



Programa de doctorado en Biociencias Moleculares

**EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA PATOLOGÍA Y TERAPIA DE
LA ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO A**

Adrián Bartoll Andrés

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**El Sistema Endocannabinoide en la patología y terapia de la enfermedad de Niemann
Pick tipo A**

Memoria presentada por Adrián Bartoll Andrés, licenciado en farmacia, para optar al grado de Doctor en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directora: María Dolores Ledesma Muñoz

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a los fondos concedidos por la Wylder Nation Foundation estadounidense y por el Ministerio español de Economía y Competitividad. Su desarrollo ha tenido lugar en el laboratorio de la Dra. M^a Dolores Ledesma Muñoz, en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

La doctora María Dolores Ledesma, Científico titular del CSIC y directora de esta Tesis Doctoral, hace constar:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “**El Sistema Endocannabinoide en la patología y terapia de la enfermedad de Niemann Pick tipo A**” ha sido realizado por Adrián Bartoll Andrés bajo su dirección y supervisión, dentro del programa de Doctorado en Biociencias Moleculares del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Por reunir los requisitos de rigor científico, innovación y correcta aplicación metodológica, da su Visto Bueno a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

A mi familia,

Resumen

Niemann Pick tipo A (NPA) es una enfermedad rara que provoca disfunción lisosomal y graves trastornos neurológicos que acaban con la vida de los pacientes en la infancia. NPA está causada por mutaciones en el gen que codifica para la esfingomielinasa ácida (ASM), enzima que degrada la esfingomielina (SM). La pérdida de función de ASM causa la acumulación de este lípido en los lisosomas y membrana plasmática de las células. El incremento de SM en las neuronas es un elemento clave en la patología de NPA que conduce a la neurodegeneración. En esta tesis se desvela la influencia de la SM en el sistema endocannabinoide (SECB), las alteraciones de este sistema en NPA y cómo su potenciación farmacológica tiene efectos terapéuticos en un modelo murino para NPA que carece de ASM (ASMKo).

El SECB está presente en el cerebro donde a través de ligandos lipídicos (anandamida y 2-Araquidonilglicerol) y sus receptores (CB₁ y CB₂) contribuye a los procesos de aprendizaje y memoria así como al control de emociones. Además, la activación del receptor CB₁ se ha relacionado con el metabolismo de la SM en astrocitos al estimular la esfingomielinasa neutral.

Los resultados obtenidos durante esta tesis en los ratones ASMKo y en muestras de un paciente NPA demuestran que los altos niveles de SM reducen la expresión de CB₁ en el cerebro y en neuronas en cultivo y bloquean a este receptor en los lisosomas. La activación farmacológica de CB₁, *in vitro* e *in vivo* mediante la inhibición de la enzima que degrada su ligando anandamida, reduce la cantidad de SM y las anomalías lisosomales en neuronas ASMKo, previene la neurodegeneración, alivia las alteraciones cognitivas y psiquiátricas y alarga la esperanza de vida de ratones ASMKo.

La investigación realizada aporta datos novedosos sobre la regulación del SECB y sus alteraciones en NPA. Además, proporciona una estrategia terapéutica no invasiva para esta enfermedad que hoy en día no tiene ningún tratamiento.

Abstract

Niemann Pick type A (NPA) is a rare disease leading to lysosomal dysfunction and severe neurological alterations that result in death in early childhood. NPA is caused by mutations in the gene encoding for the acid sphingomyelinase (ASM), an enzyme responsible for sphingomyelin (SM) degradation. ASM loss of function causes SM accumulation in the lysosomes and the plasma membrane of cells. The increased SM levels in neurons are a key pathological event in NPA that promotes neurodegeneration. This PhD work unveils the influence of SM in the endocannabinoid system (ECS), the alterations in this system in NPA and how its pharmacological enhancement has therapeutic effects in a mouse model for NPA that lacks ASM (ASMKo).

The ECS is present in the brain where, through its lipidic ligands (anandamide and 2-Araquidonilglycerol) and their receptors (CB₁ and CB₂), contributes to learning and memory processes as well as to the control of emotions. Moreover, CB₁ activation has been related to SM metabolism in astrocytes by the stimulation of the neutral sphingomyelinase.

The results obtained during this PhD, in the ASMKo mice and in the brain of an NPA patient, demonstrate that high SM levels reduce CB₁ expression in the brain and cultured neurons and block this receptor in the lysosomes. The *in vitro* and *in vivo* pharmacological activation of CB₁, through the inhibition of the anandamide degrading enzyme, reduces SM levels and the lysosome alterations in ASMKo neurons, prevents neurodegeneration, alleviates cognitive and psychiatric alterations and extends life span in ASMKo mice.

This research provides with novel data on the ECS regulation and on the alterations of this system in NPA. Moreover, the work done offers a non-invasive therapeutic strategy for this disease that nowadays has no treatment.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los lípidos, componentes esenciales para la vida	1
1.1.1. Los esfingolípidos	2
1.1.2. La SM y su relevancia	3
1.1.3. El ciclo de la SM.....	5
1.2. La enfermedad de Niemann Pick	8
1.2.1. Modelo animal para NPA, el ratón ASMKo	9
1.2.2. Estrategias terapéuticas para NPA	10
1.3. El Sistema Endocannabinoide, desde la planta Cannabis Sativa a un sistema de modulación lipídico.	13
1.3.1. Los componentes del SECB.....	14
1.3.2. La relación entre el SECB y la NSM	16
1.4. En la búsqueda de una terapia para NPA, el análisis bioinformático de Biovista® ..	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Anticuerpos	21
3.2. Muestras humanas	21
3.3. Ratones	22
3.3.1. Características y mantenimiento.....	22
3.3.2. Genotipado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
3.3.3. Sacrificio de ratones, disección y tratamiento del tejido.....	23
3.4. Cultivos primarios de neuronas hipocámpales y corticales.....	24
3.4.1. Tratamientos en neuronas en cultivo.....	25
3.5. Ensayos bioquímicos	25
3.5.1. Determinación de la concentración de proteínas	25
3.5.2. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)	26
3.5.3. Cuantificación de lípidos.....	27
3.6. Análisis por microscopía	29
3.6.1. Inmunofluorescencia en muestras humanas	29
3.6.2. Inmunofluorescencia en neuronas en cultivo.....	29
3.6.3. Inmunofluorescencia en cerebro e hígado	31
3.6.4. Tinción Hematoxilina-Eosina en cerebro e hígado	31

3.7. Tests de comportamiento.....	31
3.7.1. Test de coordinación motora: Rota-rod	32
3.7.2. Test de memoria y aprendizaje: Prueba del laberinto en Y (Y-maze).....	32
3.7.3. Test de síntomas de ansiedad: Prueba del laberinto elevado en cruz (Elevated Plus maze)	32
.....	32
3.7.4. Tests de síntomas de depresión: Prueba de suspensión por la cola (Tail Suspension)....	33
3.8. Medida semicuantitativa del ARNm (qPCR).....	33
3.9. Análisis Estadístico	34
3.9.1. Comparaciones simples	34
3.9.2. Comparaciones múltiples	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Caracterización de las alteraciones del Sistema Endocannabinoide en el cerebro de ratones ASMKo.....	36
4.1.1. Los niveles de AEA y CB ₂ no están alterados mientras que los niveles de 2-AG están ligeramente disminuidos en el cerebro de ratones ASMKo.....	36
4.1.2. Los niveles de CB ₁ están disminuidos en el cerebro de ratones ASMKo y de un paciente con NPA y su distribución está alterada en neuronas ASMKo.....	38
4.1.3. El aumento de SM causa las alteraciones en niveles y distribución de CB ₁ en neuronas ASMKo	42
4.2. La activación del Sistema Endocannabinoide como terapia para NPA.....	46
4.2.1. La aplicación de AEA exógena reduce la SM en cultivos neuronales ASMKo a través de la NSM.	46
4.2.2 La estimulación de CB ₁ mediante inhibidores de la FAAH provoca una disminución de la SM en neuronas ASMKo en cultivo.....	48
4.2.3. Los FAAHi no causan toxicidad en neuronas ASMKo en cultivo.....	50
4.3. El tratamiento oral con PF durante dos meses tiene efectos terapéuticos en ratones ASMKo.....	51
4.3.1. El tratamiento con PF mejora el incremento de peso corporal y normaliza el comportamiento motor, cognitivo y psiquiátrico en ratones ASMKo	52
4.3.2. El tratamiento con PF reduce la neurodegeneración, la astrogliosis, la microgliosis y el tamaño de los lisosomas en el cerebelo de ratones ASMKo.....	56
4.3.3. El tratamiento con PF no cambia los niveles de CB ₁ pero aumenta los niveles de AEA y de NSM en el cerebro de ratones ASMKo.....	60
4.4.3. El tratamiento con PF reduce los niveles de SM en cerebro y tejidos periféricos de los ratones ASMKo y alarga su esperanza de vida.	63
4.4. El tratamiento agudo con PF en estadios avanzados de la enfermedad no produce toxicidad y disminuye la SM y la inflamación en ratones ASMKo	66
4.4.1. El tratamiento agudo con PF en ratones ASMKo de 4 meses no evidencia toxicidad a ninguna de las dosis utilizadas	67
4.4.2. El tratamiento agudo con dosis altas de PF reduce ligeramente la SM en corteza y la inflamación en cerebro e hígado de ratones ASMKo.....	68
5. DISCUSIÓN.....	73

5.1. Influencia de la SM sobre el CB ₁ en la membrana plasmática, su relación con los receptores mGlu5 y con el envejecimiento.....	73
5.2. Modificaciones del SECB y su relevancia patológica	78
5.3. Uso del SECB para enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas.....	80
5.4. Buscando una terapia para NPA	83
6. CONCLUSIONES.....	86
BIBLIOGRAFÍA.....	87

Abreviaturas

2-AG: 2-Araquidonilglicerol

AEA: Anandamida

AlkSM: Esfingomielinasa Alcalina

ASM: Esfingomielinasa ácida

BSA: Seroalbúmina bovina

CA1: *Cornu ammon 1* (hipocampo)

CA3: *Cornu ammon 3* (hipocampo)

CB₁: Receptor cannabinoide CB₁

CB₂: Receptor cannabinoide CB₂

CoA: Coenzima A

DAG: Diacilglicerol

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

FBS: Suero bovino fetal

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

HVA: Ácido homovanílico

H/E: Hematoxilina / Eosina

IF: Inmunofluorescencia

LSD: Enfermedad de depósito lisosomal

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2

mGlu1: Receptor metabotrópico de glutamato 1

mGlu5: Receptor metabotrópico de glutamato 5

NGS: Suero de cabra fetal

NPA: Enfermedad de Niemann Pick tipo A

NPB: Enfermedad de Niemann Pick tipo B

NPC: Enfermedad de Niemann Pick tipo C

NSM: Esfingomielinasa Neutral

PFA: paraformaldehído

PBS: Tampón fosfato salino

RE: Retículo endoplasmático

SECB: Sistema Endocannabinoide

SM: Esfingomielina

SMPD: Esfingomielina fosfodiesterasa

SMS: Esfingomielina sintasa

TrkB: Receptor de tirosina quinasa B

TRPV1: Receptor de potencial transitorio V1

WB: Western blot

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de esta tesis doctoral trata sobre la relación entre varios lípidos, más concretamente entre la esfingomielina (SM) y el sistema endocannabinoide (SECB). Con esto se pretende destacar la importancia de este heterogéneo grupo de moléculas en el organismo. Como veremos más adelante, tienen gran relevancia en el correcto funcionamiento de nuestro cerebro. Por ejemplo, tan solo con un incremento de la concentración de SM que duplique la homeostática, se producen cambios en poblaciones de receptores, en el correcto tráfico de proteínas y hasta en la memoria. Para estudiar estos cambios vamos a realizar una serie de técnicas y experimentos que detallo en la sección de material y métodos. Y tras la descripción detallada de los resultados obtenidos en este periodo, pasaré a plantear algunas dudas y a argumentar la importancia de estos hallazgos en la discusión.

1.1. Los lípidos, componentes esenciales para la vida

Los lípidos son un conjunto numeroso y heterogéneo de moléculas orgánicas que están definidas por su baja solubilidad en agua, a la vez que son solubles en ciertos disolventes orgánicos como el cloroformo. Están compuestos principalmente de carbono, hidrógeno y otros átomos minoritarios como oxígeno, fósforo, nitrógeno o azufre. A su vez, se caracterizan por tener una región hidrofóbica e hidrófila, obteniendo así el llamado carácter anfipático. Esta característica es vital para todas las células, puesto que los lípidos son los responsables de la formación de membranas, creando una bicapa. En esta membrana las partes hidrofóbicas antes mencionadas se enfrentan entre sí, y las partes hidrófilas se exponen al ambiente acuoso. Con esta propiedad se aísla el contenido intracelular del ambiente extracelular, formando unas membranas selectivas semirrígidas que permitirán el tráfico de moléculas según su disposición, distribución y afinidad.

