. Así, en el caso de la inhibición farmacológica, estaríamos aumentando esta respuesta neuroprotectora de incremento del tono endocannabinoide de manera local en los sitios afectados por la enfermedad y únicamente durante el tratamiento. En contraste, la delección genética de la FAAH provocaría un aumento de los niveles de endocannabinoides desde el desarrollo, es decir, a largo plazo, produciendo cambios más generalizados y crónicos, así como a una mayor cantidad de cambios adaptativos. Por lo tanto, es más probable que la ablación genética de la enzima conduzca a adaptaciones biológicas a lo largo del tiempo, afectando el desarrollo neuronal, la plasticidad y la homeostasis metabólica, y que estas produzcan efectos neuroprotectores mayores; siendo estos cambios especialmente relevantes en las células microgliales.

Por otro lado, en un segundo objetivo de esta Tesis Doctoral, teniendo en cuenta la amplia experiencia de nuestro grupo en el estudio del receptor CB₂ y el conocimiento existente sobre su relevancia en la progresión de la ELA, decidimos profundizar en su estudio, centrándonos en su papel en los tejidos periféricos. En la ELA, se ha observado un incremento en la expresión del receptor CB₂ desde etapas tempranas en los tejidos afectados, tanto médula como corteza motora, en muestras *post mortem* de pacientes (Yiangou et al., 2006; Espejo-Porras et al., 2018) y en varios modelos preclínicos (Shoemaker et al., 2007; Moreno-Martet et al., 2014; Espejo-Porras et al., 2015; Fernández-Trapero et al., 2017; Espejo-Porras et al., 2019), lo que sugiere su implicación en una respuesta neuroprotectora contra los daños citotóxicos asociados con la patología.

La modulación farmacológica del receptor CB₂ ha emergido como una potencial diana en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias, en parte porque su falta de acción psicoactiva lo convierte en un objetivo terapéutico más seguro que los agonistas del receptor CB₁. Su capacidad neuroprotectora se debe a su localización en células clave en el SNC, como microglía, oligodendrocitos, células progenitoras neurales, células de la BHE y, en

condiciones patológicas, en astrocitos, lo que le permite modular funciones específicas de estas células. Por ejemplo, en células progenitoras neurales, fomenta la proliferación y diferenciación de estos precursores, en los oligodendrocitos y sus precursores naturales, influyen en su supervivencia, proliferación y diferenciación, en la BHE, mantienen las uniones estrechas disminuyendo su permeabilidad e impidiendo la infiltración de leucocitos al SNC; en la microglía preserva la integridad y la función celular; y en los astrocitos, promueve su papel trófico, estimula la producción de neurotrofinas y factores de supervivencia celular, e inhibe la producción de quimiocinas reduciendo el daño neuronal y favoreciendo la neuroprotección (Navarro et al., 2016). Una parte importante de los mecanismos protectores del receptor CB₂ se debe a su presencia en las células gliales. En estas células, en respuesta a estímulos patológicos que conllevan neuroinflamación, como los presentes en enfermedades neurodegenerativas, los niveles del receptor CB₂ aumentan rápidamente promoviendo respuestas neuroinflamatorias. De hecho, en el contexto de la ELA, el aumento del receptor CB₂ se ha identificado específicamente y en células microgliales reactivas de muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Yiangou et al., 2006) y de ratones transgénicos TDP43^{A315T} (Espejo-Porras et al., 2019) Además, aunque la expresión del receptor CB₂ en astrocitos es un tema en debate, nuestro grupo ha identificado también un aumento de este receptor en astrocitos reactivos en muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Espejo-Porras et al., 2018), en ratones transgénicos SOD1^{G93A} (Espejo-Porras et al., no publicados) y TDP43^{A315T} (Espejo-Porras et al., 2015, 2019).

En este sentido, se ha observado que la activación de los receptores CB₂ en astrocitos y microglía reduce la producción de factores neurotóxicos como citoquinas proinflamatorias y NO y aumenta la expresión de citocinas antiinflamatorias y factores tróficos; promoviendo fenotipos activados protectores en estas células (Grabon et al., 2023). De hecho, la activación del receptor CB₂ en los modelos murinos de ELA SOD1^{G93A} y TDP43^{A315T} ha demostrado efectos beneficiosos, incluyendo el retraso en la aparición de síntomas motores y un aumento de la esperanza de vida, así como un aumento de la supervivencia neuronal y una disminución de la neuroinflamación (Kim et al., 2006; Shoemaker et al., 2007; Espejo-Porras et al., 2019). Este efecto protector del receptor CB₂ ha sido confirmado también mediante estudios de delección genética y de bloqueo farmacológico del receptor en modelos de ELA, en los cuales la ausencia o bloqueo del receptor CB₂ aceleró la progresión de la enfermedad y redujo la supervivencia de los animales, subrayando así el papel crucial del receptor CB₂ en la patogénesis de esta enfermedad (Rodríguez-Cueto et al., 2021). Tradicionalmente, estos efectos neuroprotectores han sido atribuidos a la activación de los receptores CB₂ expresados en las células gliales del SNC, produciendo, como se ha comentado, un efecto inmunomodulador que indirectamente protege a las neuronas. Sin embargo, también existen evidencias de un efecto directo de la activación de los receptores CB₂ sobre la supervivencia neuronal, ya que se ha descrito la expresión de este receptor en neuronas en situaciones patológicas (Rodríguez-Cueto et al., 2014a; Stempel et al., 2016; Zhang et al., 2017).

A pesar de que en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas el estudio se ha centrado principalmente en el SNC, el receptor CB₂ está expresado en el sistema inmune y otros órganos periféricos, siendo, de hecho, tradicionalmente descrito como el receptor cannabinoide periférico. Entre los tejidos periféricos donde se expresa este receptor, el músculo es de especial relevancia en la ELA, ya que es uno de los tejidos afectados durante la progresión de la enfermedad y, además, una de las teorías sobre el origen de la neurodegeneración en la ELA, la hipótesis de la "muerte retrógrada", defiende que el daño primario en la enfermedad podría tener su origen en este tejido. En este contexto, es importante destacar que el receptor CB₂ desempeña varias funciones en el músculo esquelético que incluyen la regulación del metabolismo energético de ácidos grasos (Zheng et al., 2013) y de la glucosa (Geddo et al., 2021), además de proteger contra el daño oxidativo y facilitar la regeneración muscular (Zhang et al., 2019). Dado que, según la hipótesis de la "muerte retrógrada", se postula que el músculo esquelético podría ser el origen del daño primario en la ELA, comprender la función de los receptores CB₂ en estos tejidos periféricos es interesante para entender los mecanismos subyacentes a los efectos observados en la enfermedad. Por lo tanto, para profundizar en el papel de este receptor en la patología y determinar su potencial como diana terapéutica en la ELA, el objetivo de este estudio fue investigar el papel de los receptores CB₂ periféricos en el efecto neuroprotector previamente observado en la progresión de la ELA. Para poder abordar este problema utilizamos el modelo clásico de ELA SOD1^{G93A}, dado que este modelo es el que mejor reproduce el daño muscular típico de la enfermedad. En este estudio, comparamos el efecto de un agonista del receptor CB₂ que no atraviesa la BHE y que, por lo tanto, se une exclusivamente a los receptores periféricos, con el de un agonista capaz de atravesar la BHE que, por tanto, es capaz de unirse tanto a los receptores CB₂ periféricos como centrales. De esta forma, si los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios descritos anteriormente en varios modelos murinos de ELA con agonistas del receptor son consecuencia únicamente de la activación de los receptores CB₂ del SNC, esperaríamos que no se produjera neuroprotección con el fármaco periférico.

Con esta hipótesis de partida, realizamos el experimento observando, sin embargo, que tanto el tratamiento con el agonista completo como el periféricamente restringido, mostraron efectos similares en las pruebas comportamentales, mejorando en ambos casos la fuerza máxima de agarre y el estado clínico de los ratones en el modelo SOD1^{G93A}. Además, a nivel histológico, ambos compuestos tuvieron un efecto neuroprotector y antiinflamatorio en la médula espinal, reduciendo la muerte neuronal, analizada mediante tinción de Nissl, y disminuyendo la microgliosis, medida como inmunorreactividad del marcador CD68 e Iba1. Sin embargo, mientras que la inmunorreactividad de CD68 disminuyó con ambos agonistas CB₂, el efecto de los fármacos sobre la microgliosis medida como inmunorreactividad de Iba1, únicamente mostró un descenso en los niveles con el agonista que no atraviesa la BHE. Este hallazgo es sorprendente, especialmente si se considera que estudios previos con agonistas del receptor CB₂ sí han demostrado una reducción significativa en la inmunorreactividad de Iba1 (Espejo-Porrás et al., 2019). Una posible explicación para esta discrepancia podría estar relacionada con la potencia del compuesto que hemos utilizado

en este estudio. Aun así, resulta curioso que el agonista periférico, que no atraviesa la BHE, sí que haya mostrado efectos en la disminución de la inmunorreactividad de Iba1. Por otro lado, la diferencia observada en la respuesta de los marcadores microgliales puede atribuirse a las diferencias en su función y localización. Iba1 es una proteína específica de microglía y los macrófagos presente en el citoesqueleto y relacionada con la reorganización celular. Por otro lado, CD68 es una proteína transmembranal presente en lisosomas de monocitos y macrófagos, incluida la microglía activada y parece estar más involucrado en la modulación de la respuesta inmunitaria y la degradación de materiales fagocitados (Korzhevskii & Kirik, 2016). Estos resultados sugieren que el agonista que atraviesa la BHE, aunque no afecta a la estructura o motilidad de la microglía, sí que reduce su actividad fagocítica en el contexto observado.

Por otro lado, aunque la expresión de CB₂ en astrocitos es controvertida, en estudios previos del laboratorio hemos observado un aumento de la expresión de este receptor en astrocitos en el modelo SOD1^{G93A} mediante técnicas de inmunofluorescencia (Fernández-Trapero et al., 2017), (Espejo-Porras, resultados no publicados). Además, la activación de los receptores CB₂ en el modelo de TDP43 mediante el agonista CB₂ selectivo HU-308, disminuyó los niveles de inmunorreactividad de GFAP. Estas evidencias sugieren que los astrocitos en nuestro animales podrían ser sensibles a los tratamientos administrados dirigidos a los receptores CB₂, lo que podría afectar a la astrogliosis. Sin embargo, ninguno de los tratamientos presentó un efecto significativo de reducción de la astrogliosis. No obstante, dado que la sinapsis tripartita, que involucra a las motoneuronas, los astrocitos y la microglía, es un componente clave en la fisiología del SNC, participando en fenómenos como la regulación de la transmisión sináptica, la plasticidad sináptica y la respuesta inflamatoria (Posillico, 2021), la activación de los receptores CB₂ en los astrocitos podría ser responsable indirecto de los efectos detectados sobre la microglía y las motoneuronas con las que interactúan, a pesar de no observarse cambios en el marcador astroglial GFAP (Pathak & Sriram, 2023).

En resumen, los resultados obtenidos revelan que el compuesto periférico, que se presume incapaz de atravesar la BHE, muestra efectos neuroprotectores y similares a los producidos por el agonista que sí la atraviesa. De manera análoga, otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio en el modelo transgénico TDP43^{A315T} también demostraron efectos neuroprotectores tras la activación exclusiva de los receptores CB₂ periféricos (Gonzalo-Consuegra et al, resultados no publicados), lo que confirma el papel neuroprotector de la activación de los receptores CB₂ periféricos en la ELA.

Estos hallazgos se podrían explicar teniendo en cuenta diferentes aspectos dentro del contexto y la etiología de la enfermedad. Por un lado, dado que cada vez se reúnen más evidencias que apoyan la teoría de la muerte retrógrada en la ELA, que propone que el daño inicial ocurre a nivel de la unión neuromuscular y se propaga retrógradamente, y considerando la presencia de los receptores CB₂ en el músculo esquelético, una posible hipótesis es que el efecto neuroprotector se

deriva de la activación de estos receptores en el compartimento muscular que llevarían a una mejora del músculo la cual a su vez produciría una mejora a nivel neuronal. Con el fin de explorar esta hipótesis, decidimos comprobar el efecto de los tratamientos sobre el músculo esquelético y, para ello, analizamos la expresión de varios biomarcadores asociados con la alteración muscular y que se incrementan durante la progresión de la enfermedad en el modelo $SOD1^{G93A}$ (Calvo et al., 2012), implicados en diferenciación y regeneración muscular (*MEF2C* y *COL19A1*), el estrés oxidativo (*GSR*), la endocitosis (*SNX1*) y la modulación de calcio (*CALM1*). Nuestros resultados mostraron que ambos agonistas redujeron los niveles de expresión de los genes *SNX1* y *CALM1*, que estaban elevados en los animales transgénicos vehículo. Sin embargo el agonista Ro-945, capaz de atravesar la BHE, presentó una mayor disminución de los niveles de ARNm de los marcadores *SNX1* y *CALM1*, con respecto al agonista periférico. Por tanto, parece que la combinación de la activación de receptores CB_2 centrales y periféricos tiene un mayor efecto sobre la modulación del calcio, crucial para una contracción muscular adecuada, y la endocitosis, necesaria para la regulación de la captación de moléculas y receptores de membrana dentro de las células musculares. Respecto a los niveles de *GSR* y *COL19A1*, observamos que ambos biomarcadores estaban elevados en los animales transgénicos tratados con vehículo. Sin embargo, ambos agonistas de los receptores CB_2 disminuyeron en un grado similar los niveles de *GSR* y *COL19A1*, marcado por una reducción de la significancia estadística en comparación con los animales tratados con vehículo. Esto demuestra que la activación de los receptores CB_2 periféricos es capaz de preservar el músculo esquelético al disminuir el estrés oxidativo y aumentar la regeneración muscular. Estos resultados son consistentes con lo observado en un estudio previo, donde se demostró en mioblastos *in vitro* que la activación del receptor CB_2 en el músculo esquelético protegía contra el daño oxidativo inducido por H_2O_2 y promovía la regeneración muscular a través de mecanismos antioxidantes (Zhang et al., 2019).

Tras observar que la activación de los receptores CB_2 periféricos tuvo efectos beneficiosos sobre la preservación del músculo, quisimos comprobar si estos efectos también eran extensibles a la preservación de las uniones neuromusculares, para lo que realizamos estudios de inmunofluorescencia en el músculo tibial anterior, debido a su alto porcentaje de fibras IIb, que degeneran tempranamente en la ELA. Nuestros análisis mostraron un aumento en el número de fibras musculares denervadas en los animales transgénicos en comparación con los animales *wildtype*. Además, ambos compuestos consiguieron aumentar la enervación de las fibras musculares con respecto a los animales transgénicos tratados con vehículo, sin diferencias significativas entre los dos agonistas. Por tanto, la activación de los receptores CB_2 periféricos fue capaz de preservar la conexión entre las neuronas motoras y las fibras musculares. Estos resultados sugieren, por tanto, que el efecto protector de la activación de los receptores CB_2 periféricos sobre la unión neuromuscular podría resultar en la reducción del daño neurológico y, por ende, en una disminución de la respuesta inmune a nivel central y la microgliosis observada en la ELA.

Sin embargo, no se debe olvidar el importante papel de los receptores CB_2 en el sistema inmune. Así, una segunda posible hipótesis que contemplamos es que la activación de los

receptores CB₂ presentes en las células del sistema inmune periférico también podría desempeñar un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria en la ELA, siendo esta responsable de los efectos beneficiosos observados. Esto podría ocurrir tanto por la posible infiltración de células inmunes en el SNC como por la acción inmunomoduladora de estas células sobre el músculo esquelético afectado. Por un lado, la observación de infiltración de células periféricas, como linfocitos T, células natural killer y macrófagos, en regiones afectadas del SNC como la médula espinal, destaca el papel creciente que el sistema inmune periférico tiene en la patogénesis de la ELA (Angelini et al., 2020; Garofalo et al., 2022). De hecho, estudios previos en modelos de neuroinflamación han revelado que la activación selectiva de receptores CB₂ disminuye la infiltración de células inmunes periféricas (Rom et al., 2013; Chung et al., 2016) y el daño en la BHE, así como la liberación de citocinas proinflamatorias y quimioquinas (Chung et al., 2016). Por otro lado, existe evidencia de que el sistema inmune está implicado en la regeneración del músculo esquelético, mediante un proceso coordinado que involucra varias etapas. En una primera fase, las células musculares dañadas liberan señales de peligro que atraen rápidamente a los neutrófilos al sitio de la lesión para fagocitar restos celulares. Posteriormente, los monocitos y macrófagos se extravasan a la zona dañada y se diferencian en macrófagos proinflamatorios (M1), que continúan la fagocitosis de células dañadas y liberan citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, promoviendo la proliferación de los mioblastos, las células madre del músculo, evitando su diferenciación prematura. Durante las fases posteriores, los macrófagos cambian su fenotipo de un fenotipo M1, dañino a uno M2, protector, que secreta citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y factores de crecimiento como TGF- β e IGF-1, facilitando la diferenciación de los mioblastos a miocitos (Gehlert & Jacko, 2019). Existen varios estudios que apoyan que la modulación de los receptores CB₂ del sistema inmune periférico pueden ser responsables, al menos en parte, de los efectos neuroprotectores observados tras el tratamiento con el agonista incapaz de atravesar la BHE. Por ejemplo, un estudio determinó que el receptor CB₂ estaba implicado en la regeneración del músculo esquelético tras una lesión por isquemia-reperfusión, en parte mediante la regulación de la polarización de macrófagos infiltrados al músculo lesionado, favoreciendo la transición de un fenotipo M1 a M2, que promueve un entorno antiinflamatorio propicio para la regeneración muscular efectiva (Jiang et al., 2020). Además, se ha observado que la citocina proinflamatoria MCP1 que induce la quimiotaxis hacia los sitios de lesión de monocitos/macrófagos, linfocitos y neutrófilos, desempeña un papel importante en la regeneración axonal y muscular. Así, en ratones SOD1^{G93A} con progresión lenta de la enfermedad, el aumento de los niveles de expresión de MCP1 mediante la inyección intramuscular de un vector scAAV9 con el gen MCP1 promovió una respuesta inmune muscular más temprana, que luego transicionó hacia un estado antiinflamatorio y pro-regenerativo con un incremento de los macrófagos M2 en el músculo. Esto se tradujo en un aumento de la regeneración tisular, una disminución de la atrofia y la preservación de las uniones neuromusculares. Por tanto, dado que la activación de los receptores CB₂ aumenta los niveles de MCP1 (Jbilo et al., 1999), este estudio apoya que los efectos observados en nuestros resultados podrían derivarse del aumento de la respuesta inmune en el tejido muscular inducido por la

activación de los receptores CB₂. Por tanto, es necesario llevar estudios adicionales que permitan dilucidar el mecanismo que subyace a los efectos observados.