Clásicamente, los lípidos se han clasificado en dos grupos atendiendo a su composición molecular, los lípidos “simples” y “complejos”. Los lípidos “simples” (ácidos grasos, acilgliceroles, esteroides,...) que al hidrolizarse se obtienen dos metabolitos como máximo, mientras que los “complejos” (glicoesfingolípidos y glicerofosfolípidos) generan tres o más moléculas. Además de su composición molecular, este grupo también se puede clasificar según las funciones que desempeñen, por ejemplo si son reserva energética (como los triglicéridos), si tienen función reguladora (como hormonas esteroideas) o si tienen función estructural (como los esfingolípidos, de los que hablaremos a continuación)

1.1.1. Los esfingolípidos

Dentro de los lípidos, un grupo que forma parte de las membranas celulares de los mamíferos es el de los esfingolípidos (**Figura I 1**). Su estructura está dividida en dos partes: por un lado el lípido hidrofóbico, la esfingosina, que se une a un ácido graso de la membrana por el grupo amino formando la ceramida (Cer), formando así el llamado esqueleto de esfingosina, y por el otro lado, la parte hidrofílica unida a través de un grupo hidroxilo. Este grupo hidroxilo puede ser fosfocolina en el caso de la SM o un carbohidrato en el caso de los glucoesfingolípidos. En este grupo encontramos los cerebrósidos, con un solo residuo de azúcar, los globósidos con más de un azúcar o un ácido siálico en el caso de los gangliósidos. Los más abundantes son los galactocerebrósidos que se unen a galactosa y los glucocerebrósidos que se unen a glucosa (Ishibashi et al., 2013).

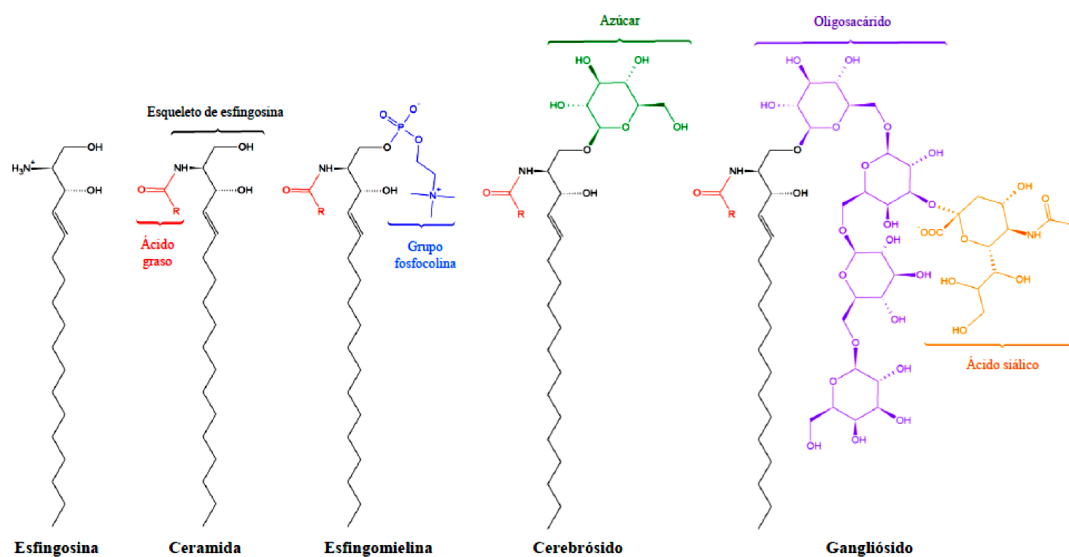


Figura 1 Estructura de los tipos de esfingolípidos. Presentan una estructura base de esfingosina, que junto con el AG en el grupo amino se forma la Cer. Desde este punto (esqueleto de esfingosina o Cer) se forman los demás tipos de esfingolípidos por grupos añadidos en la parte hidroxilo.

Los esfingolípidos no solo tienen una función estructural en las membranas celulares, se han identificado varios esfingolípidos con función de señalización, como la inhibición de la proteína-quinasa C por parte de la esfingosina (Hannun et al., 1986), o la regulación de la apoptosis por la Cer (Hannun, 1994). Y debido a la alta concentración de SM en las membranas celulares, en especial de las neuronas, así como al gran número de funciones que desempeña, dedicaremos especial atención a uno de estos esfingolípidos en esta tesis, la SM.

1.1.2. La SM y su relevancia

El nombre de SM fue acuñado por el reconocido pionero en neuroquímica Johann Ludwig Wilhelm Thudichum (1829-1901). La SM es el esfingolípidos más abundante en las células eucariotas y un componente mayoritario en la membrana plasmática. Esta función estructural viene determinada por su composición química. La SM está compuesta por una Cer con una cadena de ácido graso que varía en su longitud (de 16 a 24 carbonos) y en su grado de hidrogenación. Por esas variaciones, la SM puede contener ácidos grasos saturados,

monoinsaturados o poliinsaturados. Aunque la función específica de cada especie de SM está poco estudiada, la gran cantidad de tipos lipídicos regulan la fluidez de la membrana. Este lípido se encuentra en la bicapa espacialmente restringido porque el tamaño de su cabeza polar impide el paso entre ambas caras de la membrana (proceso llamado *flipping*). Por lo tanto necesita a las flipasas, proteínas encargadas del transporte de lípidos entre membranas, para cambiar de localización. Generalmente la SM se encuentra abundante en la cara luminal del aparato de Golgi o en la capa externa de la membrana plasmática.

Además de ser el esfingolípido mayoritario en la membrana plasmática, la SM tiene la capacidad de intercalarse al colesterol (Kan et al., 1991). Esta función es particularmente importante en la formación de las balsas lipídicas o “Lipid Rafts”, que son dominios de membrana enriquecidos en colesterol y SM. Estos dominios compactan la membrana y se encargan de regular la señalización celular, la organización de las proteínas y receptores presentes en la membrana, y los procesos de exocitosis y endocitosis independiente de clatrina (Simons y Ikonen, 1997). Cuando hay cambios en la concentración de SM, la composición de las balsas lipídicas se ve afectada. Estos cambios regulan la señalización celular. Por ejemplo, en las neuronas, un aumento de SM permite la salida de estas balsas del receptor de neuronal TrkB (receptor de tirosina quinasa B), activándolo y generando un mecanismo que aumenta la supervivencia celular (Trovo et al., 2011).

Se ha observado también que un aumento de la SM en las neuronas disminuye la población de los receptores metabotrópicos de glutamato 1 (mGlu1) perjudicando su unión a la membrana y por lo tanto su actividad. Esta reducción inhibe la cascada de señalización que lleva a ROCK y Profilina2 α , y acaba disminuyendo el contenido neuronal de F-actina (que produce un menor tamaño de las espinas dendríticas) (Arroyo et al., 2014). Al contrario, cuando hay una disminución de la SM en la membrana post-sináptica, se incrementa la actividad de la ruta RhoA-ROCK-Profilina1, incrementando la polimerización de la actina y el

tamaño de la espina dendrítica en ratones sin la proteína relacionada con actina, WIP (Franco-Villanueva et al., 2014).

De manera indirecta, la SM puede participar en la señalización celular a través de sus metabolitos. La Cer se encarga de producir una cascada de señalización apoptótica (Obeid et al., 1993), regular la maduración de los autofagosomas (Corcelle-Termeau et al., 2016) o promover la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Velasco et al., 2005). Sin embargo, la esfingosina-1-fosfato parece tener un efecto contrario a la Cer, ya que está conectada con la supervivencia celular, la proliferación y la protección contra la apoptosis (Hannun y Obeid, 2008).

1.1.3. El ciclo de la SM

La síntesis *de novo* de SM es un proceso de varias fases dentro de la vía secretora. Empieza en la parte citosólica de la membrana del retículo endoplasmático (RE) con la unión de palmitoil-CoA y Serina, a través de la enzima palmitoiltransferasa (Dickson et al., 2006). Esta enzima es el primer paso limitante en la síntesis de esfingolípidos. Esta reacción produce 3-ketoesfinganina que se transformará en esfinganina por la 3-ketoesfinganina reductasa. Luego, la cadena de ácido graso se unirá a la esfinganina por la dihidroceramida sintetasa, obteniendo dihidroceramida, que finalmente se reducirá a Cer por la dihidroceramida desaturasa. Para la síntesis de SM se transferirá la Cer al aparato de Golgi mediante tráfico de vesículas o por la proteína transportadora CERT (D'angelo et al., 2007). En el aparato de Golgi es donde la fosfocolina se unirá a la Cer por la esfingomielina sintetasa liberando diacilglicerol y obteniendo SM. Dentro de las esfingomielina sintetasa, se encuentran la SMS1 y la SMS2, las dos se encuentran en la red trans-Golgi. Desde el Golgi la SM se transportará hacia la membrana plasmática, donde se encuentra en una alta concentración, sobre todo en las balsas lipídicas, mediante la vía secretora (Lingwood y Simons, 2010). La SMS2 se ha visto su

presencia también en la membrana plasmática, permitiendo que module directamente la concentración de SM en esta parte (Tafesse et al., 2006). (Figura 1 2).

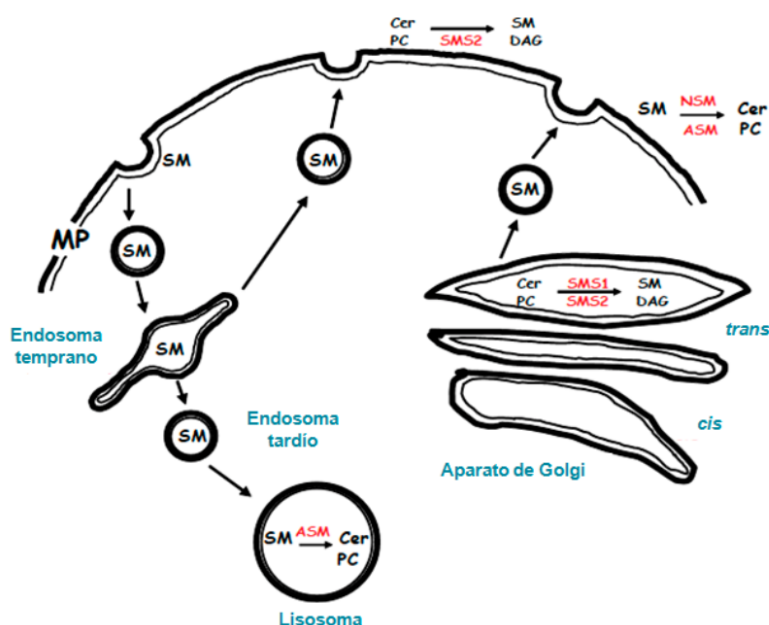


Figura 1 2 Metabolismo y catabolismo de SM. La síntesis de Sm se produce en la cara trans del aparato de Golgi, a partir de Cer y fosfolina (PC) mediante la SMS1 o SMS2 dando lugar a SM y diacilglicerol (DAG). Después estas moléculas son transportadas hasta la membrana donde serán integradas. Tras este paso, el catabolismo de SM da lugar en la membrana plasmática, donde la SM es internalizada y llevada a los endosomas para acabar en los lisosomas siendo degradada por la ASM. Por otro lado, la SM presente en la membrana plasmática puede ser degradada por la NSM o por pequeñas concentraciones de ASM. *Adaptado de (Futerman et al., 1990).*

Por otro lado, regular la concentración de SM para mantener la homeostasis de la membrana plasmática y lisosomal resulta clave para la supervivencia de las células. Por ello, la degradación de la SM está muy controlada. Las esfingomielinasas (esfingomielin fosfodiesterasas) catalizan la metabolización de SM. Hidrolizan el enlace fosfodiéster de la esfingomielina obteniendo Cer y fosfolina libre. Hay tres tipos de esfingomielinasas en los mamíferos que dependen de su pH óptimo: la esfingomielinasa ácida (ASM), la esfingomielinasa neutral (NSM) y la esfingomielinasa alcalina (AlkSM). Las tres SMasas tienen la misma función, pero sin embargo, no están relacionadas evolutivamente y presentan una distribución diferente en las distintas partes de la célula (Tani y Hannun, 2007; Marchesini et al., 2004). La AlkSM se distribuye exclusivamente en los intestinos e hígado, y participa en la

digestión de la SM a través de la dieta (Duan et al., 2003). De forma distinta, las NSM y ASM se expresan de forma generalizada y regulan el metabolismo de la SM en los tejidos y por esa razón nos centraremos especialmente en esas dos enzimas en esta tesis doctoral.