No obstante, otra posible hipótesis para explicar los efectos neuroprotectores observados tras el tratamiento con los dos agonistas CB₂ utilizados podría residir en la existencia de una alteración en la BHE, asociada a la patología, que permita la infiltración de monocitos al SNC o el paso del agonista periférico al SNC. Diversos estudios han documentado la ruptura de la BHE en pacientes con ELA (Winkler et al., 2013; Garbuzova-Davis & Sanberg, 2014; Vu & Bowser, 2017). De manera similar, en el modelo SOD1^{G93A} utilizado en este estudio, también se han descrito cambios en la estructura de la BHE, así como la degeneración de células endoteliales y de los astrocitos, junto con la presencia de edema extracelular en el tejido neuronal en etapas sintomáticas tempranas (PN90) y tardías (PN120). Sin embargo, no se han encontrado alteraciones en las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares del modelo SOD1^{G93A} en estos estadios (Garbuzova-Davis, et al., 2007a; Garbuzova-Davis, et al., 2007b). En este sentido, actualmente estamos investigando mediante citometría la presencia de infiltrados en el SNC tras la administración de los agonistas CB₂, para determinar si nuestros resultados pueden atribuirse, al menos en parte, a la infiltración de células inmunes periféricas al SNC. Además, la disrupción de la BHE podría permitir el ingreso del compuesto restringido a la periferia al SNC de modo que ambos compuestos podrían estar ejerciendo sus efectos tanto a nivel central como periférico. Para intentar dar respuesta a esta cuestión, tratamos de manera aguda con los agonistas CB₂ a ratones SOD1^{G93A} de 120 días de edad y analizamos la presencia de los compuestos en el cerebro y la médula mediante LC-MS. Nuestros resultados mostraron que 30 minutos después de la administración, el compuesto periférico se detectó a niveles despreciables en estos tejidos en comparación con el compuesto central, pero en cantidades mucho mayores en plasma. Por tanto, nuestros hallazgos mostraron que el compuesto periférico no estaba presente en el SNC, indicando que no logró atravesar la BHE, lo que demuestra que la activación de receptores CB₂ periféricos es neuroprotectora en nuestro modelo SOD1^{G93A}. No obstante, aún queda por explorar el mecanismo de acción específico en el compartimento periférico que podría estar contribuyendo a la neuroprotección observada en el SNC.

En conclusión, nuestros resultados aun siendo preliminares, respaldan la idea de que la activación de receptores CB₂, tanto a nivel periférico como central, puede producir efectos neuroprotectores y antiinflamatorios a nivel de la médula espinal en modelos de ELA; así como efectos positivos a nivel muscular. En este sentido, para profundizar en el efecto de la activación periférica en el compartimento muscular, sería interesante realizar una administración intramuscular de un agonista CB₂, o bien llevar a cabo un experimento de silenciamiento de CB₂ en este tejido. Estos hallazgos subrayan el potencial terapéutico de la modulación de los receptores CB₂ tanto centrales como periféricos como estrategia para el tratamiento de la ELA, lo que hace a los agonistas CB₂ especialmente relevantes para el desarrollo de estudios clínicos para esta enfermedad.

Como último objetivo de esta tesis, quisimos profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la progresión de la enfermedad y, en concreto, en el papel que pueden tener nuevos interactores del receptor CB₁, recientemente caracterizados. Ya hemos indicado que el SEC presenta modificaciones durante las diferentes fases de progresión de la enfermedad y que, en concreto, se han identificado cambios en diferentes direcciones en los niveles del receptor CB₁. Por un lado, se ha observado una disminución en los niveles del receptor CB₁ en las motoneuronas de la médula espinal de ratones SOD1^{G93A}, detectada mediante inmunohistoquímica (Zhao et al., 2008). Este descenso también se ha corroborado a través de análisis de los niveles de expresión génica del receptor CB₁ en muestras post mortem de médula espinal de pacientes con ELA (Espejo-Porras et al., 2018). Sin embargo, otros estudios que analizaron los niveles de expresión génica no encontraron diferencias en los niveles del receptor CB₁ en la médula espinal en el modelo SOD1^{G93A} (Moreno-Martet et al., 2014) en el modelo murino TDP43^{A315T} (Espejo-Porras et al., 2015), ni en la corteza motora de muestras *post mortem* de pacientes con ELA (Espejo-Porras et al., 2018). No obstante, cabe señalar que la disminución en los niveles de CB₁ podría ser un efecto secundario de la neurodegeneración, asociado a la pérdida de neuronas. Igualmente, la falta de diferencias en los niveles de CB₁ en la médula espinal, a pesar de la muerte neuronal, podría indicar un aumento compensatorio en la expresión de este receptor en motoneuronas supervivientes o en las células gliales. Como ya se ha comentado, la activación del receptor CB₁ en el contexto de la ELA ha demostrado ser beneficiosa. Por ejemplo, se detectó que protege *in vitro* a motoneuronas primarias derivadas de la médula espinal de ratones contra la neurotoxicidad inducida por kainato (Abood et al., 2001). Asimismo, la administración de agonistas cannabinoideos de este receptor, como Δ^9 -THC, CBN o WIN-55,212-2 *in vivo* en el modelo de SOD1^{G93A}, retrasó la sintomatología y aumentó la supervivencia de estos ratones, confirmando el efecto protector de su activación (Raman et al., 2004; Weydt et al., 2005; Bilslund et al., 2006; Shoemaker et al., 2007; Espejo-Porras et al., 2019).

Sin embargo, aunque se ha demostrado que el receptor CB₁ juega un papel importante en la protección neuronal que ofrecen los cannabinoideos, aún no se comprenden completamente los mecanismos específicos detrás de estos efectos. La activación de estos receptores CB₁ puede desencadenar diferentes respuestas celulares en función del contexto celular, en parte por su interacción con diferentes moléculas que modulan su actividad (Oliver et al., 2020). En este sentido, recientemente se ha descrito un nuevo interactor y modulador del receptor CB₁, la proteína chaperona BiP (Costas-Insua et al., 2021). BiP desempeña una función importante en el correcto plegamiento proteico, evitando la agregación proteica, un mecanismo patogénico común a varias enfermedades neurodegenerativas, que produce, entre otros procesos moleculares, estrés del RE. Cuando se activa la respuesta al estrés en el RE, se incrementa la capacidad de plegamiento del RE mediante la regulación al alza de varias chaperonas, como BiP (Matus et al., 2013). De hecho, BiP es una de las proteínas chaperonas de relevancia en la ELA, ya que interaccionan con TDP43 en el núcleo a través del dominio de unión al ARN de TDP43 (François-Moutal et al., 2022). Además, en el modelo SOD1^{G93A}, se demostró que SOD1 mutante se acumula en la médula espinal dentro del RE, donde agrega e interactúa con BiP (Kikuchi et al., 2006).

Cabe destacar que los niveles de expresión de la proteína BiP presentan variaciones tanto en pacientes con ELA como en modelos animales afectados por la enfermedad. Algunos estudios en pacientes han detectado un aumento significativo en los niveles de BiP (François-Moutal et al., 2022; Sasaki, 2010), mientras que en otros no se ha observado esta elevación (Batulan et al., 2003). En modelos animales, los patrones son igualmente diversos. Por ejemplo, en el modelo de ELA en *Drosophila* Hsc70.3^{K97S} que expresa la proteína TDP43^{Q331K} se detectó un aumento notable en los niveles de ARNm del homólogo de BiP (Hsc70.3) (François-Moutal et al., 2022), mientras que en ratones transgénicos SOD1^{G93A}, disminuyó la actividad de esta chaperona (Bruening et al., 1999). Sin embargo, independientemente de los cambios en la expresión de BiP observados, la sobreexpresión de BiP, en modelos animales de la enfermedad ha mostrado resultados beneficiosos reduciendo la presencia de agregados de proteínas mal plegadas con el consiguiente incremento en la supervivencia neuronal y mejora de la función motora (Bruening et al., 1999; Gifondorwa et al., 2007; François-Moutal et al., 2022).

Por tanto, dado el papel de BiP como proteína chaperona en la prevención de la agregación proteica, un proceso patológico importante en la ELA, así como su papel recientemente descrito como interactor y modulador del receptor CB₁, cuya activación ha demostrado ser neuroprotectora en la ELA, decidimos estudiar si BiP, en su interacción con CB₁, tiene algún impacto en la progresión de la ELA. Para ello, empleamos ratones con delección genética parcial del gen BiP (BiP^{+/-}), ya que los ratones con delección total del gen mueren en fase embrionaria. Los ratones BiP^{+/-} se cruzaron con ratones transgénicos SOD1^{G93A} para generar ratones dobles mutantes (SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}) sobre los que analizar la progresión de la patología, en comparación con los animales de control SOD1^{G93A} con expresión normal de BiP.

Nuestros datos revelaron que la eliminación en uno de los alelos del gen de BiP producía un deterioro neurológico mayor y más temprano en los animales SOD1^{G93A}/BiP^{+/-} en comparación con los animales transgénicos con expresión normal de BiP, medido mediante pruebas comportamentales y, en particular, en la prueba del rotarod. Este peor desempeño motor fue acompañado de niveles más altos de reactividad glial tanto en astrocitos como en microglia en los animales dobles mutantes con respecto a los animales SOD1^{G93A} con expresión normal de BiP. Además, el análisis morfológico de estas células gliales reveló que el aumento de la reactividad se debía a la adquisición de un fenotipo glial más activado en el caso de los animales transgénicos con delección parcial de BiP. Es decir, la delección parcial de BiP en nuestro modelo murino SOD1^{G93A} produjo un empeoramiento del fenotipo motor y de la neuroinflamación en nuestro modelo murino de ELA, señalando un papel neuroprotector de la proteína BiP en la progresión de la patología. Existen diversas hipótesis, no necesariamente excluyentes entre sí, para explicar los mecanismos responsables del empeoramiento motor y la mayor neuroinflamación asociados con la delección parcial de BiP.

DISCUSIÓN

Por un lado, puede deberse a una alteración en la interacción y modulación del receptor CB_1 por parte de la proteína BiP. De este modo, la delección parcial del gen BiP podría interferir en la señalización mediada por CB_1 , que como se ha demostrado, presenta una función neuroprotectora en la ELA. Cabe destacar que nuestros resultados no mostraron cambios en la expresión del gen del receptor CB_1 entre los grupos experimentales. Estos hallazgos son consistentes con esta hipótesis pues una alteración en la interacción y modulación del receptor CB_1 por parte de la proteína BiP, afectaría principalmente la señalización de este receptor en lugar de su expresión génica. De hecho, los niveles de proteína del receptor CB_1 eran menores en los mutantes dobles, lo cual puede indicar defectos en la señalización del receptor. Si bien los datos disponibles hasta el momento del papel de BiP en la ELA son escasos, conocemos que la interacción entre el receptor CB_1 y la chaperona BiP se ha documentado en ratones específicamente en las neuronas gabaérgicas, y mediante estudios *in vitro* se ha observado que dicha interacción bloquea la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR al acoplarse con proteínas $G\alpha/q11$; sin afectar a la vía de señalización dependiente del acoplamiento con proteínas Gi/o , responsable de la inhibición retrograda mediada por los cannabinoides (Costas-Insua et al., 2021). La proteína mTOR regula una amplia gama de procesos biológicos, incluida la proliferación celular, el crecimiento, la supervivencia celular y el metabolismo. Pero además mTOR tiene un papel crucial inhibiendo la autofagia (Amin et al., 2020). Por tanto, puede que la interacción de BiP con CB_1 induzca el bloqueo de la señalización PI3K/AKT/mTOR, lo que aumentaría el proceso de autofagia. Esto permitiría la eliminación de proteínas mal plegadas, características de la ELA. Por tanto, los datos que hemos obtenido en nuestro estudio podrían deberse a que la delección de BiP en el modelo $SOD1^{G93A}$ esté incrementando la señalización a través de esta vía, inhibiendo la autofagia y promoviendo la acumulación de proteínas mal plegadas. Estos agregados en las neuronas podrían interrumpir el transporte de las mitocondrias a áreas de necesidad metabólica, lo que resultaría en daño celular y podría desencadenar una respuesta neuroinflamatoria que conduciría a un mayor daño neuronal (Oakes et al., 2017). No obstante, estudios previos en el modelo $SOD1^{G93A}$ de ELA han mostrado un papel beneficioso de la activación de la vía de mTOR sobre los ratones, incluida una disminución de la acumulación de proteína SOD1 en los ratones y un aumento de la supervivencia. Además, cabe destacar que esta interacción de BiP con el receptor CB_1 vía señalización PI3K/AKT/mTOR se ha descrito en cultivos celulares; sin embargo, no se puede descartar que *in vivo* BiP module la activación de CB_1 por señalización diferente, como el acoplamiento a proteínas Gi/o . Por ello, sería necesario para confirmar esta hipótesis realizar estudios complementarios que determinen los niveles de expresión de esta vía de señalización en nuestros animales, así como analizar marcadores de autofagia en los diferentes grupos experimentales. Asimismo, sería útil investigar la presencia de agregados proteicos mediante pruebas de inmunohistoquímica o western blot.

Otra posible hipótesis para explicar el agravamiento de la patología en el modelo doble mutante es que la delección parcial de BiP en los animales transgénicos produzca una alteración de la respuesta UPR en el RE, desencadenando un incremento de agregados en este orgánulo. La mayor activación glial observada en nuestro experimento en los animales $SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}$ es

consistente con estudios previos que indican un importante papel de las células gliales en la respuesta protectora UPR ante el estrés del RE. En este sentido, se observó en una línea glial C6 un aumento de la expresión de BiP ante dos estímulos conocidos que producen estrés del RE: la tunicamicina y el glutamato, lo que indica que la expresión de esta chaperona podría suponer una respuesta neuroprotectora para contrarrestar el estrés del RE. Además, se detectó que la sobreexpresión de BiP en estas células gliales las protegía frente a estos estímulos citotóxicos, aumentando la supervivencia (Suyama et al., 2011). Por tanto, en base a los datos disponibles y teniendo en cuenta nuestros resultados, podríamos deducir que la pérdida parcial de BiP en los ratones $SOD1^{G93A}$ es suficiente para provocar una pérdida de este mecanismo protector, lo que implica, en última instancia, un incremento de la gliosis. Sin embargo, deberíamos confirmar la hipótesis con estudios adicionales que evalúen la respuesta posibles alteraciones en las vías de señalización UPR en los animales $SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}$.

Además, mientras que el estrés del RE crónico en las neuronas desencadena señales de apoptosis, en las células gliales promueve un ambiente proinflamatorio. Curiosamente, se ha observado que la señalización por PERK, un factor de transcripción que se encuentra bajo represión por BiP y que se expresa solo en condiciones de estrés del RE, es necesario para desencadenar la liberación de moléculas proinflamatorias por parte de los astrocitos y subsecuentemente la activación microglial (Sprenkle et al., 2017). Por tanto, la delección parcial de BiP en los animales $SOD1^{G93A}$ podría desencadenar una desregulación de este sistema de señalización, como, por ejemplo, la activación continuada de PERK, incrementando la expresión de moléculas inflamatorias que promovería la activación glial, como se observó en nuestro modelo. No obstante, para validar esta hipótesis sería necesario estudiar la presencia de posibles alteraciones en los niveles de la vía de señalización de PERK. En resumen, una posible explicación es que, durante situaciones estresantes en el RE, la delección parcial de BiP podría bloquear su función protectora en la UPR y simultáneamente promover la producción de citocinas inflamatorias, lo cual podría contribuir al desarrollo de la patología observada en nuestro estudio.

Por otro lado, es importante considerar que BiP también está implicada en la regulación de la homeostasis del calcio. Esta proteína actúa como un captador de calcio de baja afinidad y su actividad se activa únicamente cuando los niveles de calcio disminuyen en el RE. Además, cuando se produce esta depleción de calcio en el RE, BiP se disocia del receptor sigma-1, permitiendo que este se asocie con el receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) y medie la liberación de calcio hacia las mitocondrias para permitir la activación de rutas metabólicas para la producción de energía en la célula (Dudek et al., 2009). Por tanto, la falta de BiP podría llevar a disfunciones en la señalización del calcio, incluida una liberación exacerbada de calcio al citoplasma, produciendo alteraciones en la bioenergética celular, un aumento del estrés oxidativo y excitotoxicidad. Esto contribuiría a la muerte de las neuronas y a incrementar los fenómenos de astrogliosis y microgliosis. Sin embargo, serían necesarios estudios adicionales de análisis de la señalización de calcio intracelular para corroborar esta hipótesis.

Asimismo, cabe destacar que, en nuestro experimento, la mayor gliosis reactiva observada en los ratones $SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}$ no se correlacionó con una mayor pérdida de neuronas motoras en la médula espinal, con respecto a los animales $SOD1^{G93A}$. Es posible que, dada la implicación de la glía en la muerte celular no autónoma, el aumento en la reactividad glial observado en los dobles mutantes en la semana 11, preceda al incremento de la muerte neuronal en estos animales. Es decir, puede que este aumento en la reactividad glial conduzca, en etapas posteriores, a una mayor pérdida neuronal en los ratones $SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}$ con respecto a los ratones $SOD1^{G93A}$ con expresión normal de BiP (Beers et al., 2006; Nagai et al., 2007). Esto podría ocurrir en paralelo con un aumento del deterioro motor en los animales $SOD1^{G93A}/BiP^{+/-}$, con respecto a los ratones $SOD1^{G93A}$. Sin embargo, se requieren estudios adicionales a tiempos más largos para confirmar esta hipótesis.

En conjunto, en este estudio, el primero que ha tratado de relacionar el impacto de BiP en ELA en su relación con CB_1 , hemos determinado que la delección parcial de BiP empeora y adelanta el fenotipo patológico en el modelo $SOD1^{G93A}$. Sin embargo, no podemos discernir con los datos obtenidos, si la progresión más rápida del fenotipo patológico en los ratones con delección parcial de BiP es causada por una alteración en la interacción entre BiP y los receptores CB_1 que desencadene una pérdida de los efectos neuroprotectores mediados por receptores CB_1 . BiP interactúa con varias proteínas celulares, y su disfunción ha sido asociada con la patogénesis de la ELA a través de mecanismos que involucran interacción con otras proteínas. Aún no disponemos de herramientas suficientes para abordar esta cuestión de manera integral *in vivo*. No obstante, los resultados obtenidos pueden servir como base para el diseño de nuevos fármacos, dirigidos no solo al receptor CB_1 , sino también a la modulación de BiP, proponiendo así nuevas estrategias terapéuticas para la ELA. En este sentido, ya se ha identificado una amplia gama de moléculas, tanto de origen natural, como la ampelopsina, como sintético, como la pentoxifilina, que pueden aumentar o disminuir la expresión de GRP78 directamente o a través de mecanismos indirectos que afectan diversas vías celulares. No obstante, todavía se requiere investigación adicional y estudios más completos para esclarecer la implicación real de la interacción de BiP con CB_1 y para desarrollar enfoques terapéuticos efectivos.



**CONCLUSIONES/
CONCLUSIONS**

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

1. La delección de la enzima FAAH retrasa las alteraciones motoras asociadas al fenotipo patológico de los ratones TDP43^{A315T}. Sin embargo, la inhibición farmacológica de esta enzima mediante la administración de URB597 no produce efectos sobre la sintomatología motora en estos ratones en la ventana temporal estudiada.
2. El bloqueo de la enzima FAAH, ya sea mediante delección genética o inhibición farmacológica, es una estrategia eficaz para incrementar la supervivencia neuronal en el modelo murino TDP43^{A315T}. Esta mejora está asociada con una reducción en los procesos neuroinflamatorios, siendo la ablación genética la estrategia más eficaz en la reducción de la microgliosis.
3. La activación exclusiva de los receptores CB₂ periféricos mejora el estado clínico y la fuerza muscular en el modelo clásico de ELA SOD1^{G93A}. Estas mejoras en el fenotipo patológico parecen estar directamente relacionadas con un aumento de la supervivencia de las motoneuronas y una disminución de la neuroinflamación.
4. La activación de los receptores CB₂ periféricos en el modelo SOD1^{G93A} aumenta la inervación de las fibras musculares y restaura parcialmente los defectos en la funcionalidad de la musculatura esquelética, característicos de estos animales.
5. La activación de los receptores CB₂ periféricos en el modelo murino SOD1^{G93A} contribuye al efecto neuroprotector tradicionalmente atribuido a la activación de los receptores CB₂ presentes en el SNC.
6. La delección de BiP en el modelo SOD1^{G93A} tiene un impacto negativo en la progresión de la enfermedad, ya que reduce la supervivencia y empeora el estado clínico y la función motora de los animales. Asimismo, exacerba la reactividad glial y promueve un fenotipo activado de las células gliales.

The conclusions of this Doctoral Thesis are:

1. The deletion of the FAAH enzyme delays the motor impairments associated with the pathological phenotype of TDP43^{A315T} mice. However, pharmacological inhibition of this enzyme through the administration of URB597 does not produce effects on motor symptoms in these mice within the observed time frame.
2. Blocking the FAAH enzyme, whether through genetic deletion or pharmacological inhibition, is an effective strategy to increase neuronal survival in the TDP43^{A315T} mouse model. This improvement is associated with a reduction in neuroinflammatory processes, with genetic ablation being the most effective strategy for reducing microgliosis.
3. The selective activation of peripheral CB₂ receptors improves clinical condition and muscle strength in the classic SOD1^{G93A} ALS model. These improvements in the pathological phenotype appear to be directly related to an increase in motor neuron survival and a reduction in neuroinflammation.
4. Activation of peripheral CB₂ receptors in the SOD1^{G93A} model increases muscle fiber innervation and partially restores the defects in skeletal muscle functionality characteristic of these animals.
5. The activation of peripheral CB₂ receptors in the SOD1^{G93A} mouse model contributes to the neuroprotective effect traditionally attributed to the activation of CB₂ receptors present in the CNS.
6. The deletion of BiP in the SOD1^{G93A} model has a negative impact on disease progression, as it reduces survival and worsens the clinical condition and motor function of the animals. It also exacerbates glial reactivity and promotes an activated glial cell phenotype.



BIBLIOGRAFÍA

A

- Abe K., Itoyama, Y., Sobue, G., Tsuji, S., Aoki, M., Doyu, M., Hamada, C., Kondo, K., Yoneoka, T., Akimoto, M., & Yoshino, H. (2014). Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 15(7-8), 610-617. <https://doi.org/10.3109/21678421.2014.959024>
- Abood, M. E., Rizvi, G., Sallapudi, N., & McAllister, S. D. (2001). Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neuroscience Letters*, 309(3), 197-201. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02065-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02065-1)
- Abramzon, Y. A., Fratta, P., Traynor, B. J., & Chia, R. (2020). The Overlapping Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 42. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00042>
- Ahn, K., Johnson, D. S., & Cravatt, B. F. (2009). Fatty acid amide hydrolase as a potential therapeutic target for the treatment of pain and CNS disorders. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 4(7), 763-784. <https://doi.org/10.1517/17460440903018857>
- Alami, N. O., Schurr, C., Heuvel, F. O., Tang, L., Li, Q., Tasdogan, A., Kimbara, A., Nettekoven, M., Ottaviani, G., Raposo, C., Röver, S., Rogers-Evans, M., Rothenhäusler, B., Ullmer, C., Fingerle, J., Grether, U., Knuesel, I., Boeckers, T. M., Ludolph, A., ... Baumann, B. (2018). NF- κ B activation in astrocytes drives a stage-specific beneficial neuroimmunological response in ALS. *The EMBO Journal*, 37(16). <https://doi.org/10.15252/emj.201798697>
- Alhindi, A., Boehm, I., & Chaytow, H. (2022). Small junction, big problems: Neuromuscular junction pathology in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Journal of Anatomy*, 241(5), 1089-1107. <https://doi.org/10.1111/joa.13463>
- Ali, Z., Godoy-Corchuelo, J. M., Martins-Bach, A. B., Garcia-Toledo, I., Fernández-Beltrán, L. C., Nair, R. R., Spring, S., Nieman, B. J., Jimenez-Coca, I., Bains, R. S., Forrest, H., Lerch, J. P., Miller, K. L., Fisher, E. M. C., Cunningham, T. J., & Corrochano, S. (2023). Mutation in the FUS nuclear localisation signal domain causes neurodevelopmental and systemic metabolic alterations. *Disease Models & Mechanisms*, 16(10), dmm050200. <https://doi.org/10.1242/dmm.050200>
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends in Neurosciences*, 34(2), 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Allen, J., Ramsden, M., & Nisar, S. (2024). Skeletal muscle structure, function and pathology. *Orthopaedics and Trauma*, 38(3), 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.mporth.2024.03.004>
- Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M., & Câmara, J. S. (2020). The synthetic cannabinoids phenomenon: From structure to toxicological properties. A review. *Critical Reviews in Toxicology*, 50(5), 359-382. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1762539>
- Amin, A., Perera, N. D., Beart, P. M., Turner, B. J., & Shabanpoor, F. (2020). Amyotrophic Lateral Sclerosis and Autophagy: Dysfunction and Therapeutic Targeting. *Cells*, 9(11), 2413. <https://doi.org/10.3390/cells9112413>
- Amtmann, D., Weydt, P., Johnson, K. L., Jensen, M. P., & Carter, G. T. (2004). Survey of cannabis use in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *American Journal of Hospice and Palliative Medicine*, 21(2), 95-104. <https://doi.org/10.1177/104990910402100206>
- Anakor, E., Duddy, W. J., & Duguez, S. (2022). The Cellular and Molecular Signature of ALS in Muscle. *Journal of Personalized Medicine*, 12(11), 1868. <https://doi.org/10.3390/jpm12111868>
- Andrews, J. A., Jackson, C. E., Heiman-Patterson, T. D., Bettica, P., Brooks, B. R., & Piro, E. P. (2020). Real-world evidence of riluzole effectiveness in treating amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 21(7-8), 509-518. <https://doi.org/10.1080/21678421.2020.1771734>
- Angelini, D. F., De Angelis, F., Vacca, V., Piras, E., Parisi, C., Nutini, M., Spalloni, A., Pagano, F., Longone, P., Battistini, L., Pavone, F., & Marinelli, S. (2020). Very Early Involvement of Innate Immunity in Peripheral Nerve Degeneration in SOD1-G93A Mice. *Frontiers in Immunology*, 11, 575792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575792>

BIBLIOGRAFÍA

Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), 602-611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.093>

Araque, A., Castillo, P. E., Manzoni, O. J., & Tonini, R. (2017). Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*, 124, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.017>

Armada-Moreira, A., Gomes, J. I., Pina, C. C., Savchak, O. K., Gonçalves-Ribeiro, J., Rei, N., Pinto, S., Morais, T. P., Martins, R. S., Ribeiro, F. F., Sebastião, A. M., Crunelli, V., & Vaz, S. H. (2020). Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 90. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00090>

Arredondo, C., Cefaliello, C., Dyrda, A., Jury, N., Martinez, P., Díaz, I., Amaro, A., Tran, H., Morales, D., Pertusa, M., Stoica, L., Fritz, E., Corvalán, D., Abarzúa, S., Méndez-Ruette, M., Fernández, P., Rojas, F., Kumar, M. S., Aguilar, R., ... van Zundert, B. (2022). Excessive release of inorganic polyphosphate by ALS/FTD astrocytes causes non-cell-autonomous toxicity to motoneurons. *Neuron*, 110(10), 1656-1670.e12. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.02.010>

Arslanbaeva, L., & Bisaglia, M. (2022). Activation of the Nrf2 Pathway as a Therapeutic Strategy for ALS Treatment. *Molecules*, 27(5), 1471. <https://doi.org/10.3390/molecules27051471>

Aso, E., Juvés, S., Maldonado, R., & Ferrer, I. (2013). CB2 cannabinoid receptor agonist ameliorates Alzheimer-like phenotype in A β PP/PS1 mice. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 35(4), 847-858. <https://doi.org/10.3233/JAD-130137>

Assoni, A. F., Fojier, F., & Zatz, M. (2023). Amyotrophic Lateral Sclerosis, FUS and Protein Synthesis Defects. *Stem Cell Reviews and Reports*, 19(3), 625-638. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10489-8>

Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>

B

Badu-Mensah, A., Guo, X., McAleer, C. W., Rumsey, J. W., & Hickman, J. J. (2020). Functional skeletal muscle model derived from SOD1-mutant ALS patient iPSCs recapitulates hallmarks of disease progression. *Scientific Reports*, 10(1), 14302. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70510-3>

Bajaj, S., Zameer, S., Jain, S., Yadav, V., & Vohora, D. (2022). Effect of the MAGL/FAAH Dual Inhibitor JZL-195 on Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease-like Sporadic Dementia in Mice with an Emphasis on A β , HSP-70, Neuroinflammation, and Oxidative Stress. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(7), 920-932. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00699>

Baldwin, K. T., Murai, K. K., & Khakh, B. S. (2023). Astrocyte morphology. *Trends in Cell Biology*, S0962892423002040. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.09.006>

Barker, H. V., Niblock, M., Lee, Y.-B., Shaw, C. E., & Gallo, J.-M. (2017). RNA Misprocessing in C9orf72-Linked Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 195. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00195>

Batulan, Z., Shinder, G. A., Minotti, S., He, B. P., Doroudchi, M. M., Nalbantoglu, J., Strong, M. J., & Durham, H. D. (2003). High threshold for induction of the stress response in motor neurons is associated with failure to activate HSF1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5789-5798. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05789.2003>

Beers, D. R., Henkel, J. S., Xiao, Q., Zhao, W., Wang, J., Yen, A. A., Siklos, L., McKercher, S. R., & Appel, S. H. (2006). Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(43), 16021-16026. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607423103>

Behzadi, A., Pujol-Calderón, F., Tjust, A. E., Wuolikainen, A., Höglund, K., Forsberg, K., Portelius, E., Blennow, K., Zetterberg, H., & Andersen, P. M. (2021). Neurofilaments can differentiate ALS subgroups and ALS from common diagnostic mimics. *Scientific Reports*, 11(1), 22128. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01499-6>

- 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., Mulle, C., Ortega-Gutiérrez, S., Martín-Fontecha, M., Klugmann, M., Guggenhuber, S., Lutz, B., Gertsch, J., Chaoulouff, F., ... Marsicano, G. (2012). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature Neuroscience*, 15(4), 558-564. <https://doi.org/10.1038/nn.3053>
- Benatar, M., Wu, J., Andersen, P. M., Bucelli, R. C., Andrews, J. A., Otto, M., Farahany, N. A., Harrington, E. A., Chen, W., Mitchell, A. A., Ferguson, T., Chew, S., Gedney, L., Oakley, S., Heo, J., Chary, S., Fanning, L., Graham, D., Sun, P., ... Fradette, S. (2022). Design of a Randomized, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial of Tofersen Initiated in Clinically Presymptomatic SOD1 Variant Carriers: The ATLAS Study. *Neurotherapeutics*, 19(4), 1248-1258. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01237-4>
- Benito, C., Núñez, E., Tolón, R. M., Carrier, E. J., Rábano, A., Hillard, C. J., & Romero, J. (2003). Cannabinoid CB₂ receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(35), 11136-11141. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-35-11136.2003>
- Benito, C., Tolón, R. M., Castillo, A. I., Ruiz-Valdepeñas, L., Martínez-Orgado, J. A., Fernández-Sánchez, F. J., Vázquez, C., Cravatt, B. F., & Romero, J. (2012). β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *British Journal of Pharmacology*, 166(4), 1474-1489. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01889.x>
- Benito, C., Tolón, R. M., Pazos, M. R., Núñez, E., Castillo, A. I., & Romero, J. (2008). Cannabinoid CB₂ receptors in human brain inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 277-285. <https://doi.org/10.1038/sj.bjpp.0707505>
- Bensimon, G., Lacomblez, L., & Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 330(9), 585-591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>
- Berdyński, M., Miszta, P., Safranow, K., Andersen, P. M., Morita, M., Filipek, S., Żekanowski, C., & Kuźma-Kozakiewicz, M. (2022). SOD1 mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis analysis of variant severity. *Scientific Reports*, 12(1), 103. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03891-8>
- Bernard-Marissal, N., Moumen, A., Sunyach, C., Pellegrino, C., Dudley, K., Henderson, C. E., Raoul, C., & Pettmann, B. (2012). Reduced Calreticulin Levels Link Endoplasmic Reticulum Stress and Fas-Triggered Cell Death in Motoneurons Vulnerable to ALS. *The Journal of Neuroscience*, 32(14), 4901-4912. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5431-11.2012>
- Berth, S. H., & Lloyd, T. E. (2023). Disruption of axonal transport in neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 133(11), e168554. <https://doi.org/10.1172/JCI168554>
- Bilsland, L. G., Dick, J. R. T., 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 Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(7), 1003-1005. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4743fje>
- Blasco, H., Garçon, G., Patin, F., Veyrat-Durebex, C., Boyer, J., Devos, D., Vourch, P., Andres, C. R., & Corcia, P. (2017). Panel of Oxidative Stress and Inflammatory Biomarkers in ALS: A Pilot Study. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 44(1), 90-95. <https://doi.org/10.1017/cjn.2016.284>
- Blebea, N. M., Pricopie, A. I., Vlad, R.-A., & Hancu, G. (2024). Phytocannabinoids: Exploring Pharmacological Profiles and Their Impact on Therapeutical Use. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4204. <https://doi.org/10.3390/ijms25084204>
- Blokhuis, A. M., Groen, E. J. N., Koppers, M., van den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2013). Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125(6), 777-794. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1125-6>
- Bonifacino, T., Zerbo, R. A., Balbi, M., Torazza, C., Frumento, G., Fedele, E., Bonanno, G., & Milanese, M. (2021). Nearly 30 Years of Animal Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Overview and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12236. <https://doi.org/10.3390/ijms222212236>
- Bradford, D., Stirling, A., Ernault, E., Liosatos, M., Tracy, K., Moseley, J., Blahunka, P., & Smith, M. D. (2017). The MOBILE Study-A Phase IIa Enriched Enrollment Randomized Withdrawal Trial to Assess the Analgesic Efficacy and Safety of ASP8477, a Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor, in Patients with Peripheral Neuropathic Pain. *Pain Medicine (Malden, Mass.)*, 18(12), 2388-2400. <https://doi.org/10.1093/pm/pnx046>

BIBLIOGRAFÍA

- Brailoiu, G. C., Oprea, T. I., Zhao, P., Abood, M. E., & Brailoiu, E. (2011). Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(33), 29166-29174. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217463>
- Brambilla, L., Martorana, F., Guidotti, G., & Rossi, D. (2018). Dysregulation of Astrocytic HMGB1 Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 622. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00622>
- Breevoort, S., Gibson, S., Figueroa, K., Bromberg, M., & Pulst, S. (2022). Expanding Clinical Spectrum of C9ORF72-Related Disorders and Promising Therapeutic Strategies. *Neurology: Genetics*, 8(3), e670. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000670>
- Brettschneider, J., Toledo, J. B., Van Deerlin, V. M., Elman, L., McCluskey, L., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2012). Microglial activation correlates with disease progression and upper motor neuron clinical symptoms in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*, 7(6), e39216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039216>
- 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. *Journal of the Neurological Sciences*, 124 Suppl, 96-107. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(94\)90191-0](https://doi.org/10.1016/0022-510x(94)90191-0)
- Brooks, B. R., Berry, J. D., Ciepielewska, M., Liu, Y., Zambrano, G. S., Zhang, J., & Hagan, M. (2022). Intravenous edaravone treatment in ALS and survival: An exploratory, retrospective, administrative claims analysis. *EClinicalMedicine*, 52, 101590. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101590>
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., Munsat, T. L., & World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases. (2000). El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders: Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 1(5), 293-299. <https://doi.org/10.1080/146608200300079536>
- Brown, C. A., Lally, C., Kupelian, V., & Flanders, W. D. (2021). Estimated Prevalence and Incidence of Amyotrophic Lateral Sclerosis and SOD1 and C9orf72 Genetic Variants. *Neuroepidemiology*, 55(5), 342-353. <https://doi.org/10.1159/000516752>
- Bruening, W., Roy, J., Giasson, B., Figlewicz, D. A., Mushynski, W. E., & Durham, H. D. (1999). Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 72(2), 693-699. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720693.x>
- Bruneteau, G., Bauché, S., Gonzalez de Aguilar, J. L., Brochier, G., Mandjee, N., Tanguy, M.-L., Hussain, G., Behin, A., Khiami, F., Sariali, E., Hell-Remy, C., Salachas, F., Pradat, P.-F., Lacomblez, L., Nicole, S., Fontaine, B., Fardeau, M., Loeffler, J.-P., Meininger, V., ... Hantaï, D. (2015). Endplate denervation correlates with Nogo-A muscle expression in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(4), 362-372. <https://doi.org/10.1002/acn3.179>
- Bruneteau, G., Simonet, T., Bauché, S., Mandjee, N., Malfatti, E., Girard, E., Tanguy, M.-L., Behin, A., Khiami, F., Sariali, E., Hell-Remy, C., Salachas, F., Pradat, P.-F., Fournier, E., Lacomblez, L., Koenig, J., Romero, N. B., Fontaine, B., Meininger, V., ... Hantaï, D. (2013). Muscle histone deacetylase 4 upregulation in amyotrophic lateral sclerosis: Potential role in reinnervation ability and disease progression. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 8), 2359-2368. <https://doi.org/10.1093/brain/awt164>
- Bullock, T. A., Dona, K. N. U. G., Hale, J. F., Morales, P., Jagerovic, N., Andrews, A. M., & Ramirez, S. H. (2023). Activation of CB2R by synthetic CB2R agonist, PM289, improves brain endothelial barrier properties, decreases inflammatory response and enhances endothelial repair. *NeuroImmune Pharmacology and Therapeutics*, 2(4), 387-400. <https://doi.org/10.1515/nipt-2023-0016>
- Burgaz, S., García, C., Gonzalo-Consuegra, C., Gómez-Almería, M., Ruiz-Pino, F., Unciti, J. D., Gómez-Cañas, M., Alcalde, J., Morales, P., Jagerovic, N., Rodríguez-Cueto, C., de Lago, E., Muñoz, E., & Fernández-Ruiz, J. (2021). Preclinical Investigation in Neuroprotective Effects of the GPR55 Ligand VCE-006.1 in Experimental Models of Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecules*, 26(24), 7643. <https://doi.org/10.3390/molecules26247643>
- Butovsky, O., Siddiqui, S., Gabriely, G., Lanser, A. J., Dake, B., Murugaiyan, G., Doykan, C. E., Wu, P. M., Gali, R. R., Iyer, L. K., Lawson, R., Berry, J., Krichevsky, A. M., Cudkovic, M. E., & Weiner, H. L. (2012). Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3063-3087. <https://doi.org/10.1172/JCI62636>

C

Calvo, A. C., Manzano, R., Atencia-Cebreiro, G., Oliván, S., Muñoz, M. J., Zaragoza, P., Cordero-Vázquez, P., Esteban-Pérez, J., García-Redondo, A., & Osta, R. (2012). Genetic biomarkers for ALS disease in transgenic SOD1(G93A) mice. *PLoS One*, 7(3), e32632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032632>

Carriba, P., Ortiz, O., Patkar, K., Justinova, Z., Stroik, J., Themann, A., Müller, C., Woods, A. S., Hope, B. T., Ciruela, F., Casadó, V., Canela, E. I., Lluís, C., Goldberg, S. R., Moratalla, R., Franco, R., & Ferré, S. (2007). Striatal Adenosine A2A and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2249-2259. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301375>

Carvalho, M. D., & Swash, M. (2009). Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis: Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 10(1), 53-57. <https://doi.org/10.1080/17482960802521126>

Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E., & Hashimoto, Y. (2012). Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>

Cavuto, P., McAinch, A. J., Hatzinikolas, G., Janovská, A., Game, P., & Wittert, G. A. (2007). The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(1), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.099>

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. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.12.017>

Chaikin, P. (2017). The Bial 10-2474 Phase 1 Study—A Drug Development Perspective and Recommendations for Future First-in-Human Trials. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 57(6), 690-703. <https://doi.org/10.1002/jcph.889>