En los mamíferos se han identificado tres genes diferentes, *SMPD2*, *SMPD3* y *SMPD4* (de SM fosfodiesterasa), que codifican la NSM1, NSM2 y NSM3, respectivamente. Las tres enzimas son dependientes de Mg^{2+} y regulan diferentes vías de señalización (Clarke et al., 2007). La NSM1 está presente en el RE y en el núcleo (Tomiuk et al., 2000; Mizutani et al., 2001). Por otra parte, la NSM3 se localiza en el aparato de Golgi y en el RE (Krut et al., 2006). Dentro de las NSM, la más estudiada es la NSM2, ampliamente expresada en el cerebro y localizada en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática (Tani y Hannun, 2007) donde intercambia su localización de forma dinámica (Clarke et al., 2008).

La ASM fue la primera SMasa caracterizada en mamíferos. Está codificada por el gen *SMPD1* del cromosoma 11. Al principio fue descrita como una enzima lisosomal que metaboliza la SM de estos endosomas puesto que necesita un pH ácido de 4,5-5 (Fowler, 1969). Además, la falta de actividad de la ASM por mutaciones en el gen que codifica esta proteína, *SMPD1*, causa las enfermedades de Niemann Pick tipo A (NPA) y B (NPB). La diferencia entre estas dos enfermedades radica en el porcentaje de actividad de la ASM, desde el 0-5% en el caso de NPA, a l 10% del tipo B. Por ser el tema principal de esta tesis se va a describir más en detalle la enfermedad de Niemann Pick.

1.2. La enfermedad de Niemann Pick

El primer paciente de Niemann Pick fue diagnosticado en 1914 por el pediatra alemán Albert Niemann, este niño presentaba una masiva hepatoesplenomegalia, unos signos de neurodegeneración y acabó muriendo con 18 meses de edad. En 1927, Ludwig Pick revisó este y otros informes con los mismos síntomas y delimitó este cuadro clínico como una enfermedad diferente, que con el tiempo acabó llamándose enfermedad de Niemann Pick. 16 años más tarde, en 1930, se observó que la SM es el lípido que se acumula en las células de las personas afectadas con esta enfermedad y en los años 60, se asoció Niemann Pick con una deficiencia en la ASM (Crocker y Mays, 1961; Brady et al., 1966). Entonces fue cuando Niemann Pick se clasificó como una enfermedad de depósito lisosomal (LSD), puesto que ésta es la localización preferente de la enzima.

Esta enfermedad está dividida en tres tipos diferentes. El tipo A (NPA), en el cual nos centraremos en el desarrollo de esta tesis, y el tipo B, tienen signos clínicos diferentes, aunque ambos son causados por la deficiencia de ASM por mutaciones en el gen *SMPD1*. Varios tipos de mutaciones han sido reportadas (Levrán et al., 1991; Simonaro et al., 2002; Toth et al., 2012) y marcan la diferencia entre los porcentajes de enzima activa, del 0% en algunos casos de NPA a cerca del 10% en el tipo B. El tipo C fue descrito en 1980 en ratones por presentar una deficiencia en la ASM secundaria a un defecto en la esterificación del colesterol (Pentchev et al., 1980). 5 años más tarde, los mismos autores demostraron en células de pacientes con NPC el defecto en la esterificación de colesterol que diferenciaba este tipo del A o B (Pentchev et al., 1985). Actualmente se sabe que NPC es debida a defectos en la proteína de unión a colesterol NPC1 o NPC2.

NPA se trata de una enfermedad genética rara con una incidencia de entre 0,5 y 1 afectados por cada 100.000 nacimientos. Esta enfermedad se caracteriza por neurodegeneración, hepatoesplenomegalia, retraso psicomotor y la muerte prematura

aproximadamente a los tres años de edad. Su herencia es autosómica recesiva y está causada por mutaciones en el gen *SMPD1* que codifica la ASM y se localiza en el cromosoma 11 (Da Veiga Pereira et al., 1991). La deficiencia de ASM provoca una acumulación de SM en las células, incrementando el número y el tamaño de las vacuolas conteniendo este lípido. El cerebro de un paciente de NPA es normalmente atrófico, con una gran pérdida de neuronas en el cerebelo y gliosis en la sustancia gris y blanca, mostrando en algunas partes demielinización.

1.2.1. Modelo animal para NPA, el ratón *ASMKo*

Debido a que NPA es una enfermedad rara, se decidió generar un modelo murino que mimetizara esta enfermedad, estos ratones se produjeron con un “Knock-out” de la proteína ASM (Horinouchi et al., 1995). Presentan alta concentración de SM en la membrana plasmática y en los lisosomas, además de subir lípidos relacionados con el metabolismo de la SM como la Cer o esfingosina-1-fosfato. En estos ratones no se observa fenotipo al nacer pero desarrollan una patología similar al de NPA, teniendo alteraciones motoras y neurodegeneración a partir de los 2 meses que progresan hasta ataxia, problemas cognitivos, hepatoesplenomegalia, y la muerte prematura en torno a los 6-8 meses.

Destaca también la inflamación tisular generalizada, que produce una liberación de citocinas y moléculas proinflamatorias que están siendo usadas como biomarcadores para el transcurso de la enfermedad y para estudiar los tratamientos (Dhami et al., 2006). Es interesante recalcar que los *ASMKo* también exhiben un defecto en la vía de señalización mediada por Cer, estudiada en el contexto de la inducción de apoptosis por estrés, donde estos ratones son resistentes a la muerte celular inducida por varios agentes, como radiación o isquemia (Henry et al., 2013). Presuntamente, la falta de ASM funcional inhibe la producción de Cer y reorganiza las balsas lipídicas tras el estrés para proteger la célula contra la apoptosis.

Con el transcurso de los años, las consecuencias patológicas de esta acumulación de SM se han estudiado en los distintos tipos celulares existentes en el cerebro. Una de las primeras observaciones que se hizo de los ASMKo es la degeneración temprana y progresiva de las células de Purkinje cerebelares, que produce esas alteraciones motoras mencionadas (Horinouchi et al., 1995; Otterbach y Stoffel, 1995; Macauley et al., 2008). En relación con esta neurodegeneración, existe gliosis evidente en el cerebelo (Gabande-Rodriguez et al., 2018). Este incremento de SM produce un defecto en la autofagia, debido a la permeabilización de la membrana lisosomal (Gabande-Rodriguez et al., 2014). Además, las células presentan un incremento del estrés oxidativo, debido al aumento del calcio intracelular (Perez-Canamas et al., 2016a). Hay también en las neuronas de los ASMKo una distribución aberrante de moléculas ya que tienen un defecto en la endocitosis (Galvan et al., 2008) y tienen una alteración en la composición de mielina y una desmielinización en el sistema nervioso periférico (Buccinna et al., 2009). Por último, La SM se acumula de forma primaria en las neuronas de los ASMKo, no solo en los lisosomas, sino también en la membrana plasmática y sináptica (Galvan et al., 2008; Camoletto et al., 2009)

1.2.2. Estrategias terapéuticas para NPA

NPA es una enfermedad devastadora que siempre acaba en la muerte del paciente a una edad temprana entre los 2-3 años de edad. Actualmente no tiene tratamiento, y los trasplantes de médula osea, de células amnióticas o de hígado no han tenido impacto paliar la progresión neurológica de esta enfermedad y han producido complicaciones por la cirugía (Victor et al., 2003), haciendo necesarias nuevas aproximaciones. Cuando intentamos aproximarnos a un tratamiento para esta enfermedad tenemos que tener en cuenta varios factores. El primero que esta enfermedad tiene un comienzo muy temprano. Cuando nacen, los pacientes de NPA no tienen ningún síntoma, sin embargo, entre los 3 y 6 meses empiezan a desarrollar disfunción neurológica. En este tiempo, el daño causado por la falta de ASM es prácticamente irrecuperable, por tanto, el tratamiento o terapia debería iniciarse desde el

nacimiento o inmediatamente después. El segundo es que las terapias deberían ser consideradas si mejoran la calidad de vida. Esto es particularmente importante al trasladar resultados del ASMKo a humanos. Por ejemplo, una modesta mejora en los ASMKo es un resultado positivo experimentalmente, pero si eso implica dolor (tratamientos invasivos) o sufrimiento para la familia solo por enlentecer el declive neurológico deja de ser una opción válida. La parte buena es que en la deficiencia de ASM, un incremento de la actividad residual enzimática del 8%, ha demostrado que puede revertir la función neurológica (Jones et al., 2008), por lo tanto, el umbral terapéutico es bajo, y han surgido varias alternativas para intentar recobrar la actividad de la enzima o reducir la SM por otras vías.

Gracias al modelo animal ASMKo se han probado distintos métodos para recobrar los niveles de ASM, la proteína mutada que falla en NPA. Se intentó con trasplante de médula (Miranda et al., 1998), con terapia de reemplazo de la enzima introduciendo ASM recombinante por vía venosa (Miranda et al., 2000a; Miranda et al., 2000b) o introduciendo el gen de la ASM a través de vectores virales (Barbon et al., 2005; Miranda et al., 2000a) y se ha obtenido una disminución de la concentración de SM en varios órganos. La aplicación de terapia de reemplazo enzimático era lo más idóneo y está actualmente en uso para 7 LSDs. En cambio, estudios posteriores informaron de una toxicidad dosis dependiente atribuida al rápido aumento de Cer, que pudo ser revertida por una titración en la dosis de ASM recombinante (Murray et al., 2015). Actualmente hay dos ensayos clínicos con ASM recombinante en NPB que están obteniendo resultados favorables. Desafortunadamente, ningún estudio de los citados ha tenido efectos en el cerebro o en la patología neurológica de NPA, debido a que la proteína ASM no cruza la barrera hematoencefálica. Solo mediante la inyección estereotáxica en cerebro de adenovirus que expresan ASM se ha conseguido una reducción de SM en este órgano (Dodge et al., 2005) aunque el declive neurológico continuó progresando. Sin embargo, la aplicación de esta técnica en humanos no es posible

actualmente. Para eso, se está intentando buscar nuevas estrategias para tratar NPA y combinar junto con la inyección de ASM recombinante para tratar los síntomas periféricos.

Otra propuesta a tener en cuenta es el uso de una terapia concomitante antiinflamatoria. Como se ha mencionado anteriormente, NPA y B, así como otras LSDs, tienen una inflamación tisular generalizada que debe ser tratada de forma paralela con las terapias de reemplazo enzimático. Las terapias con chaperonas son han mostrado que estabilizan los lisosomas al unirse a los lípidos de la membrana lisosomal y activando la ASM (Kirkegaard et al., 2010). Recientemente, se han obtenido mejoras neurológicas en los ASMKo con un nuevo mecanismo de acción, que consiste en aumentar la actividad de la NSM (Arroyo et al., 2014). Esto presentaría una nueva propuesta basada en el concepto de que algunas alteraciones en los ASMKo son debidas a la acumulación de SM fuera de los lisosomas, y eso hace accesible este lípido al metabolismo por otras esfingomielinasas. Con esta nueva vía, se ha abierto el campo de búsqueda a posibles mecanismos que promuevan la actividad de la NSM y esto ha sido el punto de partida de mi tesis doctoral. Por un lado, relacionado con procesos oncológicos e inflamatorios, se observó que la estimulación aguda del receptor cannabinoide CB₁ (CB₁) promovía la actividad de la NSM para crear un pico de concentración de Cer, que generará la respuesta inflamatoria/apoptótica (Galve-Roperh et al., 2000). Por otro lado, esto lo relacionamos con el estudio de un tratamiento con cannabidiol (agonista del CB₁) en fibroblastos de un paciente de NPA, que obtuvo una reducción de SM del 70% (Burstein et al., 1984). Así, conseguimos una nueva vía que estudiar y analizar como posible tratamiento para NPA, la estimulación del SECB como diana terapéutica.

1.3. El Sistema Endocannabinoide, desde la planta Cannabis Sativa a un sistema de modulación lipídico.

La planta *Cannabis Sativa* ha sido usada por los humanos durante miles de años por sus efectos eufóricos y relajantes. El descubrimiento del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el componente psicoactivo del cannabis (Mechoulam y Gaoni, 1965), abrió el estudio a un nuevo grupo de moléculas presentes en esta planta, a la vez que empezaba a cuestionarse su potencial terapéutico en el ser humano. Desde este descubrimiento, se han identificado más de 80 compuestos en la planta, aunque solo unos pocos interactúan con el SECB. El SECB modula las regiones cerebrales y por lo tanto contribuye a prácticamente todas las funciones del sistema nervioso central.

La primera evidencia de que el THC se podía unir a un receptor en mamíferos específico fue obtenida 20 años después de su descubrimiento (Howlett, 1998). Un año después, el receptor de membrana acoplado a proteína G responsable del efecto del THC se clonó y se nombró receptor cannabinoide CB_1 (CB_1) (Matsuda et al., 1990). Pocos años más tarde, se secuenció también el que sería el receptor cannabinoide CB_2 (CB_2) (Munro et al., 1993). Además, el descubrimiento de estos dos receptores promovió la hipótesis de que existían ciertos ligandos en el organismo, que más tarde se llamarían “endocannabinoides” (Di Marzo et al., 1994) por su capacidad de estimular estos receptores. Además, se vio que estos ligandos eran lípidos derivados del glicerol. En 1992, el primer agonista endógeno de los receptores cannabinoide fue aislado del cerebro del cerdo, identificado como *N-arachidonil-etanolamina* (AEA), y nombrado *anandamida* del sánscrito “*ananda*” que significa “felicidad” (Devane et al., 1992). Por último, tres años después, se encontró un segundo ligando aislado del intestino del perro llamado *2-araquinonil-glicerol* (2-AG)

1.3.1. Los componentes del SECB

El SECB incluye un gran grupo de moléculas: dos ligandos mayoritarios basados en un araquidonil, AEA y 2-AG, y otros relacionados con estos endocannabinoides como 2-araquidonil-glicerol-eter (2-AGE), el O-araquidonil-etanolamina, N-araquidonil-dopamina, u oleamida. Dos receptores acoplados a proteínas G, CB₁ y CB₂, además de algunos receptores propuestos como parte del SECB como el TRPV1 o el GPR55. Y un gran número de enzimas implicadas en la síntesis [N-ácil-fosfatidiletanolamin fosfolipasa D (NAPE-PLD), α/β -hidrolasa tipo-4 (Abdh4), glicerofosfodiesterasa-1 (GDE1), tirosin fosfatasa N22 (PTPN22), para AEA; y diacilglicerol lipasa- α o - β (DAGL α y DAGL β), para 2-AG] o degradación [amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) para AEA; y monoacilglicerol lipasa (MAGL) y FAAH-1 para 2-AG](Di Marzo, 2009). (Figura I 3)

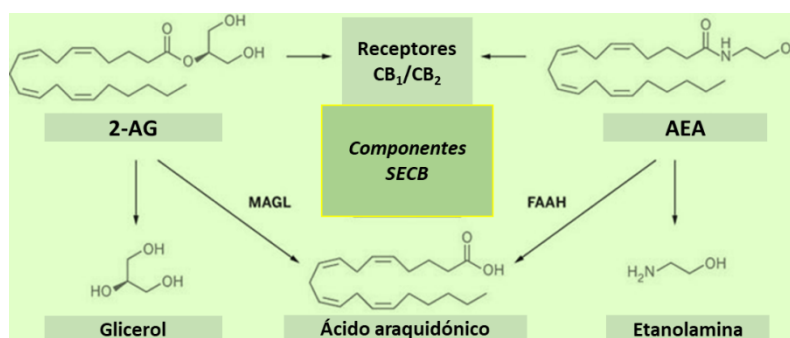


Figura I 3. Esquema de los componentes del SECB. Hay dos ligandos endógenos, 2-araquidonilglicerol (2-AG) y anandamida (AEA) que estimulan los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. La AEA se metaboliza por la enzima FAAH en componentes no activos para los receptores cannabinoides (ácido araquidónico y etanolamina) y 2-AG se metaboliza por MAGL en glicerol y ácido araquidónico.

En un grupo de estudios utilizando autoradiografías con timidina tritiada observaron una alta concentración de CB₁ en cerebelo, hipocampo, corteza y a través de la vía nigroestriatal cerebral (Herkenham et al., 1991b). Además descubrieron que la localización de este receptor se encuentra en el axón terminal (Herkenham et al., 1991a), hipotetizando que la activación de este receptor modula la liberación de neurotransmisores. El CB₂ fue identificado en 1993 y con sus niveles más altos en órganos periféricos del sistema inmune (Munro et al., 1993), aunque

también se ha hallado en el sistema nervioso central pero en una concentración menor (Gong et al., 2006). Ambos receptores están acoplados a proteínas G que modula la inhibición de la adenilato ciclasa y disminuye la producción de AMPc.

Los receptores CB₁ están localizados en la terminal presináptica de las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas, donde reducen la liberación de glutamato o GABA y regulan la neurotransmisión (Diana et al., 2003; Melis et al., 2004), aunque también se ha visto que regulan la liberación de otros neurotransmisores como noradrenalina (Carvalho y Van Bockstaele, 2012). La activación del CB₁ presináptico disminuye el flujo de calcio presináptico mediando los canales de calcio dependientes de voltaje (Wilson et al., 2001) y facilita la apertura de los canales de potasio dependientes de voltaje (Mackie et al., 1995), haciendo en ambos casos que disminuya la probabilidad de liberar neurotransmisores.

Los Ligandos endógenos del CB₁ y CB₂ mejor caracterizados son la AEA y el 2-AG. Ambos son producidos por precursores lipídicos en la membrana plasmática aunque en diferentes condiciones. Debido a sus propiedades hidrofóbicas, la AEA y 2-AG no se acumulan en vesículas, pero son liberados tras la síntesis por sus enzimas metabólicas. Recientes evidencias señalan que la AEA puede ser sintetizada de forma constitutiva y liberada tónicamente (Di et al., 2013) mientras que el 2-AG es sintetizado bajo estímulos físicos como actividad eléctrica, receptores acoplados a proteínas G, o mediante receptores esteroideos (Di et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Kim y Alger, 2010) que son asociados comúnmente con el incremento de calcio intracelular. Ambos ligandos trabajan como mensajeros retrógrados, sintetizados y liberados por la neurona post-sináptica y actúan en los receptores presinápticos para suprimir la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, también se ha visto que modula la membrana post-sináptica por acciones autocrinas (Bacci et al., 2004) e incluso incrementan la concentración de calcio y la liberación de neurotransmisores porque estos dos ligandos también activan el receptor vaniloide TRPV1 (Di Marzo et al., 1998)

1.3.2. La relación entre el SECB y la NSM

A parte de los efectos mencionados en la anterior parte de la introducción se ha observado que el SECB modula varias rutas de señalización intracelulares que están envueltas en proliferación y supervivencia, como por ejemplo la señalización de la kinasa de señalización extracelular "ERK" (Bouaboula et al., 1995) y la ruta de regulación de la Cer (Sanchez et al., 2001).

Esta última ruta ha sido explorada en esta tesis por su capacidad para activar la regulación de SM. La generación de la Cer ocurre en esta vía en un intervalo de minutos debido a la hidrólisis de la SM por la NSM. De esta forma, la activación del CB₁ produce bajada de SM en cultivos primarios de astrocitos (Blazquez et al., 1999) y en C6 gliomas (Galve-Roperh et al., 2000), en un efecto máximo alrededor de 15 minutos, concomitante a un aumento de Cer a ese tiempo. Hay evidencias de que esta generación de Cer actúa como un segundo mensajero y regula varias vías de señalización relacionadas con la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis (Kolesnick y Kronke, 1998; Hannun y Luberto, 2000). La unión entre estos receptores y la NSM involucra también a diferentes proteínas adaptadoras. Una de esas es el factor asociado a la NSM (FAN) (Adam-Klages et al., 1996). La FAN se une al dominio activo de la NSM produciendo la reducción de SM y el incremento de Cer. La función de FAN en la hidrólisis de SM ha sido apoyado por los estudios de coimmunoprecipitación, dando evidencias de la unión de FAN con la activación de CB₁ y por la resistencia de las células FAN^{-/-} para la reducción de SM (Sanchez et al., 2001)

La función de este pico de Cer inducido por los cannabinoides ha sido relacionado con funciones metabólicas (**FIGURA I 4**). Por ello, los cannabinoides estimulan la captación de glucosa (la principal fuente de energía del cerebro) y la producción de cuerpos cetónicos como alternativa cuando hay privación de glucosa (Sanchez et al., 1998) en astrocitos y ambos efectos son prevenidos con antagonistas del CB₁. La Cer regula la estimulación del consumo de

glucosa por la vía de ERK (Sanchez et al., 1998) y la estimulación de la ketogénesis por la enzima carnitina pantoiltransferasa para la oxidación de ácidos grasos (Blazquez et al., 1999). Además, una de las funciones más importantes de los astrocitos es la regulación del metabolismo del cerebro, proveyendo a las neuronas de metabolitos y sustratos para la generación de energía. Por eso se hipotetiza que este incremento de Cer para aumentar la demanda de glucosa o producir cuerpos cetónicos mediante los receptores cannabinoides es una forma de regular la homeostasis neuronal.

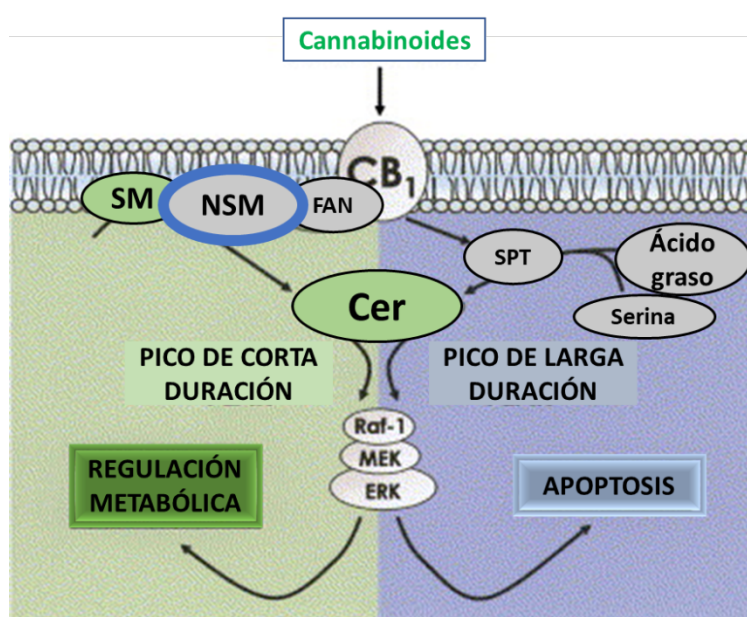


Figura 1 4 Regulación de la Cer por parte del CB₁. El CB₁ está relacionado con la síntesis de Cer, hay dos tipos de aumentos de la Cer, el pico de inmediato, producido por la NSM tras la activación del CB₁, y un segundo pico que depende de la Serina Palmitoiltransferasa (SPT) que induce la síntesis de Cer. Los dos controlan diferentes procesos, como la regulación metabólica o la apoptosis. *Adaptado de (Velasco et al., 2005)*

1.4. En la búsqueda de una terapia para NPA, el análisis bioinformático de Biovista®

Durante la inicio de esta tesis doctoral, el laboratorio obtuvo un proyecto con la empresa Biovista® para el reposicionamiento de tratamientos en NPA. Esta compañía usa un software llamado COSS™ (Sharma et al., 2011) que crea diferentes algoritmos en búsquedas bibliográficas masivas para tratar de encontrar nuevos mecanismos de acción o compuestos que trasladar porque afecten o interfieran en la enfermedad analizada (**Figura I 5**).

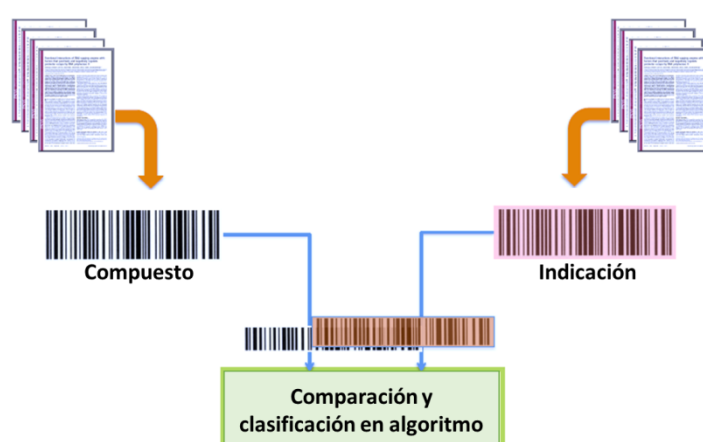


Figura I 5. Esquematación del funcionamiento de la plataforma COSS para reposicionamiento de moléculas. Usan búsquedas masivas bibliográficas para encontrar ciertas dianas según las indicaciones enviadas.