Chayasirisobhon, S. (2021). Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *The Permanente Journal*, 25. <https://doi.org/10.7812/TPP/19.200>

Chen, C., Ding, X., Akram, N., Xue, S., & Luo, S.-Z. (2019). Fused in Sarcoma: Properties, Self-Assembly and Correlation with Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8), 1622. <https://doi.org/10.3390/molecules24081622>

Chen, D., Mazala, D. A. G., English, S. A., & Chin, E. R. (2012). BiP deficiency and ER stress in skeletal muscle of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The FASEB Journal*, 26(S1), lb783-lb783. https://doi.org/10.1096/fasebj.26.1_supplement.lb783

Chen, H., Kankel, M. W., Su, S. C., Han, S. W. S., & Ofengeim, D. (2018). Exploring the genetics and non-cell autonomous mechanisms underlying ALS/FTLD. *Cell Death and Differentiation*, 25(4), 646-660. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0060-4>

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. *Molecular Medicine Reports*, 14(3), 2321-2327. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5513>

Chia, R., Tattum, M. H., Jones, S., Collinge, J., Fisher, E. M. C., & Jackson, G. S. (2010). Superoxide Dismutase 1 and tgSOD1G93A Mouse Spinal Cord Seed Fibrils, Suggesting a Propagative Cell Death Mechanism in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 5(5), e10627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010627>

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22), 8257-8262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400988111>

Chicca, A., Marazzi, J., Nicolussi, S., & Gertsch, J. (2012). Evidence for Bidirectional Endocannabinoid Transport across Cell Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34660-34682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373241>

BIBLIOGRAFÍA

- Ching, J. K., Elizabeth, S. V., Ju, J.-S., Lusk, C., Pittman, S. K., & Weihl, C. C. (2013). mTOR dysfunction contributes to vacuolar pathology and weakness in valosin-containing protein associated inclusion body myopathy. *Human Molecular Genetics*, 22(6), 1167-1179. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd524>
- Chiodi, V., Ferrante, A., Ferraro, L., Potenza, R. L., Armida, M., Beggiato, S., Pèzzola, A., Bader, M., Fuxe, K., Popoli, P., & Domenici, M. R. (2016). Striatal adenosine-cannabinoid receptor interactions in rats over-expressing adenosine A2A receptors. *Journal of Neurochemistry*, 136(5), 907-917. <https://doi.org/10.1111/jnc.13421>
- Chiot, A., Zaïdi, S., Iltis, C., Ribon, M., Berriat, F., Schiaffino, L., Jolly, A., de la Grange, P., Mallat, M., Bohl, D., Millecamps, S., Seilhean, D., Lobsiger, C. S., & Boillée, S. (2020). Modifying macrophages at the periphery has the capacity to change microglial reactivity and to extend ALS survival. *Nature Neuroscience*, 23(11), 1339-1351. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00718-z>
- Chitiprolu, M., Jagow, C., Tremblay, V., Bondy-Chorney, E., Paris, G., Savard, A., Palidwor, G., Barry, F. A., Zinman, L., Keith, J., Rogaeva, E., Robertson, J., Lavallée-Adam, M., Woulfe, J., Couture, J.-F., Côté, J., & Gibbins, D. (2018). A complex of CgORF72 and p62 uses arginine methylation to eliminate stress granules by autophagy. *Nature Communications*, 9, 2794. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05273-7>
- Chung, Y. C., Shin, W.-H., Baek, J. Y., Cho, E. J., Baik, H. H., Kim, S. R., Won, S.-Y., & Jin, B. K. (2016). CB2 receptor activation prevents glial-derived neurotoxic mediator production, BBB leakage and peripheral immune cell infiltration and rescues dopamine neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(1), e205. <https://doi.org/10.1038/emm.2015100>
- Cicardi, M. E., Marrone, L., Azzouz, M., & Trotti, D. (2021). Proteostatic imbalance and protein spreading in amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO Journal*, 40(10), e106389. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106389>
- Clark, J. A., Southam, K. A., Blizzard, C. A., King, A. E., & Dickson, T. C. (2016). Axonal degeneration, distal collateral branching and neuromuscular junction architecture alterations occur prior to symptom onset in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 76, 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.03.003>
- Clement, A. B., Hawkins, E. G., Lichtman, A. H., & Cravatt, B. F. (2003). Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(9), 3916-3923. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03916.2003>
- Console-Bram, L., Brailoiu, E., Brailoiu, G. C., Sharir, H., & Abood, M. E. (2014). Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: A tale of biased agonism. *British Journal of Pharmacology*, 171(16), 3908-3917. <https://doi.org/10.1111/bph.12746>
- Correa, F., Hernangómez, M., Mestre, L., Loria, F., Spagnolo, A., Docagne, F., Di Marzo, V., & Guaza, C. (2010). Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: Roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*, 58(2), 135-147. <https://doi.org/10.1002/glia.20907>
- Costa, L., Amaral, C., Teixeira, N., Correia-da-Silva, G., & Fonseca, B. M. (2016). Cannabinoid-induced autophagy: Protective or death role? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 122, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2015.12.006>
- Costas-Insua, C., Moreno, E., Maroto, I. B., Ruiz-Calvo, A., Bajo-Grañeras, R., Martín-Gutiérrez, D., Díez-Alarcia, R., Vilaró, M. T., Cortés, R., García-Font, N., Martín, R., Espina, M., Botta, J., Ginés, S., McCormick, P. J., Sánchez-Prieto, J., Galve-Roperh, I., Mengod, G., Urigüen, L., ... Guzmán, M. (2021). Identification of BiP as a CB1 Receptor-Interacting Protein That Fine-Tunes Cannabinoid Signaling in the Mouse Brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 41(38), 7924-7941. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0821-21.2021>
- Cozzolino, M., Pesaresi, M. G., Amori, I., Crosio, C., Ferri, A., Nencini, M., & Carri, M. T. (2009). Oligomerization of mutant SOD1 in mitochondria of motoneuronal cells drives mitochondrial damage and cell toxicity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), 1547-1558. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2545>
- Cravatt, B. F., Demarest, K., Patricelli, M. P., Bracey, M. H., Giang, D. K., Martin, B. R., & Lichtman, A. H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 9371-9376. <https://doi.org/10.1073/pnas.161191698>
- 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. <https://doi.org/10.1038/384083a0>

Cristino, L., Bisogno, T., & Di Marzo, V. (2020). Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 16(1), 9-29. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0284-z>

Cunha-Oliveira, T., Montezinho, L., Mendes, C., Firuzi, O., Saso, L., Oliveira, P. J., & Silva, F. S. G. (2020). Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Pathophysiology and Opportunities for Pharmacological Intervention. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 5021694. <https://doi.org/10.1155/2020/502169>

D

Da Pozzo, E., Tremolanti, C., Costa, B., Giacomelli, C., Milenkovic, V. M., Bader, S., Wetzel, C. H., Rupprecht, R., Taliani, S., Da Settimo, F., & Martini, C. (2019). Microglial Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Phenotypes Are Modulated by Translocator Protein Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4467. <https://doi.org/10.3390/ijms20184467>

Dadon-Nachum, M., Melamed, E., & Offen, D. (2011). The «dying-back» phenomenon of motor neurons in ALS. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 43(3), 470-477. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9467-1>

de Boer, E. M. J., Orie, V. K., Williams, T., Baker, M. R., De Oliveira, H. M., Polvikoski, T., Silsby, M., Menon, P., van den Bos, M., Halliday, G. M., van den Berg, L. H., Van Den Bosch, L., van Damme, P., Kiernan, M., van Es, M. A., & Vucic, S. (2021). TDP-43 proteinopathies: A new wave of neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 92(1), 86-95. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-322983>

de Carvalho, M., Kiernan, M. C., & Swash, M. (2017). Fasciculation in amyotrophic lateral sclerosis: Origin and pathophysiological relevance. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 88(9), 773-779. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-315574>

De Meij, J., Alfaneq, Z., Morel, L., Decoeur, F., Leyrolle, Q., Picard, K., Carrier, M., Aubert, A., Séré, A., Lucas, C., Laforest, G., Helbling, J.-C., Tremblay, M.-E., Cota, D., Moisan, M.-P., Marsicano, G., Layé, S., & Nadjar, A. (2021). Microglial Cannabinoid Type 1 Receptor Regulates Brain Inflammation in a Sex-Specific Manner. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(6), 488-507. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0170>

De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ligresti, A., Bifulco, M., Melck, D., & Di Marzo, V. (2002). Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 16(4), 297-302. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2002.00094.x>

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A. S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C. G., & Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1479-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>

Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073-1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>

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. R., Karydas, A., Seeley, W. W., Josephs, K. A., Coppola, G., Geschwind, D. H., ... Rademakers, R. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), 245-256. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.011>

Demuth, D. G., & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sciences*, 78(6), 549-563. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.055>

Deng, H., Gao, K., & Jankovic, J. (2014). The role of FUS gene variants in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, 10(6), 337-348. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.78>

Devane, W. A., Dysarz, F. A., Johnson, M. R., Melvin, L. S., & Howlett, A. C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5), 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 (New York, N.Y.)*, 258(5090), 1946-1949. <https://doi.org/10.1126/science.1470919>

BIBLIOGRAFÍA

- Di Giorgio, F. P., Boulting, G. L., Bobrowicz, S., & Eggan, K. C. (2008). Human embryonic stem cell-derived motor neurons are sensitive to the toxic effect of glial cells carrying an ALS-causing mutation. *Cell Stem Cell*, 3(6), 637-648. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.017>
- Ding, Q., Kesavan, K., Lee, K. M., Wimberger, E., Robertson, T., Gill, M., Power, D., Chang, J., Fard, A. T., Mar, J. C., Henderson, R. D., Heggie, S., McCombe, P. A., Jeffree, R. L., Colditz, M. J., Hilliard, M. A., Ng, D. C. H., Steyn, F. J., Phillips, W. D., ... Noakes, P. G. (2022). Impaired signaling for neuromuscular synaptic maintenance is a feature of Motor Neuron Disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01360-5>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10819-10824. <https://doi.org/10.1073/pnas.152334899>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: The devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139(S2), 136-153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Ditsworth, D., Maldonado, M., McAlonis-Downes, M., Sun, S., Seelman, A., Drenner, K., Arnold, E., Ling, S.-C., Pizzo, D., Ravits, J., Cleveland, D. W., & Da Cruz, S. (2017). Mutant TDP-43 within motor neurons drives disease onset but not progression in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 133(6), 907-922. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1698-6>
- Dobrowolny, G., Giacinti, C., Pelosi, L., Nicoletti, C., Winn, N., Barberi, L., Molinaro, M., Rosenthal, N., & Musarò, A. (2005). Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. *The Journal of Cell Biology*, 168(2), 193-199. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407021>
- Dols-Icardo, O., Montal, V., Sirisi, S., López-Pernas, G., Cervera-Carles, L., Querol-Vilaseca, M., Muñoz, L., Belbin, O., Alcolea, D., Molina-Porcel, L., Pegueroles, J., Turón-Sans, J., Blesa, R., Lleó, A., Fortea, J., Rojas-García, R., & Clarimón, J. (2020). Motor cortex transcriptome reveals microglial key events in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(5), e829. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000829>
- Dowie, M. J., Howard, M. L., Nicholson, L. F. B., Faull, R. L. M., Hannan, A. J., & Glass, M. (2010). Behavioural and molecular consequences of chronic cannabinoid treatment in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience*, 170(1), 324-336. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.056>
- D'Souza, D. C., Cortes-Briones, J., Creatura, G., Bluez, G., Thurnauer, H., Deaso, E., Bielen, K., Surti, T., Radhakrishnan, R., Gupta, A., Gupta, S., Cahill, J., Sherif, M. A., Makriyannis, A., Morgan, P. T., Ranganathan, M., & Skosnik, P. D. (2019). Efficacy and safety of a fatty acid amide hydrolase inhibitor (PF-04457845) in the treatment of cannabis withdrawal and dependence in men: A double-blind, placebo-controlled, parallel group, phase 2a single-site randomised controlled trial. *The Lancet. Psychiatry*, 6(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30427-9](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30427-9)
- Du, Y., Zhao, W., Thonhoff, J. R., Wang, J., Wen, S., & Appel, S. H. (2020). Increased activation ability of monocytes from ALS patients. *Experimental Neurology*, 328, 113259. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113259>
- Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., Müller, L., & Zimmermann, R. (2009). Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(9), 1556-1569. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8745-y>
- Dudman, J., & Qi, X. (2020). Stress Granule Dysregulation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 598517. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.598517>
- Duranti, E., & Villa, C. (2022). Molecular Investigations of Protein Aggregation in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 704. <https://doi.org/10.3390/ijms24010704>

E

- Esen, A. (2021). The Dying Forward Hypothesis of ALS: Tracing Its History. *Brain Sciences*, 11(3), 300. <https://doi.org/10.3390/brainsci11030300>

Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 697, 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>

Ellis, J., Pediani, J. D., Canals, M., Milasta, S., & Milligan, G. (2006). Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38812-38824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602494200>

Escamilla-Ramírez, A., García, E., Palencia-Hernández, G., Colín-González, A. L., Galván-Arzate, S., Túnez, I., Sotelo, J., & Santamaría, A. (2017). URB597 and the Cannabinoid WIN55,212-2 Reduce Behavioral and Neurochemical Deficits Induced by MPTP in Mice: Possible Role of Redox Modulation and NMDA Receptors. *Neurotoxicity Research*, 31(4), 532-544. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9698-1>

Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W.-T., Cohen-Salmon, M., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312-325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>

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. *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 19(5-6), 377-386. <https://doi.org/10.1080/21678421.2018.1425454>

Espejo-Porras, F., García-Toscano, L., Rodríguez-Cueto, C., Santos-García, I., de Lago, E., & Fernández-Ruiz, J. (2019). Targeting glial cannabinoid CB2 receptors to delay the progression of the pathological phenotype in TDP-43 (A315T) transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *British Journal of Pharmacology*, 176(10), 1585-1600. <https://doi.org/10.1111/bph.14216>

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. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 10(2), 233-244. <https://doi.org/10.1007/s11481-015-9602-4>

Espina, M., Di Franco, N., Brañas-Navarro, M., Navarro, I. R., Brito, V., Lopez-Molina, L., Costas-Insua, C., Guzmán, M., & Ginés, S. (2023). The GRP78-PERK axis contributes to memory and synaptic impairments in Huntington's disease R6/1 mice. *Neurobiology of Disease*, 184, 106225. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106225>

F

Fang, T., Je, G., Pacut, P., Keyhanian, K., Gao, J., & Ghasemi, M. (2022). Gene Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 11(13), 2066. <https://doi.org/10.3390/cells11132066>

Faridoon, Ng, R., Zhang, G., & Li, J. J. (2023). An update on the discovery and development of reversible covalent inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 32(6), 1039-1062. <https://doi.org/10.1007/s00044-023-03065-3>

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 Letters*, 393(2-3), 231-235. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00891-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00891-5)

Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet (London, England)*, 400(10360), 1363-1380. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01272-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01272-7)

Fernández-Ruiz, J., García, C., Sagredo, O., Gómez-Ruiz, M., & de Lago, E. (2010). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(4), 387-404. <https://doi.org/10.1517/14728221003709792>

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 in Pharmacological Sciences*, 28(1), 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.11.001>

BIBLIOGRAFÍA

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. *Disease Models & Mechanisms*, 10(5), 551-558. <https://doi.org/10.1242/dmm.028373>

Feuillette, S., Delarue, M., Riou, G., Gaffuri, A.-L., Wu, J., Lenkei, Z., Boyer, O., Frébourg, T., Champion, D., & Lecourtis, M. (2017). Neuron-to-Neuron Transfer of FUS in Drosophila Primary Neuronal Culture Is Enhanced by ALS-Associated Mutations. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 62(1), 114-122. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0908-y>

Finn, D. P., Haroutounian, S., Hohmann, A. G., Krane, E., Soliman, N., & Rice, A. S. (2021). Cannabinoids, the endocannabinoid system and pain: A review of preclinical studies. *Pain*, 162(Suppl 1), S5-S25. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002268>

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. *Experimental Neurology*, 185(2), 232-240. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2003.10.004>

Fontana, A., Marin, B., Luna, J., Beghi, E., Logroscino, G., Boumédiene, F., Preux, P.-M., Couratier, P., & Copetti, M. (2021). Time-trend evolution and determinants of sex ratio in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A dose-response meta-analysis. *Journal of Neurology*, 268(8), 2973-2984. <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10464-2>

Forsberg, K., Graffmo, K., Pakkenberg, B., Weber, M., Nielsen, M., Marklund, S., Brännström, T., & Andersen, P. M. (2019). Misfolded SOD1 inclusions in patients with mutations in C9orf72 and other ALS/FTD-associated genes. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(8), 861-869. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-319386>

Franco, G. dos R. R., Smid, S., & Viegas, C. (2021). Phytocannabinoids: General Aspects and Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 19(4), 449-464. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200720172624>

François-Moutal, L., Scott, D. D., Ambrose, A. J., Zerio, C. J., Rodriguez-Sanchez, M., Dissanayake, K., May, D. G., Carlson, J. M., Barbieri, E., Moutal, A., Roux, K. J., Shorter, J., Khanna, R., Barmada, S. J., McGurk, L., & Khanna, M. (2022). Heat shock protein Grp78/BiP/HspA5 binds directly to TDP-43 and mitigates toxicity associated with disease pathology. *Scientific Reports*, 12(1), 8140. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12191-8>

Fujita, K., Kato, T., Yamauchi, M., Ando, M., Honda, M., & Nagata, Y. (1998). Increases in fragmented glial fibrillary acidic protein levels in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochemical Research*, 23(2), 169-174. <https://doi.org/10.1023/a:1022476724381>

G

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. *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 54-61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>

Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1646-1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>

Garbuzova-Davis, S., & Sanberg, P. R. (2014). Blood-CNS Barrier Impairment in ALS patients versus an animal model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 21. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00021>

Garbuzova-Davis, S., Haller, E., Saporta, S., Kolomey, I., Nicosia, S. V., & Sanberg, P. R. (2007). Ultrastructure of blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in SOD1 mice modeling ALS. *Brain Research*, 1157, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.044>

Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Haller, E., Kolomey, I., Bennett, S. P., Potter, H., & Sanberg, P. R. (2007). Evidence of compromised blood-spinal cord barrier in early and late symptomatic SOD1 mice modeling ALS. *PLoS One*, 2(11), e1205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001205>

García, C., Palomo-Garó, C., García-Arencibia, M., Ramos, J., Pertwee, R., & Fernández-Ruiz, J. (2011). Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1495-1506. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01278.x>