De esta forma, con este proyecto, se trataba de encontrar mecanismos moleculares para tratar o aliviar los síntomas de NPA (reduciendo la SM). Primero se les enviaron una serie de palabras claves para refinar su búsqueda como: SM, metabolismo de SM, NPA, LSD, esfingomielinasa ácida,... Mediante ese primer análisis obtuvieron cerca de 20000 compuestos con potencial terapéutico, y tras aplicar una serie de refinamientos redujeron su número a 1000. Además, por nuestra parte, les enviamos nuevas indicaciones para acotar la búsqueda, como por ejemplo, los compuestos deben cruzar la barrera hematoencefálica y un perfil seguro de toxicidad probada en población pediátrica.

Mediante este procedimiento, el proyecto llegó a un grupo de compuestos y el laboratorio seleccionó a los inhibidores de la enzima FAAH del SECB. La compañía bioinformática nos informó de los artículos relacionados con la reducción de SM a través de la NSM (Galve-Roperh et al., 2000) y la reducción de SM que obtuvieron en fibroblastos de pacientes de NPA con cannabidiol (agonista del CB₁). Así, enfocaron nuestra búsqueda en tratar de potenciar el SECB en NPA o en los ASMKo. De forma general, la modulación del SECB está siendo ampliamente estudiada para tratar diferentes patologías, sobre todo relacionadas con procesos inflamatorios como la esclerosis múltiple o enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Saito et al., 2012). Además, la modulación del CB₁ y CB₂ con ligandos endógenos como AEA o 2-AG puede ayudar a mejorar la memoria, el apetito, el sueño, la respuesta al estrés, la termorregulación o la analgesia (Ulugol, 2014). En cuanto a su efecto en pediatría, los ensayos clínicos con cannabidiol para epilepsia muestran un perfil aceptable de efectos adversos y buena seguridad (Devinsky et al., 2016).

Más concretamente, los inhibidores de FAAH fueron propuestos como candidatos para tratar NPA porque producen analgesia, son antiinflamatorios, ansiolíticos y antidepresivos sin los efectos secundarios psicoactivos de los agonistas del CB₁ (Ahn et al., 2009). Los inhibidores de la FAAH que seleccionamos cruzan la barrera hematoencefálica (Zhuang et al., 2013). Además están actualmente en diferentes ensayos clínicos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades, como dolor osteoartístico, epilepsia, síndrome de Tourette, drogodependencias, ansiedad social, insomnio,... (Bisogno y Maccarrone, 2013).

2. OBJETIVOS

En esta tesis doctoral nos hemos planteado estudiar la relación existente entre el SECB y el metabolismo de SM, así como caracterizar y evaluar el estado del SECB en un modelo con altas concentraciones de SM. Para ello se propusieron los siguientes objetivos:

- Analizar los distintos componentes del Sistema Endocannabinoide en los ratones ASMKo y caracterizar las posibles alteraciones existentes.

- Estudiar la eficacia de terapias basadas en la estimulación del Sistema Endocannabinoide en ratones ASMKo tanto *in vitro* como *in vivo* en un tratamiento crónico o agudo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en la detección de proteínas por inmunotransferencia (Western Blot) y por inmunofluorescencia se describen en la Tabla I. En los ensayos de WB se utilizaron anticuerpos secundarios (Dako) de conejo anti-ratón y de cabra anti-conejo acoplados a peroxidasa a una dilución 1/1000. En los estudios de inmunofluorescencia se utilizaron anticuerpos secundarios Alexa 488, 555 o 647 (Invitrogen) de cabra anti-conejo, anti-ratón o anti-pollo acoplados a distintos fluoróforos a una dilución 1/1000.

Proteína	Casa Comercial	Referencia	Especie	Dil. WB	Dil. IF
Calbindina	Swant	Cb300	Rata		1:1000
CB₁	Frontier Institute	AF380	Conejo	1:500	1:500
CB₂	R&D systems	352110	Ratón	1:250	
F4/80	Abcam	6640	Ratón		1:500
Flotilina1	BD Bioscience	610821	Ratón	1:1000	
GAPDH	abcam	ab8245	Ratón	1:5000	
GFAP	Millipore	MAB3402	Ratón		1:1000
Iba1	Wako	019-19741	Rata		1:500
Lamp1	SMOC CBM	Lamp1	Rata	1:250	
MAP2	Biologend	822501	Pollo		1:1000
mGlu5	Millipore	AB5675	Ratón	1:500	
NSM2	Santa Cruz	sc-166637	Rata	1:250	
PSD-95	BD	610495	Ratón	1:1000	

Tabla I. Anticuerpos usados en WB e inmunofluorescencia.

3.2. Muestras humanas

Las muestras del individuo control (2 años de edad) y del paciente NPA (3 años) fueron obtenidas del Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid, España) y de la fundación Wylder Nation Foundation (Scottsdale, EE.UU.), respectivamente. La muestra control presentó un patrón de maduración normal sin anomalías en el cerebro en un examen histológico de rutina. Los tejidos fueron fijados con paraformaldehído 4% y embebidos posteriormente en parafina (Sigma) para su procesamiento.

3.3. Ratones

3.3.1. Características y mantenimiento

Los estudios se llevaron a cabo en ratones C57BL/6 en los que se ha suprimido la expresión del gen *SMPD1*, que codifica para la ASM, por inserción de una construcción de neomicina en el exón 2 del gen, tal como se describe en (Horinouchi et al., 1995). Estos ratones desarrollan un fenotipo muy similar al de la enfermedad de NPA (Horinouchi et al., 1995). Como controles se usaron ratones hermanos derivados de cruces de heterocigotos que no habían heredado la mutación. La esperanza de vida de los ratones ASMKo es de 6-8 meses. En esta tesis se utilizaron ratones de ambos sexos de edades que corresponden a estadios tempranos (1,5 meses) o avanzados (4 meses) de la enfermedad.

Los ratones se alojaron en el animalario del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" en grupos de un máximo de cinco animales por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum*. Se mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 y 12 horas respectivamente con el inicio de la luz a las 8 a.m. El uso de ratones de experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la comisión de Bioética del CSIC y de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 58/14 y PROEX 175/17).

3.3.2. Genotipado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar el genotipo de los ratones se extrajo ADN genómico de una pequeña porción de la cola que fue digerida con 10 mg/ml de proteinasa K (Merck) en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, 1% SDS) a 60 °C durante dos horas. El ADN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol frío mediante centrifugación para ser posteriormente resuspendido en agua miliQ estéril. El genotipado se llevó a cabo mediante PCR (Mullis y Faloona, 1987). Ésta se realizó en un medio que contenía el tampón de la Taq ADN polimerasa (5X), dNTPs 0.25 mM, MgCl₂ 1.5 μM, oligo sentido 0.5 μM, oligos antisentido

0.5 μ M, 2 μ l de DNA y 1.25 U de Taq ADN polimerasa (Promega), en un volumen final de 12 μ l. Para la amplificación en un termociclador se usó un programa consistente en 30 ciclos de 93 °C 1 minuto, 58 °C 1 minuto y 72 °C 1 minuto con un oligonucleótido sentido que reconoce el gen codificante de la ASM (AGCCGTGTCCTCTTCCTTAC) y dos oligonucleótidos antisentido; uno de ellos que reconoce el inserto de resistencia a neomicina (GGCTACCCGTGATATTGCTG) y otro que reconoce el exón 2 del gen de la ASM (CGAGACTGTTGCCAGACATC). Como resultado se detectó una única banda de 269 pb en ratones control (+/+) correspondiente al gen endógeno, una única banda de 523 pb en ratones homocigotos para el noqueo del gen (-/-) y ambas bandas en ratones heterocigotos para el noqueo del gen (+/-) (**Figura M 1**) (Horinouchi et al., 1995).

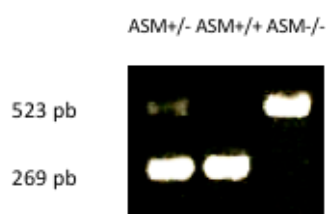


Figura M 1. Genotipado de ratones por PCR. Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se muestran los tamaños de bandas que identifican ratones ASM +/+ (269pb), ASM +/- (269pb y 523pb) y ASM -/- (523pb).

3.3.3. Sacrificio de ratones, disección y tratamiento del tejido

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical o usando una cámara de CO₂. A continuación, se diseccionó el encéfalo (obteniendo el hipocampo, el cerebelo y la corteza de cada hemisferio), el hígado, el bazo y los pulmones. Estos tejidos se trataron de diferentes formas:

a) Preparación de homogenizados para análisis bioquímicos.

Los distintos tejidos se homogenizaron con un homogenizador de vidrio-teflón en una solución tampón conteniendo MES [ácido 2-(N-Morpholino)ethanesulfónico] 25 mM pH 7, NaCl 150 mM, EDTA (ácido etildiaminotetraacético) 2 mM, NaF 1 mM, inhibidores de fosfatas (Sigma-Aldrich) e inhibidores de proteasas (COMPLETE™ de Roche).

b) Preparación de cortes para inmunofluorescencia.

Los tejidos destinados a técnicas inmunohistoquímicas se trataron en paraformaldehído (PFA) al 4% para su fijación durante una noche a 4 °C tras la que se incubaron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se incluyeron en bloques de Tissue-Tek OCT (Sakura) para la obtención de secciones sagitales de 40 µm de grosor con un criostato (Leica). Las secciones se recogieron en una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol al 30 %, glicerol al 26% y tampón fosfato 0.1 M pH 7.

3.4. Cultivos primarios de neuronas hipocampales y corticales

Los cultivos primarios de neuronas se prepararon siguiendo el protocolo descrito en (Dotti et al., 1988). Se diseccionó el cerebro de embriones de ratones en el día 16 de gestación (E16) y se extrajo el hipocampo o la corteza en medio HBSS (Hanks Buer Salt Solution Ca²⁺ and Mg²⁺ free, GIBCO Invitrogen) que se incubaron con tripsina 0.25% (GIBCO) durante 15 minutos a 37 °C. A continuación se disoció mecánicamente el tejido con ayuda de una pipeta pasteur, se resuspendió en medio MEM (Minimum Essential Media, GIBCO Invitrogen) conteniendo glucosa 20% y suero de caballo 10% (Horse Serum heat inactivated, Invitrogen) y se cuantificó el número de células en una cámara de Neubauer. Las células se plaquearon a una densidad de 9000 células/cm² sobre cubreobjetos para inmunofluorescencia o de 20.000 células/cm² en placas para ensayos bioquímicos. Los cubreobjetos habían sido previamente esterilizados a 235°C y tanto éstos como las placas se trataron con polilisina (Sigma-Aldrich, 1 y 0.1 mg/ml respectivamente) en tampón borato durante al menos 24 h ante del plaqueo. Se permitió la adhesión celular durante tres horas tras las que se cambió el medio a Neurobasal

suplementado con B27 y Glutamax-I (GIBCO Invitrogen). Se realizaron cambios parciales de medio cada 3 días y a partir del octavo día de cultivo se eliminó el suplemento Glutamax para evitar la posible excitotoxicidad.

3.4.1. *Tratamientos en neuronas en cultivo*

Los tratamientos se llevaron a cabo en neuronas cultivadas por un mínimo de 12 días cuando han alcanzado la total maduración. Los compuestos añadidos al medio de cultivo en los diferentes experimentos y sus condiciones de uso se describen en la Tabla II.

Reactivo	Uso	Conc.	Solvente	Referencia
AEA	Endocannabinoide activador de CB ₁	5-100µM	Etanol	Sigma-Aldrich
ASMasa	Enzima catalítica de la SM	0,1U/100µL	PBS 1x	Sigma-Aldrich
SM	Lípido exógeno que se incorpora a las membranas celulares	40µM	Etanol	Sigma-Aldrich
GW	Inhibidor de la enzima NSM	15µM	DMSO	Sigma-Aldrich
JNJ	Inhibidor de la enzima FAAH	5-100µM	DMSO	Sigma-Aldrich
PF	Inhibidor de la enzima FAAH	5-100µM	DMSO	MedChemExpress
URB	Inhibidor de la enzima FAAH	5-100µM	DMSO	Selleckchem

Tabla II. Tratamientos exógenos usados en cultivos primarios de neuronas.

3.5. *Ensayos bioquímicos*

3.5.1. *Determinación de la concentración de proteínas*

La concentración de proteínas en los homogenizados de tejido o de células se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific). Este método combina la reacción de las proteínas con iones Cu²⁺ en medio alcalino (produciendo Cu⁺, reacción de Biuret) con un reactivo altamente selectivo y sensible: el ácido bicinconínico. El resultado de esta reacción es un producto color púrpura que presenta absorbancia a 562 nm. La reducción de los cationes cobre está causada principalmente por tres residuos aminoácidos de las proteínas: cisteína, tirosina y triptófano. La concentración de proteína se calculó interpolando los datos de absorbancia a 562 nm en una recta patrón

obtenida en base a concentraciones conocidas crecientes de 20 a 2000 g/ml de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) diluida en agua.