- Gargiulo, S., Anzilotti, S., Coda, A. R. D., Gramanzini, M., Greco, A., Panico, M., Vinciguerra, A., Zannetti, A., Vicidomini, C., Dollé, F., Pignataro, G., Quarantelli, M., Annunziato, L., Brunetti, A., Salvatore, M., & Pappatà, S. (2016). Imaging of brain TSPO expression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis with 18F-DPA-714 and micro-PET/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 43(7), 1348-1359. <https://doi.org/10.1007/s00259-016-3311-y>
- Garofalo, S., Cocozza, G., Bernardini, G., Savage, J., Raspa, M., Aronica, E., Tremblay, M.-E., Ransohoff, R. M., Santoni, A., & Limatola, C. (2022). Blocking immune cell infiltration of the central nervous system to tame Neuroinflammation in Amyotrophic lateral sclerosis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 105, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.06.004>
- Gatta, L., Piscitelli, F., Giordano, C., Boccella, S., Lichtman, A., Maione, S., & Di Marzo, V. (2012). Discovery of prostamide F2 α and its role in inflammatory pain and dorsal horn nociceptive neuron hyperexcitability. *PLoS One*, 7(2), e31111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031111>
- Geddo, F., Antoniotti, S., Querio, G., Salaroglio, I. C., Costamagna, C., Riganti, C., & Gallo, M. P. (2021). Plant-Derived Trans- β -Caryophyllene Boosts Glucose Metabolism and ATP Synthesis in Skeletal Muscle Cells through Cannabinoid Type 2 Receptor Stimulation. *Nutrients*, 13(3), 916. <https://doi.org/10.3390/nu13030916>
- Gehlert, S., & Jacko, D. (2019). The role of the immune system in response to muscle damage. *Deutsche Zeitschrift Für Sportmedizin*, 70(10), 242-249. <https://doi.org/10.5960/dzsm.2019.390>
- Gérard, C. M., Mollereau, C., Vassart, G., & Parmentier, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochemical Journal*, 279(Pt 1), 129-134.
- Ghasemi, M., & Brown, R. H. (2018). Genetics of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(5), a024125. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024125>
- Giacovazzo, G., Bisogno, T., Piscitelli, F., Verde, R., Oddi, S., Maccarrone, M., & Coccurello, R. (2019). Different Routes to Inhibit Fatty Acid Amide Hydrolase: Do All Roads Lead to the Same Place? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4503. <https://doi.org/10.3390/ijms20184503>
- Gifondorwa, D. J., Robinson, M. B., Hayes, C. D., Taylor, A. R., Pevette, D. M., Oppenheim, R. W., Caress, J., & Milligan, C. E. (2007). Exogenous Delivery of Heat Shock Protein 70 Increases Lifespan in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 27(48), 13173-13180. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4057-07.2007>
- Gijssels, I., Van Langenhove, T., van der Zee, J., Slegers, K., Philtjens, S., Kleinberger, G., Janssens, J., Bettens, K., Van Cauwenberghe, C., Pereson, S., Engelborghs, S., Sieben, A., De Jonghe, P., Vandenberghe, R., Santens, P., De Bleecker, J., Maes, G., Bäumer, V., Dillen, L., ... Van Broeckhoven, C. (2012). A C9orf72 promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: A gene identification study. *The Lancet. Neurology*, 11(1), 54-65. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70261-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70261-7)
- Godlewski, G., Offertaler, L., Wagner, J. A., & Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides—GPR55 and GPR119. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 89(3-4), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001>
- Gómez-Gálvez, Y., Palomo-Garo, C., Fernández-Ruiz, J., & García, C. (2016). Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 64, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.03.017>
- Gorbatyuk, M. S., & Gorbatyuk, O. S. (2013). The Molecular Chaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review. *Journal of genetic syndrome & gene therapy*, 4(2), 128. <https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000128>
- Gowing, G., Philips, T., Van Wijmeersch, B., Audet, J.-N., Dewil, M., Van Den Bosch, L., Billiau, A. D., Robberecht, W., & Julien, J.-P. (2008). Ablation of proliferating microglia does not affect motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis caused by mutant superoxide dismutase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(41), 10234-10244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3494-08.2008>
- Grabon, W., Rheims, S., Smith, J., Bodennec, J., Belmeguenai, A., & Bezin, L. (2023). CB2 receptor in the CNS: From immune and neuronal modulation to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 150, 105226. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105226>

BIBLIOGRAFÍA

- Grassano, M., Brodini, G., De Marco, G., Casale, F., Fuda, G., Salamone, P., Brunetti, M., Sbaiz, L., Gallone, S., Cugnasco, P., Bombaci, A., Vasta, R., Manera, U., Canosa, A., Moglia, C., Calvo, A., Traynor, B. J., & Chio, A. (2022). Phenotype Analysis of Fused in Sarcoma Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurology: Genetics*, 8(5), e200011. <https://doi.org/10.1212/NXG.000000000200011>
- Gravel, M., Béland, L.-C., Soucy, G., Abdelhamid, E., Rahimian, R., Gravel, C., & Kriz, J. (2016). IL-10 Controls Early Microglial Phenotypes and Disease Onset in ALS Caused by Misfolded Superoxide Dismutase 1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(3), 1031-1048. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0854-15.2016>
- Greenhalgh, A. D., David, S., & Bennett, F. C. (2020). Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(3), 139-152. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0263-9>
- Griebel, G., Stemmelin, J., Lopez-Grancha, M., Fauchey, V., Slowinski, F., Pichat, P., Dargazanli, G., Abouabdellah, A., Cohen, C., & Bergis, O. E. (2018). The selective reversible FAAH inhibitor, SSR411298, restores the development of maladaptive behaviors to acute and chronic stress in rodents. *Scientific Reports*, 8(1), 2416. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20895-z>
- Grieco, M., De Caris, M. G., Maggi, E., Armeli, F., Coccorello, R., Bisogno, T., D'Erme, M., Maccarrone, M., Mancini, P., & Businaro, R. (2021). Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibition Modulates Amyloid-Beta-Induced Microglia Polarization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7711. <https://doi.org/10.3390/ijms22147711>
- Gros-Louis, F., Gaspar, C., & Rouleau, G. A. (2006). Genetics of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1762(11-12), 956-972. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.004>
- Guinart, D., Moreno, E., Galindo, L., Cuenca-Royo, A., Barrera-Conde, M., Pérez, E. J., Fernández-Avilés, C., Correll, C. U., Canela, E. I., Casadó, V., Cordero, A., Pardo, L., de la Torre, R., Pérez, V., & Robledo, P. (2020). Altered Signaling in CB1R-5-HT_{2A}R Heteromers in Olfactory Neuroepithelium Cells of Schizophrenia Patients is Modulated by Cannabis Use. *Schizophrenia Bulletin*, 46(6), 1547-1557. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa038>
- Guindon, J., & Hohmann, A. G. (2009). The endocannabinoid system and pain. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 8(6), 403-421. <https://doi.org/10.2174/187152709789824660>
- Guo, W., Fumagalli, L., Bosch, L. V. D., Guo, W., Fumagalli, L., & Bosch, L. V. D. (2020a). Targeting Axonal Transport: A New Therapeutic Avenue for ALS. In *Amyotrophic Lateral Sclerosis—Recent Advances and Therapeutic Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91963>
- Guo, W., Stoklund Dittlau, K., & Van Den Bosch, L. (2020b). Axonal transport defects and neurodegeneration: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 99, 133-150. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.07.010>
- Gupta, D., Vagha, S., Dhingra, H., & Shirsath, H. (2023). Advances in Understanding and Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): A Comprehensive Review. *Cureus*, 15(11), e48691. <https://doi.org/10.7759/cureus.48691>
- Gurney, M. E., Fleck, T. J., Himes, C. S., & Hall, E. D. (1998). Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 50(1), 62-66. <https://doi.org/10.1212/wnl.50.1.62>
- 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. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5166), 1772-1775. <https://doi.org/10.1126/science.8209258>
- Guttenplan, K. A., Weigel, M. K., Adler, D. I., Couthouis, J., Liddelow, S. A., Gitler, A. D., & Barres, B. A. (2020). Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nature Communications*, 11(1), 3753. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17514-9>
- Guyenet, S. J., Furrer, S. A., Damian, V. M., Baughan, T. D., La Spada, A. R., & Garden, G. A. (2010). A simple composite phenotype scoring system for evaluating mouse models of cerebellar ataxia. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 39, 1787. <https://doi.org/10.3791/1787>

H

- Hansen, H. S. (2010). Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Experimental Neurology*, 224(1), 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.03.022>
- Hanus, L., Breuer, A., Tchilibon, S., Shiloah, S., Goldenberg, D., Horowitz, M., Pertwee, R. G., Ross, R. A., Mechoulam, R., & Fride, E. (1999). HU-308: A specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(25), 14228-14233. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14228>
- Harada, R., Furumoto, S., Kudo, Y., Yanai, K., Villemagne, V. L., & Okamura, N. (2022). Imaging of Reactive Astrogliosis by Positron Emission Tomography. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 807435. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.807435>
- Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chio, A., Corr, E. M., Logroscino, G., Robberecht, W., Shaw, P. J., Simmons, Z., & van den Berg, L. H. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.71>
- Hasbi, A., Madras, B. K., & George, S. R. (2023). Endocannabinoid System and Exogenous Cannabinoids in Depression and Anxiety: A Review. *Brain Sciences*, 13(2), 325. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020325>
- 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 Research*, 1584, 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.013>
- Hayashi, Y., Homma, K., & Ichijo, H. (2016). SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Advances in Biological Regulation*, 60, 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.10.006>
- Hegyí, Z., Oláh, T., Kőszeghy, Á., Piscitelli, F., Holló, K., Pál, B., Csernoch, L., Di Marzo, V., & Antal, M. (2018). CB1 receptor activation induces intracellular Ca²⁺ mobilization and 2-arachidonoylglycerol release in rodent spinal cord astrocytes. *Scientific Reports*, 8(1), 10562. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28763-6>
- Hemerková, P., & Vališ, M. (2021). Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: Antioxidant Metalloenzymes and Therapeutic Strategies. *Biomolecules*, 11(3), 437. <https://doi.org/10.3390/biom11030437>
- Henstridge, C. M., Balenga, N. A. B., Kargl, J., Andradas, C., Brown, A. J., Irving, A., Sanchez, C., & Waldhoer, M. (2011). Minireview: Recent developments in the physiology and pathology of the lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(11), 1835-1848. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1197>
- 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 11(2), 563-583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1359-1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Hillard, C. J., Manna, S., Greenberg, M. J., DiCamelli, R., Ross, R. A., Stevenson, L. A., Murphy, V., Pertwee, R. G., & Campbell, W. B. (1999). Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1427-1433.
- Ho, W.-S. V., Barrett, D. A., & Randall, M. D. (2008). «Entourage» effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 155(6), 837-846. <https://doi.org/10.1038/bjpp.2008.324>
- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., Felder, C. C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B. R., Mechoulam, R., & Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 161-202. <https://doi.org/10.1124/pr.54.2.161>
- Howlett, A. C., Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., & Porrino, L. J. (2004). Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 345-358. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.030>

BIBLIOGRAFÍA

Hoye, M. L., Regan, M. R., Jensen, L. A., Lake, A. M., Reddy, L. V., Vidensky, S., Richard, J.-P., Maragakis, N. J., Rothstein, J. D., Dougherty, J. D., & Miller, T. M. (2018). Motor neuron-derived microRNAs cause astrocyte dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, *141*(9), 2561-2575. <https://doi.org/10.1093/brain/awy182>

Hu, S. S.-J., & Mackie, K. (2015). Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *231*, 59-93. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_3

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., ... Liu, Z.-J. (2016). Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*, *167*(3), 750-762.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.004>

Hunter, M., Spiller, K. J., Dominique, M. A., Xu, H., Hunter, F. W., Fang, T. C., Canter, R. G., Roberts, C. J., Ransohoff, R. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2021). Microglial transcriptome analysis in the rNLS8 mouse model of TDP-43 proteinopathy reveals discrete expression profiles associated with neurodegenerative progression and recovery. *Acta Neuropathologica Communications*, *9*, 140. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01239-x>

I

Ibrahim, M. M., Deng, H., Zvonok, A., Cockayne, D. A., Kwan, J., Mata, H. P., Vanderah, T. W., Lai, J., Porreca, F., Makriyannis, A., & Malan, T. P. (2003). Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(18), 10529-10533. <https://doi.org/10.1073/pnas.1834309100>

Ito, H., Wate, R., Zhang, J., Ohnishi, S., Kaneko, S., Ito, H., Nakano, S., & Kusaka, H. (2008). Treatment with edaravone, initiated at symptom onset, slows motor decline and decreases SOD1 deposition in ALS mice. *Experimental Neurology*, *213*(2), 448-455. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.07.017>

J

Jauregui, C., Blanco-Luquin, I., Macías, M., Roldan, M., Caballero, C., Pagola, I., Mendioroz, M., & Jericó, I. (2023). Exploring the Disease-Associated Microglia State in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomedicines*, *11*(11), 2994. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112994>

Jbilo, O., Derocq, J.-M., Segui, M., Le Fur, G., & Casellas, P. (1999). Stimulation of peripheral cannabinoid receptor CB2 induces MCP-1 and IL-8 gene expression in human promyelocytic cell line HL60. *FEBS Letters*, *448*(2-3), 273-277. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00380-4)

Jia, J., Ma, L., Wu, M., Zhang, L., Zhang, X., Zhai, Q., Jiang, T., Wang, Q., & Xiong, L. (2014). Anandamide protects HT22 cells exposed to hydrogen peroxide by inhibiting CB1 receptor-mediated type 2 NADPH oxidase. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*, 893516. <https://doi.org/10.1155/2014/893516>

Jiang, P., Wang, L., Zhang, M., Zhang, M., Wang, C., Zhao, R., & Guan, D. (2020). Cannabinoid type 2 receptor manipulates skeletal muscle regeneration partly by regulating macrophage M1/M2 polarization in IR injury in mice. *Life Sciences*, *256*, 117989. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117989>

Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., Ioannidou, C., Gómez-Sotres, P., Lopez-Fabuel, I., Resch-Beusher, M., Resel, E., Arnouil, D., Saraswat, D., Varilh, M., Cannich, A., Julio-Kalajzic, F., Bonilla-Del Río, I., Almeida, A., Puente, N., Achicallende, S., ... Marsicano, G. (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature*, *583*(7817), 603-608. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2470-y>

Jo, M., Lee, S., Jeon, Y.-M., Kim, S., Kwon, Y., & Kim, H.-J. (2020). The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: Integrating insights from clinical and experimental studies. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(10), 1652-1662. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00513-7>

Joerger, M., Wilkins, J., Fagagnini, 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 Metabolism Letters*, *6*(2), 102-108.

Johansson, A., Engler, H., Blomquist, G., Scott, B., Wall, A., Aquilonius, S.-M., Långström, B., & Askmark, H. (2007). Evidence for astrocytosis in ALS demonstrated by [¹¹C](L)-deprenyl-D2 PET. *Journal of the Neurological Sciences*, *255*(1-2), 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.01.057>

Jordan, C. J., & Xi, Z.-X. (2019). Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *98*, 208-220. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.026>

Joyce, P. I., Mcgoldrick, P., Saccon, R. A., Weber, W., Fratta, P., West, S. J., Zhu, N., Carter, S., Phatak, V., Stewart, M., Simon, M., Kumar, S., Heise, I., Bros-Facer, V., Dick, J., Corrochano, S., Stanford, M. J., Luong, T. V., Nolan, P. M., ... Acevedo-Arozena, A. (2015). A novel SOD1-ALS mutation separates central and peripheral effects of mutant SOD1 toxicity. *Human Molecular Genetics*, *24*(7), 1883-1897. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu605>

K

Kaczocha, M., Hermann, A., Glaser, S. T., Bojesen, I. N., & Deutsch, D. G. (2006). Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(14), 9066-9075. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509721200>

Kallendrusch, S., Kremzow, S., Nowicki, M., Grabiec, U., Winkelmann, R., Benz, A., Kraft, R., Bechmann, I., Dehghani, F., & Koch, M. (2013). The G protein-coupled receptor 55 ligand l- α -lysophosphatidylinositol exerts microglia-dependent neuroprotection after excitotoxic lesion. *Glia*, *61*(11), 1822-1831. <https://doi.org/10.1002/glia.22560>

Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, *53*(282), 457-481. <https://doi.org/10.2307/2281868>

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, *169*(7), 1276-1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>

Khalfallah, Y., Kuta, R., Grasmuck, C., Prat, A., Durham, H. D., & Vande Velde, C. (2018). TDP-43 regulation of stress granule dynamics in neurodegenerative disease-relevant cell types. *Scientific Reports*, *8*(1), 7551. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25767-0>

Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gatteringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., & Kuhle, J. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews. Neurology*, *14*(10), 577-589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>

Khosropoor, S., Alavi, M. S., Etemad, L., & Roohbakhsh, A. (2023). Cannabidiol goes nuclear: The role of PPAR γ . *Phytomedicine*, *114*, 154771. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154771>

Kikuchi, H., Almer, G., Yamashita, S., Guégan, C., Nagai, M., Xu, Z., Sosunov, A. A., Mckhann, G. M., & Przedborski, S. (2006). Spinal cord endoplasmic reticulum stress associated with a microsomal accumulation of mutant superoxide dismutase-1 in an ALS model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(15), 6025-6030. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509227103>

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. *European Journal of Pharmacology*, *542*(1-3), 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.05.025>

Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Yamada, M., Miyazaki, H., Akagi, T., Hashikawa, T., Doi, H., Takumi, T., Hicks, G. G., Hattori, N., Shimogori, T., & Nukina, N. (2015). FUS/TLS deficiency causes behavioral and pathological abnormalities distinct from amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0202-6>

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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *347*(3), 827-832. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.175>

Komorowska-Müller, J. A., & Schmöle, A.-C. (2020a). CB2 Receptor in Microglia: The Guardian of Self-Control. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 19. <https://doi.org/10.3390/ijms22010019>

BIBLIOGRAFÍA

Kopp, M. C., Larburu, N., Durairaj, V., Adams, C. J., & Ali, M. M. (2019). UPR proteins IRE1 and PERK switch BIP from chaperone to ER stress sensor. *Nature structural & molecular biology*, 26(11), 1053-1062. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0324-9>

Koppers, M., Blokhuis, A. M., Westeneng, H.-J., Terpstra, M. L., Zundel, C. A. C., Vieira de Sá, R., Schellevis, R. D., Waite, A. J., Blake, D. J., Veldink, J. H., van den Berg, L. H., & Pasterkamp, R. J. (2015). Cgorf72 ablation in mice does not cause motor neuron degeneration or motor deficits. *Annals of Neurology*, 78(3), 426-438. <https://doi.org/10.1002/ana.24453>

Korzhevskii, D. E., & Kirik, O. V. (2016). Brain Microglia and Microglial Markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 46(3), 284-290. <https://doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>

Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., Greco, D. J., Smith, S. T., Tweet, G., Humulock, Z., Zrzavy, T., Conde-Sanroman, P., Gacias, M., Weng, Z., Chen, H., ... Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47(3), 566-581.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.008>

Kusaczuk, M. (2019). Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 8(12), 1471. <https://doi.org/10.3390/cells8121471>

Kwon, H. S., & Koh, S.-H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*, 9(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00221-2>

L

Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P. N., Guillet, P., Powe, L., Durrleman, S., Delumeau, J. C., & Meininger, V. (1996). A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology*, 47(6 Suppl 4), S242-250. https://doi.org/10.1212/wnl.47.6_suppl.4.242s

Lacroix, C., Guilhaumou, R., Micallef, J., Bruneteau, G., Desnuelle, C., & Blin, O. (2023). Cannabis for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis: What is the patients' view? *Revue Neurologique*, 179(9), 967-974. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2023.03.018>

Lamanauskas, N., & Nistri, A. (2008). Riluzole blocks persistent Na⁺ and Ca²⁺ currents and modulates release of glutamate via presynaptic NMDA receptors on neonatal rat hypoglossal motoneurons in vitro. *The European Journal of Neuroscience*, 27(10), 2501-2514. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06211.x>

Lambert-Smith, I. A., Saunders, D. N., & Yerbury, J. J. (2022). Proteostasis impairment and ALS. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 174, 3-27. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2022.06.001>

Laprairie, R. B., Bagher, A. M., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 172(20), 4790-4805. <https://doi.org/10.1111/bph.13250>

Laslo, P., Lipski, J., Nicholson, L. F., Miles, G. B., & Funk, G. D. (2001). GluR2 AMPA receptor subunit expression in motoneurons at low and high risk for degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 169(2), 461-471. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7653>

Lastres-Becker, I., de Lago, E., Martínez, A., & Fernández-Ruiz, J. (2022). New Statement about NRF2 in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Biomolecules*, 12(9), 1200. <https://doi.org/10.3390/biom12091200>

Lefebvre-Omar, C., Liu, E., Dalle, C., d'Incamps, B. L., Bigou, S., Daube, C., Karpf, L., Davenne, M., Robil, N., Jost Mousseau, C., Blanchard, S., Tournaire, G., Nicaise, C., Salachas, F., Lacomblez, L., Seilhean, D., Lobsiger, C. S., Millecamps, S., Boillée, S., & Bohl, D. (2023). Neurofilament accumulations in amyotrophic lateral sclerosis patients' motor neurons impair axonal initial segment integrity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(6), 150. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04797-6>

Leonard, B. E., & Aricioglu, F. (2023). Cannabinoids and neuroinflammation: Therapeutic implications. *Journal of Affective Disorders Reports*, 12, 100463. <https://doi.org/10.1016/j.jadr.2023.100463>

- Lepore, A. C., Rauck, B., Dejea, C., Pardo, A. C., Rao, M. S., Rothstein, J. D., & Maragakis, N. J. (2008). Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nature Neuroscience*, *11*(11), 1294-1301. <https://doi.org/10.1038/nn.2210>
- Li, J.-Y., Sun, X.-H., Cai, Z.-Y., Shen, D., Yang, X.-Z., Liu, M.-S., & Cui, L.-Y. (2022). Correlation of weight and body composition with disease progression rate in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Scientific Reports*, *12*, 13292. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16229-9>
- Li, X., Hua, T., Vemuri, K., Ho, J.-H., Wu, Y., Wu, L., Popov, P., Benchama, O., Zvonok, N., Locke, K., Qu, L., Han, G. W., Iyer, M. R., Cinar, R., Coffey, N. J., Wang, J., Wu, M., Katritch, V., Zhao, S., ... Liu, Z.-J. (2019). Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. *Cell*, *176*(3), 459-467.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.011>
- Liao, B., Zhao, W., Beers, D. R., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2012). Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, *237*(1), 147-152. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.011>
- Liddel, 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., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481-487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Ligresti, A., Martos, J., Wang, J., Guida, F., Allarà, M., Palmieri, V., Luongo, L., Woodward, D., & Di Marzo, V. (2014). Prostanoid F(2) α receptor antagonism combined with inhibition of FAAH may block the pro-inflammatory mediators formed following selective FAAH inhibition. *British Journal of Pharmacology*, *171*(6), 1408-1419. <https://doi.org/10.1111/bph.12410>
- Liu, J., & Wang, F. (2017). Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1005. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01005>
- Liu, J.-X., Brännström, T., Andersen, P. M., & Pedrosa-Domelló, F. (2013). Distinct Changes in Synaptic Protein Composition at Neuromuscular Junctions of Extraocular Muscles versus Limb Muscles of ALS Donors. *PLOS ONE*, *8*(2), e57473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057473>
- Loeffler, J., Picchiarelli, G., Dupuis, L., & Gonzalez De Aguilar, J. (2016). The Role of Skeletal Muscle in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Pathology*, *26*(2), 227-236. <https://doi.org/10.1111/bpa.12350>
- López, A., Aparicio, N., Pazos, M. R., Grande, M. T., Barreda-Manso, M. A., Benito-Cuesta, I., Vázquez, C., Amores, M., Ruiz-Pérez, G., García-García, E., Beatka, M., Tolón, R. M., Dittel, B. N., Hillard, C. J., & Romero, J. (2018). Cannabinoid CB2 receptors in the mouse brain: Relevance for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1174-9>
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biological psychiatry. Cognitive neuroscience and neuroimaging*, *6*(6), 607-615. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2020.07.016>
- Lunetta, C., Moglia, C., Lizio, A., Caponnetto, C., Dubbioso, R., Giannini, F., Matà, S., Mazzini, L., Sabatelli, M., Siciliano, G., Simone, I. L., Sorarù, G., Toriello, A., Trojsi, F., Vedovello, M., D'Ovidio, F., Filippi, M., Calvo, A., & EDARAVALS Study Group. (2020). The Italian multicenter experience with edaravone in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology*, *267*(11), 3258-3267. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09993-z>
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., & Lee, A. S. (2006). GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(15), 5688-5697. <https://doi.org/10.1128/MCB.00779-06>
- Lutz, C. (2018). Mouse models of ALS: Past, present and future. *Brain Research*, *1693*(Pt A), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.03.024>

M

Mackenzie, I. R. A., 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.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2007). Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Annals of Neurology*, 61(5), 427-434. <https://doi.org/10.1002/ana.21147>

Mackie, K. (2005). Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 168, 299-325. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_10

Manterola, A., Chara, J. C., Aguado, T., Palazuelos, J., Matute, C., & Mato, S. (2022). Cannabinoid CB1 receptor expression in oligodendrocyte progenitors of the hippocampus revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Frontiers in Neuroanatomy*, 16, 1030060. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.1030060>

Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Mu, Y., Smith, A. M., Cezar, G. G., & Gage, F. H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 3(6), 649-657. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.001>

Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, S. C., Cascio, M. G., Gutiérrez, S. O., van der Stelt, M., López-Rodríguez, M. L., Casanova, E., Schütz, G., Zieglgänsberger, W., Di Marzo, V., Behl, C., & Lutz, B. (2003a). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5642), 84-88. <https://doi.org/10.1126/science.1088208>

Marsicano, G., & Lafenêtre, P. (2009). Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 1, 201-230. https://doi.org/10.1007/978-3-540-88955-7_8

Martinez Naya, N., Kelly, J., Corna, G., Golino, M., Abbate, A., & Toldo, S. (2023). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Cannabidiol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(16), 5980. <https://doi.org/10.3390/molecules28165980>

Martinez-Pinilla, E., Varani, K., Reyes-Resina, I., Angelats, E., Vincenzi, F., Ferreiro-Vera, C., Oyarzabal, J., Canela, E. I., Lanciego, J. L., Nadal, X., Navarro, G., Borea, P. A., & Franco, R. (2017). Binding and Signaling Studies Disclose a Potential Allosteric Site for Cannabidiol in Cannabinoid CB2 Receptors. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 744. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00744>

Masrori, P., & Van Damme, P. (2020). Amyotrophic lateral sclerosis: A clinical review. *European Journal of Neurology*, 27(10), 1918-1929. <https://doi.org/10.1111/ene.14393>

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(6284), 561-564. <https://doi.org/10.1038/346561a0>

Matus, S., Valenzuela, V., Medinas, D. B., & Hetz, C. (2013). ER Dysfunction and Protein Folding Stress in ALS. *International Journal of Cell Biology*, 2013, 674751. <https://doi.org/10.1155/2013/674751>

Mayo, L. M., Asratian, A., Lindé, J., Morena, M., Haataja, R., Hammar, V., Augier, G., Hill, M. N., & Heilig, M. (2020). Elevated Anandamide, Enhanced Recall of Fear Extinction, and Attenuated Stress Responses Following Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase: A Randomized, Controlled Experimental Medicine Trial. *Biological Psychiatry*, 87(6), 538-547. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.07.034>

McAlary, L., Plotkin, S. S., Yerbury, J. J., & Cashman, N. R. (2019). Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 262. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00262>

McCauley, M. E., & Baloh, R. H. (2019). Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathologica*, 137(5), 715-730. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1933-9>

Mead, R. J., Shan, N., Reiser, H. J., Marshall, F., & Shaw, P. J. (2023). Amyotrophic lateral sclerosis: A neurodegenerative disorder poised for successful therapeutic translation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(3), 185-212. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00612-2>

- Mecha, M., Feliú, A., Carrillo-Salinas, F. J., Rueda-Zubiaurre, A., Ortega-Gutiérrez, S., de Sola, R. G., & Guaza, C. (2015). Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 49, 233-245. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.002>
- 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. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83-90. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00109-d](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00109-d)
- Mechoulam, R., & Shvo, Y. (1963). Hashish. I. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron*, 19(12), 2073-2078. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-x](https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-x)
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Frontiers in Neuroscience*, 13, 1310. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01310>
- Melis, M., Carta, S., Fattore, L., Tolu, S., Yasar, S., Goldberg, S. R., Fratta, W., Maskos, U., & Pistis, M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors. *Biological Psychiatry*, 68(3), 256-264. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.04.016>
- Melo, E. P., Konno, T., Farace, I., Awadelkareem, M. A., Skov, L. R., Teodoro, F., Sancho, T. P., Paton, A. W., Paton, J. C., Fares, M., Paulo, P. M. R., Zhang, X., & Avezov, E. (2022). Stress-induced protein disaggregation in the endoplasmic reticulum catalysed by BiP. *Nature Communications*, 13(1), 2501. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30238-2>
- Meyer, K., Ferraiuolo, L., Miranda, C. J., Likhite, S., McElroy, S., Rensch, S., Ditsworth, D., Lagier-Tourenne, C., Smith, R. A., Ravits, J., Burghes, A. H., Shaw, P. J., Cleveland, D. W., Kolb, S. J., & Kaspar, B. K. (2014). Direct conversion of patient fibroblasts demonstrates non-cell autonomous toxicity of astrocytes to motor neurons in familial and sporadic ALS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2), 829-832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314085111>
- Mikheeva, I. B., Shubina, L., Matveeva, N., Pavlik, L. L., & Kitchigina, V. F. (2017). Fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 may protect against kainic acid-induced damage to hippocampal neurons: Dependence on the degree of injury. *Epilepsy Research*, 137, 84-94. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.09.017>
- Milanese, M., Zappettini, S., Onofri, F., Musazzi, L., Tardito, D., Bonifacino, T., Messa, M., Racagni, G., Usai, C., Benfenati, F., Popoli, M., & Bonanno, G. (2011). Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 116(6), 1028-1042. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07155.x>
- Miller, T., Cudkovicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A. L., Maragakis, N. J., McDermott, C. J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C. F., ... Ferguson, T. A. (2020). Phase 1-2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *The New England Journal of Medicine*, 383(2), 109-119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2003715>
- Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamshad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 502-513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>
- Mitchell, J. C., McGoldrick, P., Vance, C., Hortobagyi, T., Sreedharan, J., Rogelj, B., Tudor, E. L., Smith, B. N., Klasen, C., Miller, C. C. J., Cooper, J. D., Greensmith, L., & Shaw, C. E. (2013). Overexpression of human wild-type FUS causes progressive motor neuron degeneration in an age- and dose-dependent fashion. *Acta Neuropathologica*, 125(2), 273-288. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1043-z>
- Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martin, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., & Guaza, C. (2002). Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: Involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(22), 9742-9753. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-22-09742.2002>
- Molina-Holgado, F., Lledó, A., & Guaza, C. (1997). Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport*, 8(8), 1929-1933. <https://doi.org/10.1097/00001756-199705260-00027>
- Molina-Holgado, F., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (1998). The endogenous cannabinoid anandamide potentiates interleukin-6 production by astrocytes infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus by a receptor-mediated pathway. *FEBS Letters*, 433(1-2), 139-142. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00851-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00851-5)

BIBLIOGRAFÍA

Mollica, A., Pelliccia, S., Famigliani, V., Stefanucci, A., Macedonio, G., Chiavaroli, A., Orlando, G., Brunetti, L., Ferrante, C., Pieretti, S., Novellino, E., Benyhe, S., Zador, F., Erdei, A., Szucs, E., Samavati, R., Dvrorasko, S., Tomboly, C., Ragno, R., ... Silvestri, R. (2017). Exploring the first Rimonabant analog-opioid peptide hybrid compound, as bivalent ligand for CB1 and opioid receptors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 444-451. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1260565>

Montero, C., Campillo, N. E., Goya, P., & Páez, J. A. (2005). Homology models of the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. A docking analysis study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40(1), 75-83. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2004.10.002>

Morello, G., Spampinato, A. G., & Cavallaro, S. (2017). Neuroinflammation and ALS: Transcriptomic Insights into Molecular Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Mediators of Inflammation*, 2017, 7070469. <https://doi.org/10.1155/2017/7070469>

Moreno-Martet, M., Espejo-Porras, F., Fernández-Ruiz, J., & de Lago, E. (2014a). Changes in Endocannabinoid Receptors and Enzymes in the Spinal Cord of SOD1G93A Transgenic Mice and Evaluation of a Sativex®-like Combination of Phytocannabinoids: Interest for Future Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 20(9), 809-815. <https://doi.org/10.1111/cns.12262>

Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. (2018). Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 487. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>

Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61-65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>

Murphy, N., Cowley, T. R., Blau, C. W., Dempsey, C. N., Noonan, J., Gowran, A., Tanveer, R., Olango, W. M., Finn, D. P., Campbell, V. A., & Lynch, M. A. (2012). The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit in long-term potentiation. *Journal of Neuroinflammation*, 9(1), 79. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-79>

N

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. *Nature Neuroscience*, 10(5), 615-622. <https://doi.org/10.1038/nn1876>

Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Angelats, E., Etayo, Í., Reyes-Resina, I., Pulido-Salgado, M., Rodríguez-Pérez, A. I., Canela, E. I., Saura, J., Lanciego, J. L., Labandeira-García, J. L., Saura, C. A., Fuxe, K., & Franco, R. (2018). Receptor-heteromer mediated regulation of endocannabinoid signaling in activated microglia. Role of CB1 and CB2 receptors and relevance for Alzheimer's disease and levodopa-induced dyskinesia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 67, 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.015>

Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., Casadó, V., Cortés, A., Mallol, J., Canela, E. I., Lluís, C., & Franco, R. (2008). Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *TheScientificWorldJournal*, 8, 1088-1097. <https://doi.org/10.1100/tsw.2008.136>

Navarro, G., Morales, P., Rodríguez-Cueto, C., Fernández-Ruiz, J., Jagerovic, N., & Franco, R. (2016). Targeting Cannabinoid CB2 Receptors in the Central Nervous System. *Medicinal Chemistry Approaches with Focus on Neurodegenerative Disorders*. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00406>

Navia-Paldanius, D., Savinainen, J. R., & Laitinen, J. T. (2012). Biochemical and pharmacological characterization of human α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6) and 12 (ABHD12). *Journal of Lipid Research*, 53(11), 2413-2424. <https://doi.org/10.1194/jlr.M030411>

Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5796), 130-133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>

Niessen, H. G., Angenstein, F., Sander, K., Kunz, W. S., Teuchert, M., Ludolph, A. C., Heinze, H.-J., Scheich, H., & Vielhaber, S. (2006). In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of

ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. *Experimental Neurology*, 201(2), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.007>

Nilaver, B. I., & Urbanski, H. F. (2023). Mechanisms underlying TDP-43 pathology and neurodegeneration: An updated Mini-Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1142617. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1142617>

O

Oakes, J. A., Davies, M. C., & Collins, M. O. (2017). TBK1: A new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular Brain*, 10, 5. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0287-x>

Oliver, E. E., Hughes, E. K., Puckett, M. K., Chen, R., Lowther, W. T., & Howlett, A. C. (2020). Cannabinoid Receptor Interacting Protein 1a (CRIP1a) in Health and Disease. *Biomolecules*, 10(12), 1609. <https://doi.org/10.3390/biom10121609>

Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., & Holsinger, R. M. D. (2023). Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. *Antioxidants*, 12(2), 517. <https://doi.org/10.3390/antiox12020517>

O'Rourke, J. G., Bogdanik, L., Yáñez, A., Lall, D., Wolf, A. J., Muhammad, A. K. M. G., 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 (New York, N.Y.)*, 351(6279), 1324-1329. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1064>

Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (2005). Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia*, 52(2), 163-168. <https://doi.org/10.1002/glia.20229>

O'Sullivan, S. E. (2016). An update on PPAR activation by cannabinoids. *British Journal of Pharmacology*, 173(12), 1899-1910. <https://doi.org/10.1111/bph.13497>

P

Pacher, P., Kogan, N. M., & Mechoulam, R. (2020). Beyond THC and Endocannabinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 60(1), 637-659. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021441>

Pagano, C., Savarese, B., Coppola, L., Navarra, G., Avilia, G., Laezza, C., & Bifulco, M. (2023). Cannabinoids in the Modulation of Oxidative Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2513. <https://doi.org/10.3390/ijms24032513>

Paganoni, S., Hendrix, S., Dickson, S. P., Knowlton, N., Macklin, E. A., Berry, J. D., Elliott, M. A., Maiser, S., Karam, C., Caress, J. B., Owegi, M. A., Quick, A., Wymer, J., Goutman, S. A., Heitzman, D., Heiman-Patterson, T. D., Jackson, C. E., Quinn, C., Rothstein, J. D., ... Cudkowicz, M. E. (2021). Long-term survival of participants in the CENTAUR trial of sodium phenylbutyrate-taurursodiol in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle & Nerve*, 63(1), 31-39. <https://doi.org/10.1002/mus.27091>

Paganoni, S., Macklin, E. A., Hendrix, S., Berry, J. D., Elliott, M. A., Maiser, S., Karam, C., Caress, J. B., Owegi, M. A., Quick, A., Wymer, J., Goutman, S. A., Heitzman, D., Heiman-Patterson, T., Jackson, C. E., Quinn, C., Rothstein, J. D., Kasarskis, E. J., Katz, J., ... Cudkowicz, M. E. (2020). Trial of Sodium Phenylbutyrate-Taurursodiol for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 383(10), 919-930. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916945>

Paganoni, S., Macklin, E. A., Lee, A., Murphy, A., Chang, J., Zipf, A., Cudkowicz, M., & Atassi, N. (2014). Diagnostic timelines and delays in diagnosing amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotrophic Lateral Sclerosis & Frontotemporal Degeneration*, 15(5-6), 453-456. <https://doi.org/10.3109/21678421.2014.903974>

Palazuelos, J., Aguado, T., Pazos, M. R., Julien, B., Carrasco, C., Resel, E., Sagredo, O., Benito, C., Romero, J., Azcoitia, I., Fernández-Ruiz, J., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2009). Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain: A Journal of Neurology*, 132(Pt 11), 3152-3164. <https://doi.org/10.1093/brain/awp239>

Palazuelos, J., Ortega, Z., Díaz-Alonso, J., Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2012). CB2 Cannabinoid Receptors Promote Neural Progenitor Cell Proliferation via mTORC1 Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 1198-1209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291294>