3.5.2. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)

Los extractos proteicos se hirvieron a 99 °C durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis (Tris 25 mM pH 6.8, dodecil sulfato sódico (SDS) 1 %, glicerol 3.5 %, 2-mercaptoetanol 0.4% y azul de bromofenol 0.04 %). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa a 300mA durante 1 hora utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. Para comprobar la eficiencia de la transferencia las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. A continuación se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBS con Tween-20 0.1% durante 45 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en medio de bloqueo toda la noche a 4°C. Después de lavar las membranas 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween-20 0.1% se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (Dako), diluidos en medio de bloqueo (1/5000), durante 45 minutos. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se visualizaron mediante el sistema ECL (PerkinElmer) en una cámara digital ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare) en condiciones de exposición no saturantes. Los valores de densitometría de las bandas producidas por cada anticuerpo se cuantificaron usando el software Quantity One (Bio-Rad) y se normalizaron con respecto a los valores obtenidos para las proteínas consideradas controles de carga, GAPDH o PSD-95, tanto para extractos totales como para extractos de cultivos.

3.5.3. Cuantificación de lípidos

a) Medida de SM.

La SM se midió usando un protocolo fluorimétrico modificado a partir de (Hojjati y Jiang, 2006). Los extractos de membrana, conteniendo 30 µg y 15 µg en el caso de muestras wt y ASMKo, respectivamente, se secaron con nitrógeno en presencia del detergente no iónico Thesit (Sigma-Aldrich) para la completa disgregación de los lípidos de membrana y el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua. Después se añadieron 150 µl de la mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 0.5 mM, peroxidasa de rábano (HRP) 10 U/ml (Sigma-Aldrich), esfingomielinasa C 0.5 U/ml (Sigma-Aldrich), fosfatasa alcalina 10 U/ml (Sigma-Aldrich), colina oxidasa 1 U/ml (Sigma-Aldrich) y ácido homovanílico 1.2 mM (Sigma-Aldrich) y se incubó una hora a 37 °C, temperatura óptima para las enzimas de la mezcla. La SM presente en la muestra se degrada por la esfingomielinasa C en Ceramida y fosforilcolina, que a su vez se desfosforila por la fosfatasa alcalina. El producto resultante es sustrato de la colina oxidasa, cuya reacción produce peróxido de hidrógeno que en presencia de ácido homovanílico (HVA) genera un producto fluorescente a 420 nm cuando se excita a una longitud de onda de 327 nm (Figura 3.2). De esta manera la fluorescencia observada es proporcional a la cantidad de SM presente en la muestra.

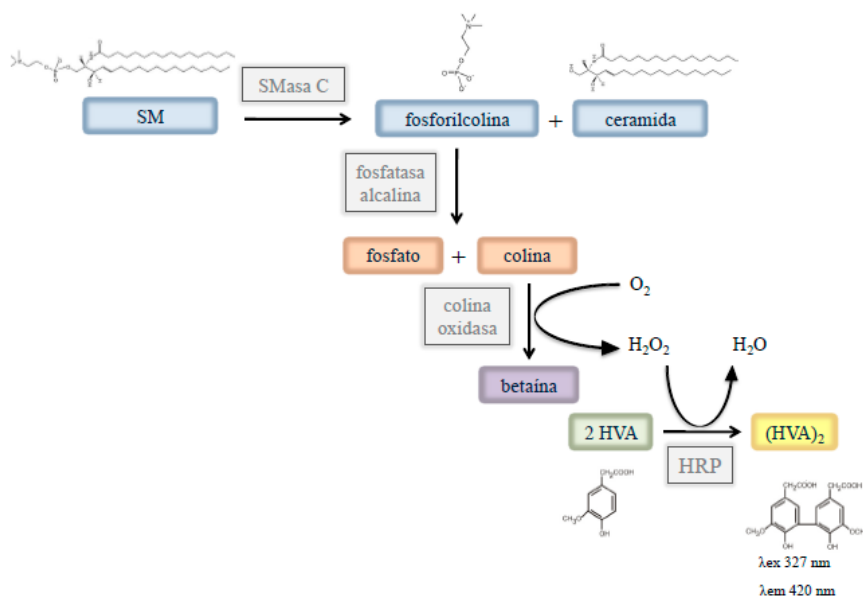


Figura 3.2. Esquema de las reacciones en cadena en el ensayo fluorimétrico para la cuantificación de SM.

Después de una hora de incubación a temperatura ambiente la reacción se detuvo con 1 mL de tampón carbonato/EDTA y la señal se midió usando un fluorímetro (Aminco Bowman Series 2) y cubetas de cuarzo. Los valores de fluorescencia se interpolaron a partir de una curva patrón con concentraciones conocidas de SM y se refirieron a la cantidad de proteína de partida.

b) Medida de endocannabinoides

Para la medida de los ligandos endocannabinoides enviamos las muestras procesadas al servicio de lipidómica del Instituto de Química Avanzada de Cataluña. La cantidad de AEA y 2-AG se midió en los extractos hipocampales (obtenidos en tampón MES 25mM pH7 y congelados a -80°C hasta su envío) mediante cromatografía líquida acoplada a espectroscopía de masas con columnas específicas para estos dos lípidos.

3.6. Análisis por microscopía

Todas las imágenes de microscopía se analizaron mediante el programa libre Fiji® (Schindelin et al., 2012). La intensidad se cuantificó con el parámetro “media” según la región/zona que interesara. El número de células se cuantificó con la opción “Contador Células” y por área analizada.

3.6.1. Inmunofluorescencia en muestras humanas

Las secciones de cerebros se desparafinaron y se hidrataron con xileno (Merck) durante 10 minutos y con concentraciones decrecientes de etanol (100 %, 96% y 70 %) durante 2 minutos cada una. Para la inmunofluorescencia se realizó un desenmascaramiento de epítomos con un tampón citrato de sodio (ácido cítrico 10 mM pH 5.9), hirviendo durante 5 minutos y manteniendo los cortes a temperatura media en el microondas durante 10 minutos más. Posteriormente se atemperaron las secciones unos 20 minutos en frío y tras lavarlos con agua y PBS 1X se bloquearon con BSA 1%, FBS 5% (suero bovino fetal, Sigma-Aldrich), NGS 2% (suero de cabra, Sigma-Aldrich) y Tritón X-100 0.1% en PBS 1X durante 45 minutos. Los anticuerpos primarios se incubaron en esta solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora. Se lavaron nuevamente las secciones 3 veces durante 10 minutos con PBS. Por último se procedió a deshidratar las secciones con etanol a concentraciones crecientes (70 %, 96% y 100 %) durante 2 minutos cada una y con xileno durante como mínimo 2 minutos, y se montaron en portaobjetos. Como medio de montaje se empleó FluorSave (Calbiochem). Las imágenes se tomaron usando un microscopio de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss).

3.6.2. Inmunofluorescencia en neuronas en cultivo

Las neuronas cultivadas sobre cubreobjetos se fijaron con PFA 4% en PBS durante 10 minutos. Después se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% durante 10 minutos y se

bloquearon con 2% BSA y 5% FBS en PBS durante 1 hora. Tras la incubación con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios se añadió DAPI o TO-PRO (1 µg/ml durante 10 minutos) para marcar los núcleos. Por último los cubreobjetos se montaron sobre portas usando el medio Prolong Gold (Invitrogen). Las imágenes se tomaron usando un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color. Como controles se montaron cubreobjetos sin ningún anticuerpo, toxina o reactivo, o solamente con el anticuerpo secundario correspondiente. Los estudios de colocalización se realizaron con el software añadido a Fiji llamado "JACoP (Just Another Colocalization Plugin)" superponer una imagen a otra y detectar el porcentaje de píxeles comunes (Bolte y Cordelières, 2006).

a) Análisis de células apoptóticas

La valoración de la apoptosis se hizo por el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica T.U.N.E.L. (TdT – mediated dUTP Nick end labelling) (kit de ThermoFisher). Este método tiene su fundamento en la detección de la rotura del ADN internucleosomal, típico en la apoptosis, en tejidos fijados en parafina. En él se ponen de manifiesto los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación del ADN, incorporando nucleótidos marcados mediante la enzima transferasa terminal (TdT). Para llevarlo a cabo se usaron placas de cultivos en parafina que se incubaron con el tampón de la TdT (200 mM ácido cacodílico, 200 mM KCl, 25 mM Trizma base pH=6,6). Se añadieron 1,25 mg/ml de albúmina bovina y cloruro de cobalto 1mM antes de marcar el nucleótido. El dUTP biotinilado diluído en el mismo tampón (10nmol/ml) se incorporó a los extremos 3' libres en presencia de la TdT (50 U/ml) mediante incubación en cámara húmeda durante 90 min a 37°C. Se montaron los portaobjetos y se tomaron imágenes con el microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color. Como control positivo se usaron placas tratadas con Tritón X-100 (Sigma) antes de fijarlas y se cuantificó el porcentaje de células con núcleos positivos respecto al número de células totales.

3.6.3. Inmunofluorescencia en cerebro e hígado

Los cortes de cerebro o de hígado de 40µm de grosor se permeabilizaron con Tritón X- 100 1% y se incubaron con los anticuerpos primarios en solución de bloqueo durante dos días a 4°C. La incubación con el secundario fluorescente se realizó durante una noche a 4°C. Posteriormente los cortes se marcaron con DAPI o TO-PRO durante 10 minutos y se montaron en portaobjetos para su análisis en un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss).

3.6.4. Tinción Hematoxilina-Eosina en cerebro e hígado

Estas tinciones se realizaron en colaboración con el servicio de Histología del CNB-CSIC. Los cortes de 40µm de grosor de cerebro o de hígado fijados se sometieron a un proceso de deshidratación con alcoholes y se sumergieron en hematoxilina durante 10 min a temperatura ambiente. La tinción con hematoxilina de Mayer marca las estructuras ácidas (basófilas), como los núcleos celulares, en azul y púrpura. Después se sumergieron durante 30 segundos a temperatura ambiente en eosina 0,2% en H₂O, que marca las zonas básicas (acidófilas) en rosa. Por último, las muestras se volvieron a deshidratar con alcohol, se montaron en los portaobjetos y se analizaron mediante el microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color.

3.7. Tests de comportamiento

Los test de comportamiento se realizaron en una celda del animalario acondicionada para este tipo de procedimientos, donde los animales fueron trasladados una semana antes del inicio del ensayo para su adaptación.

3.7.1. Test de coordinación motora: Rota-rod

Este test se realizó usando el aparato Mouse Rota-rod (Ugo Basile) que consiste en un rodillo, cuya velocidad de rotación puede ser controlada, sobre el que se sitúa el ratón. Cada ratón se entrenó durante dos días: el primer día con 4 sesiones de 1 minuto a velocidad fija del rodillo de 4 r.p.m, con intervalos de 1 hora; el segundo día se aumentó el tiempo a 2 minutos con aceleración de 4 r.p.m a 8 r.p.m. Una vez realizados los entrenamientos, el tercer día se procedió a la realización de las pruebas, que se desarrollaron durante 5 minutos con una aceleración progresiva del rodillo de 4 a 40 r.p.m. En total se hicieron 4 pruebas y se contó el tiempo que tardó cada ratón en caer.

3.7.2. Test de memoria y aprendizaje: Prueba del laberinto en Y (Y-maze)

Esta prueba se realizó según se describe en (Cognato et al., 2010). Se usó una estructura en forma de Y con paredes opacas de 8 cm de altura. Primero se depositó a cada ratón dentro de la estructura y se le permitió explorar dos de los brazos durante ocho minutos, estando el tercero cerrado. Después de una hora, cada ratón se colocó de nuevo en el aparato pero esta vez con el tercer brazo abierto. Se cuantificó el tiempo que cada ratón pasaba explorando el brazo nuevo y se expresó como porcentaje respecto al tiempo total de exploración.

3.7.3. Test de síntomas de ansiedad: Prueba del laberinto elevado en cruz (Elevated Plus maze)

Este test de comportamiento consiste en un laberinto con dos brazos abiertos (30x5 cm) y dos cerrados (30x5 cm, rodeados por una pared de 15cm de altura), siendo ambos pares idénticos conformando una cruz con una plataforma central de 5x5 cm (Lister, 1987). El laberinto se encuentra elevado del suelo a una altura de 45 cm. El ratón se colocó en el centro del laberinto y se le dejó explorar durante 5 min a su libre albedrío. Se cuantificó el tiempo que pasó en los brazos abiertos que es inversamente proporcional al estado de ansiedad (menos tiempo en los brazos abiertos, más ansiedad).