BIBLIOGRAFÍA

- Palma, E., Reyes-Ruiz, J. M., Lopercolo, D., Roseti, C., Bertolini, C., Ruffolo, G., Cifelli, P., Onesti, E., Limatola, C., Miledi, R., & Inghilleri, M. (2016). Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), 3060-3065. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600251113>
- Pang, W., & Hu, F. (2021). Cellular and physiological functions of CgORF72 and implications for ALS/FTD. *Journal of neurochemistry*, 157(3), 334-350. <https://doi.org/10.1111/jnc.15255>
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.-E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., Bennett, F., Bessis, A., Biber, K., Bilbo, S., Blurton-Jones, M., Boddeke, E., Brites, D., Bröne, B., Brown, G. C., ... Wyss-Coray, T. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458-3483. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020>
- Papadeas, S. T., Kraig, S. E., O'Banion, C., Lepore, A. C., & Maragakis, N. J. (2011). Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17803-17808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103141108>
- Pasquarelli, N., Engelskirchen, M., Hanselmann, J., Endres, S., Porazik, C., Bayer, H., Buck, E., Karsak, M., Weydt, P., Ferger, B., & Witting, A. (2017a). Evaluation of monoacylglycerol lipase as a therapeutic target in a transgenic mouse model of ALS. *Neuropharmacology*, 124, 157-169. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.037>
- Pathak, D., & Sriram, K. (2023). Neuron-astrocyte omnidirectional signaling in neurological health and disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1169320>
- Pawsey, S., Wood, M., Browne, H., Donaldson, K., Christie, M., & Warrington, S. (2016). Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of FAAH Inhibitor V158866: A Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Phase I Study in Healthy Volunteers. *Drugs in R&D*, 16(2), 181-191. <https://doi.org/10.1007/s40268-016-0127-y>
- Pedrini, S., Sau, D., Guareschi, S., Bogush, M., Brown, R. H., Nanche, N., Kia, A., Trotti, D., & Pasinelli, P. (2010). ALS-linked mutant SOD1 damages mitochondria by promoting conformational changes in Bcl-2. *Human Molecular Genetics*, 19(15), 2974-2986. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq202>
- Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Di Marzo, V., Elphick, M. R., Greasley, P. J., Hansen, H. S., Kunos, G., Mackie, K., Mechoulam, R., & Ross, R. A. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews*, 62(4), 588-631. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003004>
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2015). Rodent Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Current Protocols in Pharmacology*, 69(1), 5.67.1-5.67.21. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0567s69>
- Picchiarelli, G., Demestre, M., Zuko, A., Been, M., Higelin, J., Dieterlé, S., Goy, M.-A., Mallik, M., Sellier, C., Scekcic-Zahirovic, J., Zhang, L., Rosenbohm, A., Sijlmans, C., Aly, A., Mersmann, S., Sanjuan-Ruiz, I., Hübers, A., Messaddeq, N., Wagner, M., ... Storkebaum, E. (2019). FUS-mediated regulation of acetylcholine receptor transcription at neuromuscular junctions is compromised in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Neuroscience*, 22(11), 1793-1805. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0498-9>
- 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 Letters*, 583(12), 2071-2076. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.028>
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T. R., Dasse, O., Monaghan, E. P., Parrott, J. A., & Putman, D. (2006). Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews*, 12(1), 21-38. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2006.00021.x>
- 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. *Pharmacology & Therapeutics*, 175, 133-150. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.041>
- Pistis, M., & O'Sullivan, S. E. (2017). The Role of Nuclear Hormone Receptors in Cannabinoid Function. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 80, 291-328. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.008>

Porter, R. F., Szczesniak, A.-M., Toguri, J. T., Gebremeskel, S., Johnston, B., Lehmann, C., Fingerle, J., Rothenhäusler, B., Perret, C., Rogers-Evans, M., Kimbara, A., Nettekoven, M., Guba, W., Grether, U., Ullmer, C., & Kelly, M. E. M. (2019). Selective Cannabinoid 2 Receptor Agonists as Potential Therapeutic Drugs for the Treatment of Endotoxin-Induced Uveitis. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(18), 3338. <https://doi.org/10.3390/molecules24183338>

Posillico, C. K. (2021). Three's Company: Neuroimmune activation, sex, and memory at the tripartite synapse. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 16, 100326. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100326>

R

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. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders: Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 5(1), 33-39. <https://doi.org/10.1080/14660820310016813>

Ramroop, H., & Cruz, R. (2024). Electrodiagnostic Evaluation of Motor Neuron Disease. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563178/>

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., ... Traynor, B. J. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257-268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.010>

Ricketts, T., McGoldrick, P., Fratta, P., Oliveira, H. M. de, Kent, R., Phatak, V., Brandner, S., Blanco, G., Greensmith, L., Acevedo-Arozena, A., & Fisher, E. M. C. (2014). A Nonsense Mutation in Mouse Tardbp Affects TDP43 Alternative Splicing Activity and Causes Limb-Clasping and Body Tone Defects. *PLOS ONE*, 9(1), e85962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085962>

Riva, N., Mora, G., Sorarù, G., Lunetta, C., Ferraro, O. E., Falzone, Y., Leocani, L., Fazio, R., Comola, M., Comi, G., & CANALS Study Group. (2019). Safety and efficacy of nabiximols on spasticity symptoms in patients with motor neuron disease (CANALS): A multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Neurology*, 18(2), 155-164. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30406-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30406-X)

Rivas-Santisteban, R., Lillo, A., Lillo, J., Rebassa, J.-B., Contestí, J. S., Saura, C. A., Franco, R., & Navarro, G. (2021). N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and cannabinoid CB2 receptors form functional complexes in cells of the central nervous system: Insights into the therapeutic potential of neuronal and microglial NMDA receptors. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00920-6>

Rivera, P., Fernández-Arjona, M. D. M., Silva-Peña, D., Blanco, E., Vargas, A., López-Ávalos, M. D., Grondona, J. M., Serrano, A., Pavón, F. J., Rodríguez de Fonseca, F., & Suárez, J. (2018). Pharmacological blockade of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by URB597 improves memory and changes the phenotype of hippocampal microglia despite ethanol exposure. *Biochemical Pharmacology*, 157, 244-257. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.005>

Rochat, C., Bernard-Marissal, N., Källstig, E., Pradervand, S., Perrin, F. E., Aebischer, P., Raoul, C., & Schneider, B. L. (2022). Astrocyte-targeting RNA interference against mutated superoxide dismutase 1 induces motoneuron plasticity and protects fast-fatigable motor units in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*, 70(5), 842-857. <https://doi.org/10.1002/glia.24140>

Rodríguez-Cueto, C., Benito, C., Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Hernández-Gálvez, M., & Gómez-Ruiz, M. (2014). Changes in CB1 and CB2 receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias. *British Journal of Pharmacology*, 171(6), 1472-1489. <https://doi.org/10.1111/bph.12283>

Rodríguez-Cueto, C., Benito, C., Romero, J., Hernández-Gálvez, M., Gómez-Ruiz, M., & Fernández-Ruiz, J. (2014). Endocannabinoid-Hydrolysing Enzymes in the Post-Mortem Cerebellum of Humans Affected by Hereditary Autosomal Dominant Ataxias. *Pathobiology*, 81(3), 149-159. <https://doi.org/10.1159/000358127>

Rodríguez-Cueto, C., Gómez-Almería, M., García Toscano, L., Romero, J., Hillard, C. J., de Lago, E., & Fernández-Ruiz, J. (2021). Inactivation of the CB2 receptor accelerated the neuropathological deterioration in TDP-43 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathology* (Zurich, Switzerland), 31(6), e12972. <https://doi.org/10.1111/bpa.12972>

BIBLIOGRAFÍA

Rodríguez-Cueto, C., Santos-García, I., García-Toscano, L., Espejo-Porras, F., Bellido, M.L., Fernández-Ruiz, J., Muñoz, E., & de Lago, E. (2018). Neuroprotective effects of the cannabigerol quinone derivative VCE-003.2 in SOD1G93A transgenic mice, an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical Pharmacology*, 157, 217-226. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.049>

Rojas, A., & Dingledine, R. (2013). Ionotropic glutamate receptors: Regulation by G-protein-coupled receptors. *Molecular Pharmacology*, 83(4), 746-752. <https://doi.org/10.1124/mol.112.083352>

Rom, S., Zuluaga-Ramirez, V., Dykstra, H., Reichenbach, N. L., Pacher, P., & Persidsky, Y. (2013). Selective Activation of Cannabinoid Receptor 2 in Leukocytes Suppresses Their Engagement of the Brain Endothelium and Protects the Blood-Brain Barrier. *The American Journal of Pathology*, 183(5), 1548-1558. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.033>

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. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362(6415), 59-62. <https://doi.org/10.1038/362059a0>

Ruehle, S., Rey, A. A., Remmers, F., & Lutz, B. (2012). The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 26(1), 23-39. <https://doi.org/10.1177/0269881111408958>

Ruiz de Martín Esteban, S., Benito-Cuesta, I., Terradillos, I., Martínez-Relimpio, A. M., Arnanz, M. A., Ruiz-Pérez, G., Korn, C., Raposo, C., Sarott, R. C., Westphal, M. V., Elezgarai, I., Carreira, E. M., Hillard, C. J., Grether, U., Grandes, P., Grande, M. T., & Romero, J. (2022). Cannabinoid CB2 Receptors Modulate Microglia Function and Amyloid Dynamics in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 841766. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.841766>

Ryu, H., Smith, K., Camelo, S. I., Carreras, I., Lee, J., Iglesias, A. H., Dangond, F., Cormier, K. A., Cudkowicz, M. E., Brown, R. H., & Ferrante, R. J. (2005). Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Journal of Neurochemistry*, 93(5), 1087-1098. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03077.x>

S

Sagredo, O., González, S., Aroyo, I., Pazos, M. R., Benito, C., Lastres-Becker, I., Romero, J. P., Tolón, R. M., Mechoulam, R., Brouillet, E., Romero, J., & Fernández-Ruiz, J. (2009). Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: Relevance for Huntington's disease. *Glia*, 57(11), 1154-1167. <https://doi.org/10.1002/glia.20838>

Santos-García, I., Rodríguez-Cueto, C., Villegas, P., Piscitelli, F., Lauritano, A., Shen, C.-K. J., Di Marzo, V., Fernández-Ruiz, J., & de Lago, E. (2023a). Preclinical investigation in FAAH inhibition as a neuroprotective therapy for frontotemporal dementia using TDP-43 transgenic male mice. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02792-z>

Sasaki, S. (2010). Endoplasmic Reticulum Stress in Motor Neurons of the Spinal Cord in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 69(4), 346-355. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181d44992>

Sasaki, S., Komori, T., & Iwata, M. (2000). Excitatory amino acid transporter 1 and 2 immunoreactivity in the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 100(2), 138-144. <https://doi.org/10.1007/s004019900159>

Scherma, M., Masia, P., Satta, V., Fratta, W., Fadda, P., & Tanda, G. (2019). Brain activity of anandamide: A rewarding bliss? *Acta Pharmacologica Sinica*, 40(3), 309-323. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0075-x>

Schlosburg, J. E., Blankman, J. L., Long, J. Z., Nomura, D. K., Pan, B., Kinsey, S. G., Nguyen, P. T., Ramesh, D., Booker, L., Burston, J. J., Thomas, E. A., Selley, D. E., Sim-Selley, L. J., Liu, Q., Lichtman, A. H., & Cravatt, B. F. (2010). Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nature neuroscience*, 13(9), 1113-1119. <https://doi.org/10.1038/nn.2616>

Schmöle, A.-C., Lundt, R., Gennequin, B., Schrage, H., Beins, E., Krämer, A., Zimmer, T., Limmer, A., Zimmer, A., & Otte, D.-M. (2015). Expression Analysis of CB2-GFP BAC Transgenic Mice. *PloS One*, 10(9), e0138986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138986>

- Schweingruber, C., & Hedlund, E. (2022). The Cell Autonomous and Non-Cell Autonomous Aspects of Neuronal Vulnerability and Resilience in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biology*, 11(8), 1191. <https://doi.org/10.3390/biology11081191>
- Scuderi, C., Esposito, G., Blasio, A., Valenza, M., Arietti, P., Steardo Jr, L., Carnuccio, R., De Filippis, D., Petrosino, S., Iuvone, T., Marzo, V. D., & Steardo, L. (2011). Palmitoylethanolamide counteracts reactive astrogliosis induced by β -amyloid peptide. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(12), 2664-2674. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01267.x>
- Scuderi, C., Valenza, M., Stecca, C., Esposito, G., Carratù, M. R., & Steardo, L. (2012). Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Journal of Neuroinflammation*, 9, 49. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-49>
- Selvaraj, B. T., Livesey, M. R., Zhao, C., Gregory, J. M., James, O. T., Cleary, E. M., Chouhan, A. K., Gane, A. B., Perkins, E. M., Dando, O., Lillo, S. G., Lee, Y.-B., Nishimura, A. L., Poreci, U., Thankamony, S., Pray, M., Vasistha, N. A., Magnani, D., Borooah, S., ... Chandran, S. (2018). CgORF72 repeat expansion causes vulnerability of motor neurons to Ca²⁺-permeable AMPA receptor-mediated excitotoxicity. *Nature Communications*, 9(1), 347. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02729-0>
- Shefner, J. M., Al-Chalabi, A., Baker, M. R., Cui, L.-Y., de Carvalho, M., Eisen, A., Grosskreutz, J., Hardiman, O., Henderson, R., Matamala, J. M., Mitsumoto, H., Paulus, W., Simon, N., Swash, M., Talbot, K., Turner, M. R., Ugawa, Y., van den Berg, L. H., Verdugo, R., ... Kiernan, M. C. (2020). A proposal for new diagnostic criteria for ALS. *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 131(8), 1975-1978. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2020.04.005>
- Shefner, J. M., Musaro, A., Ngo, S. T., Lunetta, C., Steyn, F. J., Robitaille, R., De Carvalho, M., Rutkove, S., Ludolph, A. C., & Dupuis, L. (2023). Skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 146(11), 4425-4436. <https://doi.org/10.1093/brain/awad202>
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental Cell*, 3(1), 99-111. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00203-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00203-4)
- Shepherd, S. R., Wu, J., Cardoso, M., Wiklendt, L., Dinning, P. G., Chataway, T., Schultz, D., Benatar, M., & Rogers, M.-L. (2017). Urinary p75^{ECD}: A prognostic, disease progression, and pharmacodynamic biomarker in ALS. *Neurology*, 88(12), 1137-1143. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003741>
- Shi, J., Qin, X., Chang, X., Wang, H., Guo, J., & Zhang, W. (2022). Neurofilament markers in serum and cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(2), 583-587. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17100>
- Shibuya, K., Park, S. B., Geevasinga, N., Menon, P., Howells, J., Simon, N. G., Huynh, W., Noto, Y.-I., Götz, J., Kril, J. J., Ittner, L. M., Hodges, J., Halliday, G., Vucic, S., & Kiernan, M. C. (2016). Motor cortical function determines prognosis in sporadic ALS. *Neurology*, 87(5), 513-520. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002912>
- Shire, D., Calandra, B., Bouaboula, M., Barth, F., Rinaldi-Carmona, M., Casellas, P., & Ferrara, P. (1999). Cannabinoid receptor interactions with the antagonists SR 141716A and SR 144528. *Life Sciences*, 65(6-7), 627-635. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00285-4](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00285-4)
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04346.x>
- Shteiinfer-Kuzmine, A., Argueti, S., Gupta, R., Shvil, N., Abu-Hamad, S., Gropper, Y., Hoerber, J., Magri, A., Messina, A., Kozlova, E. N., Shoshan-Barmatz, V., & Israelson, A. (2019). A VDAC1-Derived N-Terminal Peptide Inhibits Mutant SOD1-VDAC1 Interactions and Toxicity in the SOD1 Model of ALS. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 346. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00346>
- Silva-Fernandes, A., Duarte-Silva, S., Neves-Carvalho, A., Amorim, M., Soares-Cunha, C., Oliveira, P., Thirstrup, K., Teixeira-Castro, A., & Maciel, P. (2014). Chronic Treatment with 17-DMAG Improves Balance and Coordination in A New Mouse Model of Machado-Joseph Disease. *Neurotherapeutics*, 11(2), 433-449. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0255-9>
- Sleigh, J. N., Rossor, A. M., Fellows, A. D., Tosolini, A. P., & Schiavo, G. (2019). Axonal transport and neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(12), 691-703. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0257-2>

BIBLIOGRAFÍA

Sleigh, J. N., Tosolini, A. P., Gordon, D., Devoy, A., Fratta, P., Fisher, E. M. C., Talbot, K., & Schiavo, G. (2020). Mice Carrying ALS Mutant TDP-43, but Not Mutant FUS, Display In Vivo Defects in Axonal Transport of Signaling Endosomes. *Cell Reports*, 30(11), 3655-3662.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.078>

Smith, T. H., Sim-Selley, L. J., & Selley, D. E. (2010). Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: Novel targets for central nervous system drug discovery? *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 454-466. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00777.x>

Spiller, K. J., Restrepo, C. R., Khan, T., Dominique, M. A., Fang, T. C., Canter, R. G., Roberts, C. J., Miller, K. R., Ransohoff, R. M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2018). Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nature Neuroscience*, 21(3), 329-340. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0083-7>

Sprengle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0183-y>

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. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.034>

Stephens, B., Guiloff, R. J., Navarrete, R., Newman, P., Nikhar, N., & Lewis, P. (2006). Widespread loss of neuronal populations in the spinal ventral horn in sporadic motor neuron disease. A morphometric study. *Journal of the Neurological Sciences*, 244(1-2), 41-58. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.12.003>

Stephenson, J., & Amor, S. (2017). Modelling amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 25-26, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.10.001>

Su, S.-H., Wu, Y.-F., Lin, Q., & Hai, J. (2017). Cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 and fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 ameliorate neuroinflammatory responses in chronic cerebral hypoperfusion model by blocking NF-κB pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(12), 1189-1200. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1417-9>

Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S., & Gokoh, M. (2006). Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Progress in Lipid Research*, 45(5), 405-446. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.03.003>

Suyama, K., Watanabe, M., Sakabe, K., Okada, Y., Matsuyama, D., Kuroiwa, M., & Mochida, J. (2011). Overexpression of GRP78 protects glial cells from endoplasmic reticulum stress. *Neuroscience Letters*, 504(3), 271-276. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.09.045>

Suzuki, N., Nishiyama, A., Warita, H., & Aoki, M. (2023). Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: Seeking therapeutic targets in the era of gene therapy. *Journal of Human Genetics*, 68(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s10038-022-01055-8>

Syed, S. K., Bui, H. H., Beavers, L. S., Farb, T. B., Ficorilli, J., Chesterfield, A. K., Kuo, M.-S., Bokvist, K., Barrett, D. G., & Efanov, A. M. (2012). Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 303(12), E1469-1478. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00269.2012>

T

Tak, Y. J., Park, J.-H., Rhim, H., & Kang, S. (2020). ALS-Related Mutant SOD1 Aggregates Interfere with Mitophagy by Sequestering the Autophagy Receptor Optineurin. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7525. <https://doi.org/10.3390/ijms21207525>

Tallon, C., Russell, K. A., Sakhalkar, S., Andrapallayal, N., & Farah, M. H. (2016). Length-dependent axo-terminal degeneration at the neuromuscular synapses of type II muscle in SOD1 mice. *Neuroscience*, 312, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.018>

Tam, O. H., Rozhkov, N. V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., Fagegaltier, D., Harris, B. T., Ostrow, L. W., Phatnani, H., Ravits, J., Dubnau, J., & Hammell, M. G. (2019). Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell reports*, 29(5), 1164-1177.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.066>

Tanaka, M., Yagyu, K., Sackett, S., & Zhang, Y. (2019). Anti-Inflammatory Effects by Pharmacological Inhibition or Knockdown of Fatty Acid Amide Hydrolase in BV2 Microglial Cells. *Cells*, 8(5), 491. <https://doi.org/10.3390/cells8050491>

Thibault, K., Carrel, D., Bonnard, D., Gallatz, K., Simon, A., Biard, M., Pezet, S., Palkovits, M., & Lenkei, Z. (2013). Activation-dependent subcellular distribution patterns of CB1 cannabinoid receptors in the rat forebrain. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 23(11), 2581-2591. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs240>

Thielsen, K. D., Moser, J. M., Schmitt-John, T., Jensen, M. S., Jensen, K., & Holm, M. M. (2013). The Wobbler mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) displays hippocampal hyperexcitability, and reduced number of interneurons, but no presynaptic vesicle release impairments. *PLoS One*, 8(12), e82767. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082767>

Tiberi, M., Evron, T., Saracini, S., Boffa, L., Mercuri, N. B., Chintalacharuvu, S. R., Atamas, S. P., & Chiurchiù, V. (2022). Potent T cell-mediated anti-inflammatory role of the selective CB2 agonist lenabasum in multiple sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 48(2), e12768. <https://doi.org/10.1111/nan.12768>

Todd, T. W., & Petrucelli, L. (2022). Modelling amyotrophic lateral sclerosis in rodents. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(4), 231-251. <https://doi.org/10.1038/s41583-022-00564-x>