3.7.4. Tests de síntomas de depresión: Prueba de suspensión por la cola (Tail Suspension)

Esta prueba se realizó sujetando al ratón de su cola mediante un celo, quedando el animal suspendido en el aire. En esa posición los ratones no pueden escapar ni sujetarse a superficies cercanas. Durante la prueba, que duró 5-6 minutos, se cuantifica el tiempo en el que el animal permaneció inmóvil que indica que no intenta escapar. Un mayor tiempo de inmovilidad se asocia a estados depresivos y se ha comprobado que disminuye en ratones tratados con antidepresivos (Can et al., 2012).

3.8. Medida semicuantitativa del ARNm (qPCR)

En este ensayo se midió la expresión génica del CB₁, CB₂, NSM₂ y mGlu5. Se emplearon tanto neuronas de cultivos primarios como tejido de ratones ASMKo para hacer medidas semicuantitativas del ARNm. Los extractos se mezclaron con Trizol (Ambion/RNA. Life Technologies Co., Gran Island, New York, EEUU) a razón de 1 millón de células/mL de reactivo. La mezcla se incubó 20 minutos en hielo tras los que se añadieron 200µl de CHCl₃ por mL de Trizol, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000rpm durante 15 minutos recuperándose la fase acuosa de la superficie del tubo en la que se procedió a la precipitación de ARN empleando Isopropanol durante 1 hora a -20°C. Tras centrifugar a 14000rpm durante 10 minutos el precipitado de RNA se lavó con EtOH, se secó y se resuspendió en 100µl de agua destilada libre de RNAsa (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras se limpiaron para eliminar los posibles restos de Trizol empleando columnas del Rneasy Mini Kit de Qiagen y se calculó la concentración de RNA en 1µl de la solución estimada por la absorbancia a 260nm medida en un Nanodrop ND-100 (Thermoscientific; Thermo Fisher Scientific Inc.). Finalmente se realizó la retrotranscripción partiendo de 150ng de RNA iniciales, empleando el Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermoscientific. Los niveles del ARNm se detectaron mediante PCR cuantitativa (qPCR ó Real Time PCR) empleando GoTaq[®] qPCR Mix de Promega Co. (Madison, Wisconsin, EEUU) y el equipo ABI PRISM 7900 HT

SDS (Applied Biosystems, Life Technologies Co.) así como el software SDSv2.4 para el diseño y análisis de la placa. Para la detección del ARNm empleamos los oligonucleótidos (Sigma-Aldrich) descritos en la Tabla III. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a tres genes de referencia, GAPDH, GUSB, Pgc-1, obtenidos en las mismas condiciones empleando primers específicos.

Nombre	Secuencia
mGlu5_Fw	CTTAGATCGCAGCCACTAGC
mGlu5_Rv	GTAAAATCACCAGGTGCGCT
CnR2_Fw	CTACAAAGCTCTAGTCACCCGT
CnR2_Rv	CCATGAGCGGCAGGTAAGAAA
CnR1_Fw	GCACCTTCACGGTTCTGG
CnR1_Rv	GACTGCGGGAGTGAAGGAT
Nsm2_fw	GTTGTCCGGGTACACACAT
Nsm2_rv	TGCTGGACACAAACGGTCT

Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos usadas.

3.9. Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con el programa Prism 6 (GraphPad). En las gráficas se representa la media \pm SEM (error estándar de la media). Los asteriscos representan P valores como se indica a continuación: * P < 0.05; ** P < 0.005; *** P < 0.001.

3.9.1. Comparaciones simples

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk de normalidad de distribución de la muestra y se aplicó la prueba t de Student (para las muestras con distribución normal) o la U de Mann-Whitney (muestras no paramétricas).

3.9.2. Comparaciones múltiples

Los resultados con distribución normal se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una o de dos vías, según el caso, seguidas de un test post hoc de diferencia significativa mínima (MSD, para muestras con varianzas iguales) o de Games-Howell (muestras con varianzas diferentes). La igualdad de la varianza se analizó con la prueba de Levene. En los casos con distribución no paramétrica se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test U de Mann-Whitney, al que se aplicó la corrección de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de las alteraciones del Sistema Endocannabinoide en el cerebro de ratones ASMKo

Como se mencionó en la introducción, los principales componentes del SECB son los ligandos lipídicos Anandamida (AEA) y 2-AG y sus receptores protéicos CB₁ y CB₂. Para determinar si el SECB está alterado en los ratones ASMKo, que son nuestro modelo animal para NPA, utilizamos diferentes técnicas [espectrometría de masas, Western blot (WB), inmunofluorescencia o Retrotranscripción del ARN mensajero y PCR cuantitativa (RT-qPCR)] para comparar los niveles de expresión de estos componentes en distintas áreas del cerebro o en neuronas en cultivo de ratones ASMKo y WT.

4.1.1. Los niveles de AEA y CB₂ no están alterados mientras que los niveles de 2-AG están ligeramente disminuidos en el cerebro de ratones ASMKo

Para medir los niveles de los endocannabinoides AEA y 2-AG, y dada su naturaleza lipídica, recurrimos a la espectrometría de masas asociada a HPLC. El análisis se llevó a cabo en extractos hipocampales de ratones WT y ASMKo de 4,5 meses, edad en la que los síntomas de la enfermedad son evidentes (Horinouchi et al., 1995). Los resultados, normalizados respecto a la cantidad de proteína, revelaron una ligera disminución de un 20% en los niveles de 2-AG en los ratones ASMKo (**Figura R 1a**) (WT: $212,7 \pm 10,18$ pmol/mL; ASMKo: $170,0 \pm 9,865$ pmol/mL) mientras que no se apreciaron cambios significativos en los niveles de AEA (**Figura R 1b**) (WT: $2,1 \pm 0,456$ pmol/mL; ASMKo: $2,325 \pm 0,239$ pmol/mL).

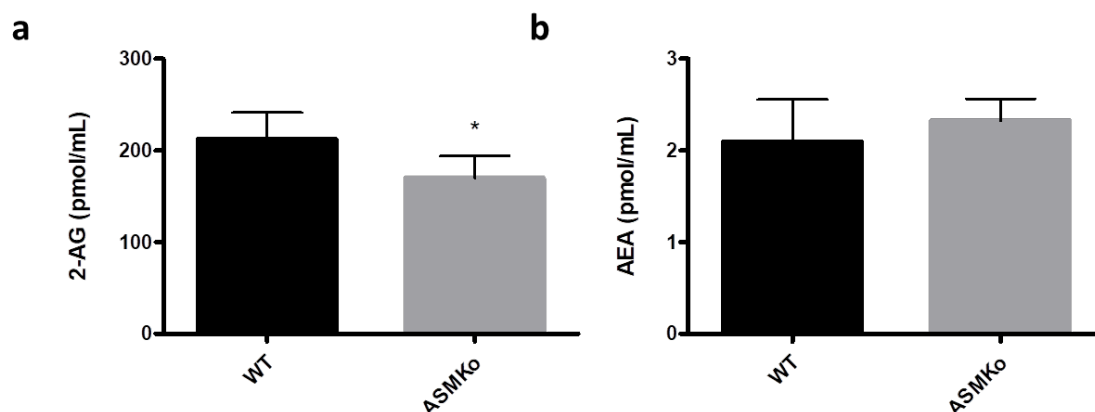


Figura R 1 Cuantificación en hipocampo de los endocannabinoides 2-AG y AEA. Las gráficas muestran la media \pm SEM de los niveles de 2-AG (a) y de AEA (b) en extractos de hipocampo de ratones WT y ASMko ($n = 5$ ratones por genotipo. $P_{WT/ASMko} = 0,0126$).

Aunque durante mucho tiempo se pensó que el receptor CB_2 tenía una presencia exclusiva en tejidos periféricos, donde es muy abundante, evidencias más recientes han detectado CB_2 en el sistema nervioso central tanto en microglía y astrocitos como en distintas subpoblaciones de neuronas de diferentes regiones cerebrales (Roche y Finn, 2010). Teniendo en cuenta la participación de CB_2 en procesos inflamatorios ejerciendo una función inmunomoduladora (Turcotte et al., 2016) y la inflamación particularmente acusada en el cerebelo de los ratones ASMko (Gabande-Rodriguez et al., 2018), medimos los niveles de ARNm y de proteína de este receptor en extractos cerebelares de ratones ASMko y WT de 4,5 meses. La medida de ARNm se normalizó respecto a los genes de referencia GAPDH, Pgc-1 y GUSB mediante RT-qPCR, mientras que el WB se realizó en extractos conteniendo la misma cantidad de proteína. No se encontraron diferencias entre ratones WT y ASMko ni en los niveles de ARNm (WT: $1,064 \pm 0,1966$ U.A.; ASMko: $1,624 \pm 0,4209$ U.A.) (**Figura R 2a**) ni en los de proteína (**Figura R 2b**) (WT: $0,2375 \pm 0,01855$ U.A.; ASMko: $0,276 \pm 0,027$ U.A.).

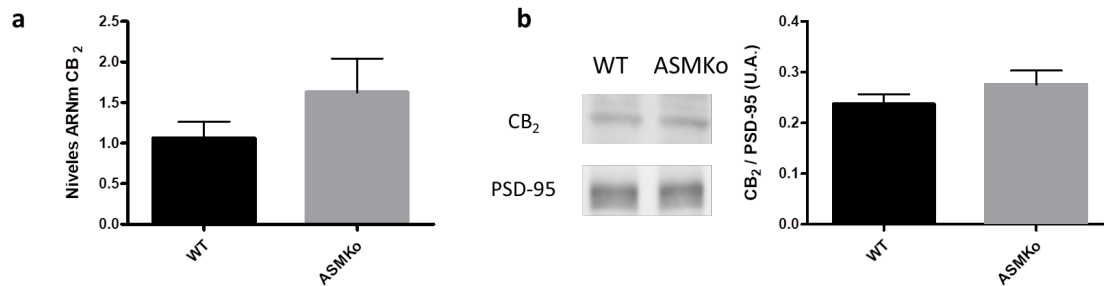


Figura R 2 Medida de los niveles de CB₂ en el cerebelo de ratones WT y ASMKo. a) RT-qPCR de CB₂ en extractos cerebelares de ratones WT y ASMKo. b) WB de CB₂ y PSD-95. Las gráficas muestran la media ± SEM de los niveles de ARNm de CB₂ (a) y de los niveles de proteína CB₂ normalizados respecto a los de PSD-95 que se utilizaron como control de carga (b). Los valores se expresan en unidades arbitrarias en a y b (n = 6 ratones por genotipo).

4.1.2. Los niveles de CB₁ están disminuidos en el cerebro de ratones ASMKo y de un paciente con NPA y su distribución está alterada en neuronas ASMKo

El CB₁ es el receptor de endocannabinoides más abundante en cerebro aunque sus niveles de expresión varían mucho dependiendo de la región y del tipo celular (glía y distintos tipos de neuronas) (Di et al., 2013). El análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de CB₁ respecto a los genes de referencia (GAPDH, Pgk-1 y GUSB) mostró una disminución significativa en los ratones ASMKo comparado con los WT en todas las regiones cerebrales analizadas (**Figura R 3**): 30% en cerebelo (WT: 1,013 ± 0,071 U.A.; ASMKo: 0,713 ± 0,027 U.A.), 40% en hipocampo (WT: 1,017 ± 0,096 U.A.; ASMKo: 0,61 ± 0,144 U.A.) y 30% en corteza (WT: 1,014 ± 0,076 U.A. ; ASMKo: 0,767 ± 0,051 U.A.).

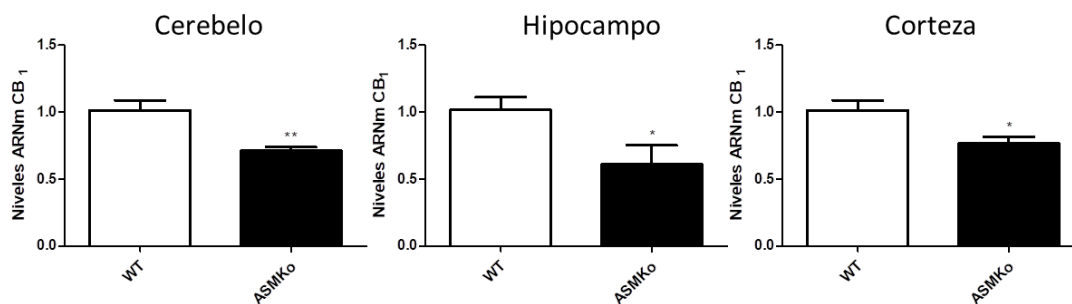


Figura R 3. Cuantificación de los niveles de ARNm del CB₁ en el cerebro de ratones ASMKo. Las gráficas muestran la cuantificación para la expresión génica de 2^{-ΔΔct} del gen CB₁ respecto a tres genes de referencia (GAPDH, GUSB y Pgk-1) en extractos de cerebelo, hipocampo y corteza de ratones wt y ASMKo [n = 8 ratones por genotipo. P_{WT/ASMKo} = 0,0013 (Cer); P_{WT/ASMKo} = 0,0464 (Hip); P_{WT/ASMKo} = 0,0154 (Cor)].