Tolón, R. M., Núñez, E., Pazos, M. R., Benito, C., Castillo, A. I., Martínez-Orgado, J. A., & Romero, J. (2009). The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages. *Brain Research*, 1283, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.05.098>

Tondo, G., Iaccarino, L., Cerami, C., Vanoli, G. E., Presotto, L., Masiello, V., Coliva, A., Salvi, F., Bartolomei, I., Mosca, L., Lunetta, C., & Perani, D. (2020). 11 C-PK11195 PET-based molecular study of microglia activation in SOD1 amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7(9), 1513-1523. <https://doi.org/10.1002/acn3.51112>

Tong, J., Huang, C., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Liu, X., Li, F., Zhou, H., & Xia, X.-G. (2013). Expression of ALS-linked TDP-43 mutant in astrocytes causes non-cell-autonomous motor neuron death in rats. *The EMBO Journal*, 32(13), 1917-1926. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.122>

Tosolini, A. P., Sleight, J. N., Surana, S., Rhymes, E. R., Cahalan, S. D., & Schiavo, G. (2022). BDNF-dependent modulation of axonal transport is selectively impaired in ALS. *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01418-4>

Tripathi, R. K. P. (2020). A perspective review on fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 111953. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111953>

Turcotte, C., Blanchet, M.-R., Laviolette, M., & Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4449-4470. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2300-4>

U

Urbi, B., Broadley, S., Bedlack, R., Russo, E., & Sabet, A. (2019). Study protocol for a randomised, double-blind, placebo-controlled study evaluating the Efficacy of cannabis-based Medicine Extract in slowing the disease pRegression of Amyotrophic Lateral sclerosis or motor neurone Disease: The EMERALD trial. *BMJ Open*, 9(11), e029449. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-029449>

V

Vacchiano, V., Mastrangelo, A., Zenesini, C., Masullo, M., Quadalti, C., Avoni, P., Polisch, B., Cherici, A., Capellari, S., Salvi, F., Liguori, R., & Parchi, P. (2021). Plasma and CSF Neurofilament Light Chain in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Cross-Sectional and Longitudinal Study. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 753242. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.753242>

Van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W., & Van Den Bosch, L. (2005). Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuro-Degenerative Diseases*, 2(3-4), 147-159. <https://doi.org/10.1159/000089620>

BIBLIOGRAFÍA

van Esbroeck, A. C. M., Janssen, A. P. A., Cognetta, A. B., Ogasawara, D., Shpak, G., van der Kroeg, M., Kantae, V., Baggelaar, M. P., de Vrij, F. M. S., Deng, H., Allarà, M., Fezza, F., Lin, Z., van der Wel, T., Soethoudt, M., Mock, E. D., den Dulk, H., Baak, I. L., Florea, B. I., ... van der Stelt, M. (2017). Activity-based protein profiling reveals off-target proteins of the FAAH inhibitor BIA 10-2474. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6342), 1084-1087. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7497>

Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., ... Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5918), 1208-1211. <https://doi.org/10.1126/science.1165942>

Vasincu, A., Rusu, R.-N., Ababei, D.-C., Larion, M., Bild, W., Stanciu, G. D., Solcan, C., & Bild, V. (2022). Endocannabinoid Modulation in Neurodegenerative Diseases: In Pursuit of Certainty. *Biology*, 11(3), 440. <https://doi.org/10.3390/biology11030440>

Vats, A., Gourie-Devi, M., Ahuja, K., Sharma, A., Wajid, S., Ganguly, N. K., & Taneja, V. (2018). Expression analysis of protein homeostasis pathways in the peripheral blood mononuclear cells of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 387, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.01.035>

Vázquez, C., Tolón, R. M., Grande, M. T., Caraza, M., Moreno, M., Koester, E. C., Villaescusa, B., Ruiz-Valdepeñas, L., Fernández-Sánchez, F. J., Cravatt, B. F., Hillard, C. J., & Romero, J. (2015). Endocannabinoid regulation of amyloid-induced neuroinflammation. *Neurobiology of Aging*, 36(11), 3008-3019. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.003>

Verde, F., Steinacker, P., Weishaupt, J. H., Kassubek, J., Oeckl, P., Halbgebauer, S., Tumani, H., Arnim, C. A. F. von, Dorst, J., Feneberg, E., Mayer, B., Müller, H.-P., Gorges, M., Rosenbohm, A., Volk, A. E., Silani, V., Ludolph, A. C., & Otto, M. (2019). Neurofilament light chain in serum for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 90(2), 157-164. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318704>

Verma, S., Khurana, S., Vats, A., Sahu, B., Ganguly, N. K., Chakraborti, P., Gourie-Devi, M., & Taneja, V. (2022). Neuromuscular Junction Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 59(3), 1502-1527. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02658-6>

Viader, A., Blankman, J. L., Zhong, P., Liu, X., Schlosburg, J. E., Joslyn, C. M., Liu, Q.-S., Tomarchio, A. J., Lichtman, A. H., Selley, D. E., Sim-Selley, L. J., & Cravatt, B. F. (2015). Metabolic Interplay between Astrocytes and Neurons Regulates Endocannabinoid Action. *Cell reports*, 12(5), 798-808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.075>

Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in Immunology*, 13, 997786. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.997786>

Vidovic, M., Müschen, L. H., Brakemeier, S., Machetanz, G., Naumann, M., & Castro-Gomez, S. (2023). Current State and Future Directions in the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 12(5), 736. <https://doi.org/10.3390/cells12050736>

Vielhaber, S., Kunz, D., Winkler, K., Wiedemann, F. R., Kirches, E., Feistner, H., Heinze, H. J., Elger, C. E., Schubert, W., & Kunz, W. S. (2000). Mitochondrial DNA abnormalities in skeletal muscle of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 123 (Pt 7), 1339-1348. <https://doi.org/10.1093/brain/123.7.1339>

Villaruel-Campos, D., Schiavo, G., & Sleigh, J. N. (2022). Dissection, in vivo imaging and analysis of the mouse epitrochleoanconeus muscle. *Journal of Anatomy*, 241(5), 1108-1119. <https://doi.org/10.1111/joa.13478>

Viveros-Paredes, J. M., Gonzalez-Castañeda, R. E., Escalante-Castañeda, A., Tejeda-Martínez, A. R., Castañeda-Achutigui, F., & Flores-Soto, M. E. (2019). Effect of inhibition of fatty acid amide hydrolase on MPTP-induced dopaminergic neuronal damage. *Neurologia*, 34(3), 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.11.008>

Vu, L., An, J., Kovalik, T., Gendron, T., Petrucelli, L., & Bowser, R. (2020). Cross-sectional and longitudinal measures of chitinase proteins in amyotrophic lateral sclerosis and expression of CHI3L1 in activated astrocytes. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 91(4), 350-358. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-321916>

Vu, L. T., & Bowser, R. (2017). Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 14(1), 119-134. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0503-x>

Vucic, S., Cheah, B. C., & Kiernan, M. C. (2009). Defining the mechanisms that underlie cortical hyperexcitability in amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, 220(1), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.017>

Vucic, S., Pavey, N., Haidar, M., Turner, B. J., & Kiernan, M. C. (2021). Cortical hyperexcitability: Diagnostic and pathogenic biomarker of ALS. *Neuroscience Letters*, 759, 136039. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136039>

W

Wang, D.-P., Jin, K.-Y., Zhao, P., Lin, Q., Kang, K., & Hai, J. (2021a). Neuroprotective Effects of VEGF-A Nanofiber Membrane and FAAH Inhibitor URB597 Against Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Ischemic Neuronal Injury. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3661-3678. <https://doi.org/10.2147/IJN.S307335>

Wang, H., Guan, L., & Deng, M. (2023a). Recent progress of the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and challenges of gene therapy. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1170996. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1170996>

Wang, L., Gutmann, D. H., & Roos, R. P. (2011). Astrocyte loss of mutant SOD1 delays ALS disease onset and progression in G85R transgenic mice. *Human Molecular Genetics*, 20(2), 286-293. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq463>

Wang, M.-D., Little, J., Gomes, J., Cashman, N. R., & Krewski, D. (2017). Identification of risk factors associated with onset and progression of amyotrophic lateral sclerosis using systematic review and meta-analysis. *Neurotoxicology*, 61, 101-130. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.06.015>

Wang, P., Wei, Q., Li, H., & Wu, Z.-Y. (2023b). Clinical feature difference between juvenile amyotrophic lateral sclerosis with SPTLC1 and FUS mutations. *Chinese Medical Journal*, 136(2), 176-183. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002495>

Wang, T., Liu, H., Itoh, K., Oh, S., Zhao, L., Murata, D., Sesaki, H., Hartung, T., Na, C. H., & Wang, J. (2021b). Cgorf72 regulates energy homeostasis by stabilizing mitochondrial complex I assembly. *Cell Metabolism*, 33(3), 531-546.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.01.005>

Wang, W., Wang, L., Lu, J., Siedlak, S. L., Fujioka, H., Liang, J., Jiang, S., Ma, X., Jiang, Z., da Rocha, E. L., Sheng, M., Choi, H., Lerou, P. H., Li, H., & Wang, X. (2016). The inhibition of TDP-43 mitochondrial localization blocks its neuronal toxicity. *Nature Medicine*, 22(8), 869-878. <https://doi.org/10.1038/nm.4130>

Wang, Z., Bai, Z., Qin, X., & Cheng, Y. (2019). Aberrations in Oxidative Stress Markers in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1712323. <https://doi.org/10.1155/2019/1712323>

Wang, Z., Li, Y., Cai, S., Li, R., & Cao, G. (2018). Cannabinoid receptor 2 agonist attenuates blood-brain barrier damage in a rat model of intracerebral hemorrhage by activating the Rac1 pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(5), 2914-2922. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3834>

Warita, H., Manabe, Y., Murakami, T., Shiote, M., Shiro, Y., Hayashi, T., Nagano, I., Shoji, M., & Abe, K. (2002). Tardive decrease of astrocytic glutamate transporter protein in transgenic mice with ALS-linked mutant SOD1. *Neurological Research*, 24(6), 577-581. <https://doi.org/10.1179/016164102101200384>

Weber, A., Ni, J., Ling, K.-H. J., Acheampong, A., Tang-Liu, D. D.-S., Burk, R., Cravatt, B. F., & Woodward, D. (2004). Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 45(4), 757-763. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300475-JLR200>

Weber, M., Goldman, B., & Truniger, S. (2010). Tetrahydrocannabinol (THC) for cramps in amyotrophic lateral sclerosis: A randomised, double-blind crossover trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 81(10), 1135-1140. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.200642>

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18809-18814. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908767106>

BIBLIOGRAFÍA

Wei, Q.-Q., Ou, R., Cao, B., Chen, Y., Hou, Y., Zhang, L., Wu, F., & Shang, H. (2021). Early weight instability is associated with cognitive decline and poor survival in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Bulletin*, 171, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.02.022>

Werry, E. L., Bright, F. M., Pigué, O., Ittner, L. M., Halliday, G. M., Hodges, J. R., Kiernan, M. C., Loy, C. T., Kril, J. J., & Kassiou, M. (2019). Recent Developments in TSPO PET Imaging as A Biomarker of Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3161. <https://doi.org/10.3390/ijms20133161>

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. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders: Official Publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases*, 6(3), 182-184. <https://doi.org/10.1080/14660820510030149>

Williams, T. L., Day, N. C., Ince, P. G., Kamboj, R. K., & Shaw, P. J. (1997). Calcium-permeable α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: A molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 42(2), 200-207. <https://doi.org/10.1002/ana.410420211>

Winkler, E. A., Sengillo, J. D., Sullivan, J. S., Henkel, J. S., Appel, S. H., & Zlokovic, B. V. (2013). Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 125(1), 111-120. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1039-8>

Witting, A., Weydt, P., Hong, S., Kliot, M., Moller, T., & Stella, N. (2004). Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1 G93A transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 89(6), 1555-1557. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02544.x>

Witzel, S., Maier, A., Steinbach, R., Grosskreutz, J., Koch, J. C., Sarikidi, A., Petri, S., Günther, R., Wolf, J., Hermann, A., Prudlo, J., Cordts, I., Lingor, P., Löscher, W. N., Kohl, Z., Hagenacker, T., Ruckes, C., Koch, B., Spittel, S., ... German Motor Neuron Disease Network (MND-NET). (2022). Safety and Effectiveness of Long-term Intravenous Administration of Edaravone for Treatment of Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurology*, 79(2), 121-130. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.4893>

Wouters, E., Walraed, J., Banister, S. D., & Stove, C. P. (2019). Insights into biased signaling at cannabinoid receptors: Synthetic cannabinoid receptor agonists. *Biochemical Pharmacology*, 169, 113623. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.025>

Writing Group & Edaravone (MCI-186) ALS 19 Study Group. (2017). Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Neurology*, 16(7), 505-512. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30115-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30115-1)

X

Xia, Q., Huang, X., Huang, J., Zheng, Y., March, M. E., Li, J., & Wei, Y. (2021). The Role of Autophagy in Skeletal Muscle Diseases. *Frontiers in Physiology*, 12, 638983. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.638983>

Xiao, Q., Zhao, W., Beers, D. R., Yen, A. A., Xie, W., Henkel, J. S., & Appel, S. H. (2007). Mutant SOD1(G93A) microglia are more neurotoxic relative to wild-type microglia. *Journal of Neurochemistry*, 102(6), 2008-2019. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04677.x>

Xu, L., Liu, T., Liu, L., Yao, X., Chen, L., Fan, D., Zhan, S., & Wang, S. (2020). Global variation in prevalence and incidence of amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology*, 267(4), 944-953. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09652-y>

Xu, X., Shen, D., Gao, Y., Zhou, Q., Ni, Y., Meng, H., Shi, H., Le, W., Chen, S., & Chen, S. (2021). A perspective on therapies for amyotrophic lateral sclerosis: Can disease progression be curbed? *Translational Neurodegeneration*, 10, 29. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00250-5>

Xu, Y.-F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D. W., Lewis, J., & Petrucelli, L. (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 73. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-73>

Y

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. *Nature Neuroscience*, 11(3), 251-253. <https://doi.org/10.1038/nn2047>

Yamanaka, K., & Komine, O. (2018). The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neuroscience Research*, 126, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.09.011>

Yang, H., & Hu, H.-Y. (2016). Sequestration of cellular interacting partners by protein aggregates: Implication in a loss-of-function pathology. *The FEBS Journal*, 283(20), 3705-3717. <https://doi.org/10.1111/febs.13722>

Yang, X., Ma, Z., Lian, P., Xu, Y., & Cao, X. (2023). Common mechanisms underlying axonal transport deficits in neurodegenerative diseases: A mini review. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1172197. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1172197>

Yang, X., Wang, X., Xu, Z., Wu, C., Zhou, Y., Wang, Y., Lin, G., Li, K., Wu, M., Xia, A., Liu, J., Cheng, L., Zou, J., Yan, W., Shao, Z., & Yang, S. (2022). Molecular mechanism of allosteric modulation for the cannabinoid receptor CB1. *Nature Chemical Biology*, 18(8), 831-840. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01038-y>

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 Neurology*, 6, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-6-12>

You, J., Youssef, M. M. M., Santos, J. R., Lee, J., & Park, J. (2023). Microglia and Astrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Disease-Associated States, Pathological Roles, and Therapeutic Potential. *Biology*, 12(10), 1307. <https://doi.org/10.3390/biology12101307>

Yu, F., Wang, Y., Stetler, A. R., Leak, R. K., Hu, X., & Chen, J. (2022). Phagocytic microglia and macrophages in brain injury and repair. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 28(9), 1279-1293. <https://doi.org/10.1111/cns.13899>

Z

Zaino, D., Serchi, V., Giannini, F., Pucci, B., Veneri, G., Pretegianni, E., Rosini, F., Monti, L., & Rufa, A. (2023). Different saccadic profile in bulbar versus spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: A Journal of Neurology*, 146(1), 266-277. <https://doi.org/10.1093/brain/awac050>

Zhang, H.-Y., Gao, M., Shen, H., Bi, G.-H., Yang, H.-J., Liu, Q.-R., Wu, J., Gardner, E. L., Bonci, A., & Xi, Z.-X. (2017). Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats. *Addiction Biology*, 22(3), 752-765. <https://doi.org/10.1111/adb.12367>

Zhang, M., Zhang, M., Wang, L., Yu, T., Jiang, S., Jiang, P., Sun, Y., Pi, J., Zhao, R., & Guan, D. (2019). Activation of cannabinoid type 2 receptor protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury partly via Nrf2 signaling. *Life Sciences*, 230, 55-67. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.056>

Zhang, W., Zhang, L., Liang, B., Schroeder, D., Zhang, Z., Cox, G. A., Li, Y., & Lin, D.-T. (2016). Hyperactive Somatostatin Interneurons Contribute to Excitotoxicity in Neurodegenerative Disorders. *Nature neuroscience*, 19(4), 557-559. <https://doi.org/10.1038/nn.4257>

Zhao, J., Wang, X., Huo, Z., Chen, Y., Liu, J., Zhao, Z., Meng, F., Su, Q., Bao, W., Zhang, L., Wen, S., Wang, X., Liu, H., & Zhou, S. (2022). The Impact of Mitochondrial Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*, 11(13), 2049. <https://doi.org/10.3390/cells11132049>

Zhao, P., Ignacio, S., Beattie, E. C., & Abood, M. E. (2008). Altered presymptomatic AMPA and cannabinoid receptor trafficking in motor neurons of ALS model mice: Implications for excitotoxicity. *The European Journal of Neuroscience*, 27(3), 572-579. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06041.x>

BIBLIOGRAFÍA

- Zhao, W., Beers, D. R., Hooten, K. G., Sieglaff, D. H., Zhang, A., Kalyana-Sundaram, S., Traini, C. M., Halsey, W. S., Hughes, A. M., Sathe, G. M., Livi, G. P., Fan, G.-H., & Appel, S. H. (2017). Characterization of Gene Expression Phenotype in Amyotrophic Lateral Sclerosis Monocytes. *JAMA Neurology*, 74(6), 677-685. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.0357>
- Zheng, X., Sun, T., & Wang, X. (2013). Activation of type 2 cannabinoid receptors (CB2R) promotes fatty acid oxidation through the SIRT1/PGC-1 α pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(3), 377-381. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.108>
- Zhou, B., Zuo, Y., & Jiang, R. (2019a). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6), 665-673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>
- Zhou, J., Li, A., Li, X., & Yi, J. (2019b). Dysregulated mitochondrial Ca²⁺ and ROS signaling in skeletal muscle of ALS mouse model. *Archives of biochemistry and biophysics*, 663, 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.024>
- Zhu, D., Zhang, J., Hashem, J., Gao, F., & Chen, C. (2023a). Inhibition of 2-arachidonoylglycerol degradation enhances glial immunity by single-cell transcriptomic analysis. *Journal of Neuroinflammation*, 20(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02701-4>
- Zhu, Q., Zhou, J., Zhang, Y., Huang, H., Han, J., Cao, B., Xu, D., Zhao, Y., & Chen, G. (2023b). Risk factors associated with amyotrophic lateral sclerosis based on the observational study: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1196722. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1196722>
- Zhu, L., Li, S., Li, X.-J., & Yin, P. (2023c). Pathological insights from amyotrophic lateral sclerosis animal models: Comparisons, limitations, and challenges. *Translational Neurodegeneration*, 12, 46. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00377-7>
- 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., Helferich, A. M., Hengerer, B., Gottschalk, K.-E., Hill, O., Kluge, M., ... Weishaupt, J. H. (2016). Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathologica*, 132(3), 391-411. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1548-y>
- Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>
- 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. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 88(7), 540-549. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315018>