Para determinar si la reducción en los niveles de ARNm del CB₁ se traducía en una menor expresión de la proteína analizamos las mismas regiones del cerebro de ratones WT y ASMKo mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico para CB₁ (**Figura R 4**). Se observaron reducciones significativas en los niveles de proteína CB₁ en los ratones ASMKo en todas las regiones analizadas siendo la más acusada, un 22%, en cerebelo (WT: 1124 ± 26,4 U.A.; ASMKo: 877,3 ± 19,9 U.A.), un 10% en hipocampo (WT: 983,3 ± 26,49 U.A.; ASMKo: 881,1 ± 29,39 U.A.) y un 8% en corteza (WT: 838,9 ± 19,64 U.A.; ASMKo: 771,3 ± 20,59 U.A.).

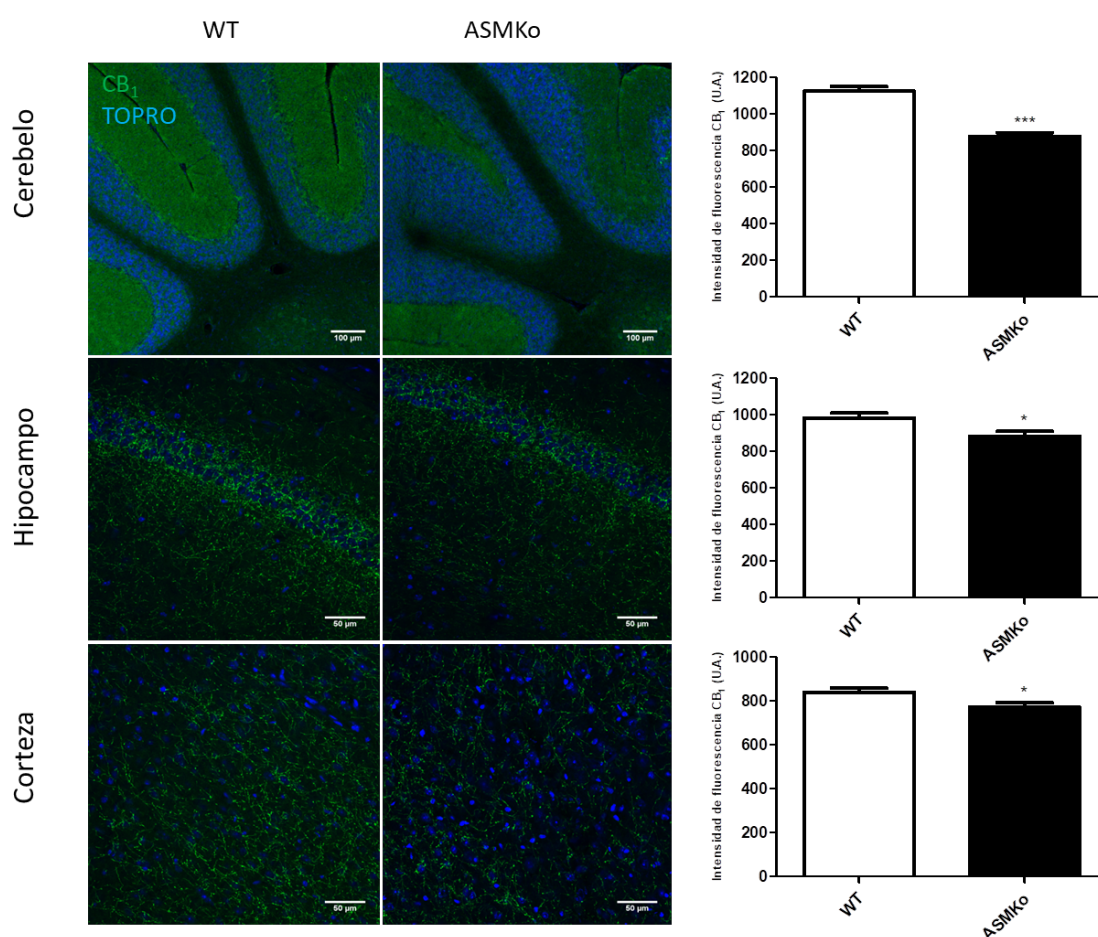


Figura R 4. Expresión de la proteína CB₁ en el cerebro de ratones ASMKo. Imágenes de inmunofluorescencias contra CB₁ (verde) en tejido cerebelar, hipocampal y cortical de ratones WT y ASMKo. Los núcleos celulares se marcaron con TOPRO (azul). Las gráficas muestran la media ± SEM de la intensidad asociada a CB₁ en unidades arbitrarias [n = 5 ratones por genotipo. $P_{WT/ASMKo} < 0,0001$ (Cer); $P_{WT/ASMKo} = 0,0109$ (Hip); $P_{WT/ASMKo} = 0,0193$ (Cor)].

RESULTADOS

El acceso a muestras de cerebro de un paciente con NPA que murió a los 3 años de edad y de un niño de la misma edad sin la enfermedad nos permitió explorar si la reducción de los niveles de CB₁ observada en el modelo de ratón para NPA se daba también en pacientes. Inmunofluorescencias llevadas a cabo con el anticuerpo específico para CB₁ en distintas regiones del cerebro (cerebelo y bulbo medio) revelaron una disminución drástica de los niveles de proteína del receptor (**Figura R 5**). Además se observó que la proteína se acumulaba en los somas celulares.

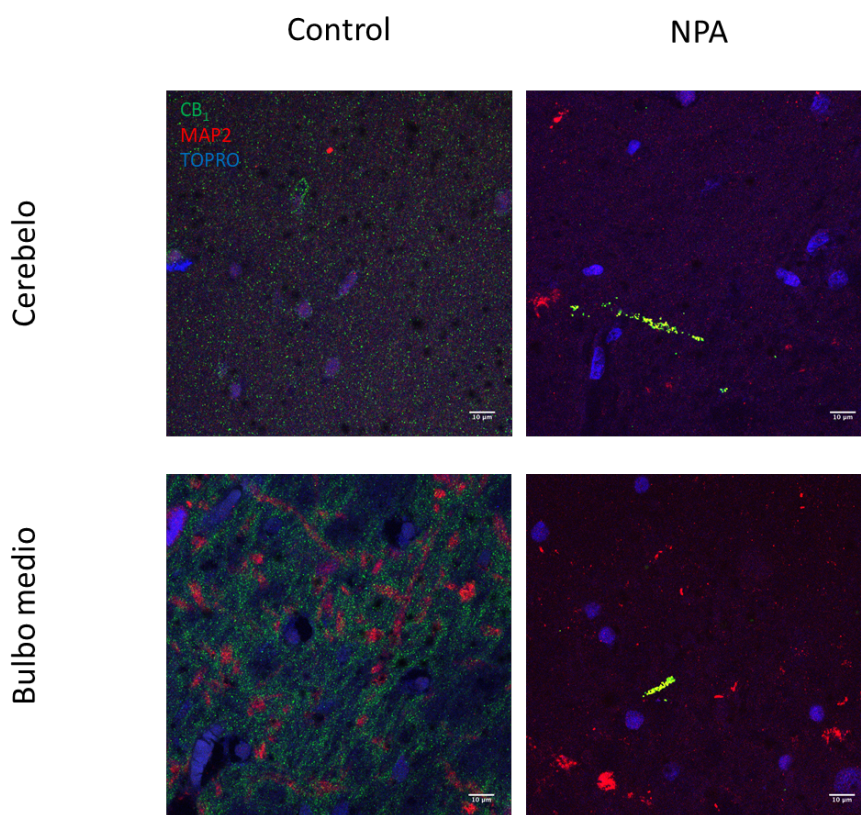


Figura R 5. Expresión de la proteína CB₁ en el cerebro de un paciente NPA. Imágenes de inmunofluorescencias contra CB₁ (verde) y el marcador neuronal MAP2 (rojo) en tejido cerebelar, y del bulbo medio de un paciente con NPA y de un niño no afectado de edad similar. Los núcleos celulares se marcaron con TOPRO (azul).

Para comprobar si la reducción y localización aberrante de CB₁ observada en el tejido cerebral afectaba específicamente a las neuronas se realizaron cultivos de neuronas hipocámpales, donde CB₁ es especialmente abundante (Herkenham, 1991), de ratones WT y

ASMKo. La medida de los niveles del ARNm de CB₁ por RT-qPCR reveló una drástica reducción del 95%, mucho mayor que en tejido, en neuronas ASMKo respecto a las WT (**Figura R 6**) (WT: $1,022 \pm 0,1028$ U.A.; ASMKo: $0,05299 \pm 0,01271$ U.A.).

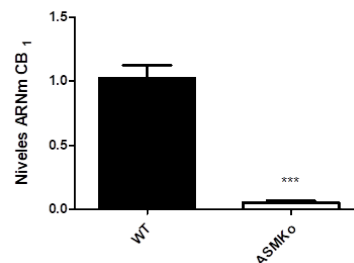


Figura R 6. Cuantificación de los niveles de ARNm en cultivos neuronales hipocampales de WT y ASMKo. Las gráficas muestran la cuantificación $2^{-\Delta\Delta ct}$ del gen CB₁ respecto a tres genes de referencia (GAPDH, GUSB y Pgk-1) en cultivos de neuronas hipocampales de ratones WT y ASMKo (n = 5 cultivos diferentes. $P_{WT/ASMKo} < 0,0001$).

Los niveles de la proteína CB₁ se analizaron por microscopía confocal de inmunofluorescencias con el anticuerpo contra CB₁ en neuronas que también se marcaron con el anticuerpo contra MAP2. Este análisis también reveló una disminución notable en neuronas de un 60% en los niveles de proteína CB₁ de las neuronas ASMKo comparado con las WT (**Figura R 7**). (WT: $1,304 \pm 0,09613$ U.A.; ASMKo: $0,4537 \pm 0,04713$ U.A.).

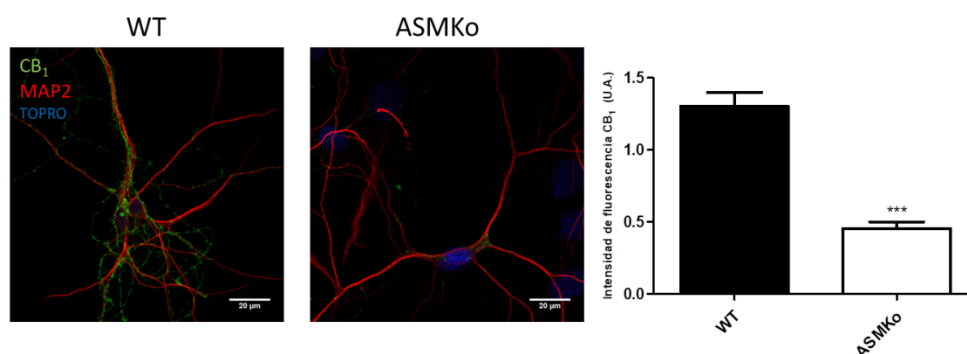


Figura R 7. Expresión de la proteína CB₁ en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratones WT y ASMKo. Imágenes representativas de la expresión de CB₁ (verde) en el soma y procesos de las neuronas marcadas con MAP2 (rojo). los núcleos celulares se marcaron con TOPRO (azul). La gráfica muestra la media ± SEM de la intensidad asociada a CB₁ en unidades arbitrarias (n = 50 neuronas de 3 cultivos diferentes. $P_{WT/ASMKo} < 0,0001$).

El receptor CB₁ se ha localizado tanto en la membrana plasmática como en lisosomas (Sarnataro et al., 2005). Teniendo en cuenta la acumulación de CB₁ en el soma celular observada en el tejido cerebral del paciente NPA analizamos si la distribución de este receptor estaba también alterada en neuronas de ratones ASMKo en cultivo. Los ensayos de inmunofluorescencia revelaron que la reducción de los niveles de CB₁ era drástica en los procesos de las neuronas ASMKo (**Figura R 8a**) (WT: $1,322 \pm 0,07738$ U.A.; ASMKo: $0,7945 \pm 0,06761$ U.A.) mientras que la proteína se concentraba en los lisosomas que se identificaron con el marcador Lamp1 (**Figura R 8b**) (WT: $0,1540 \pm 0,01513$ U.A.; ASMKo: $0,3267 \pm 0,01068$ U.A.).

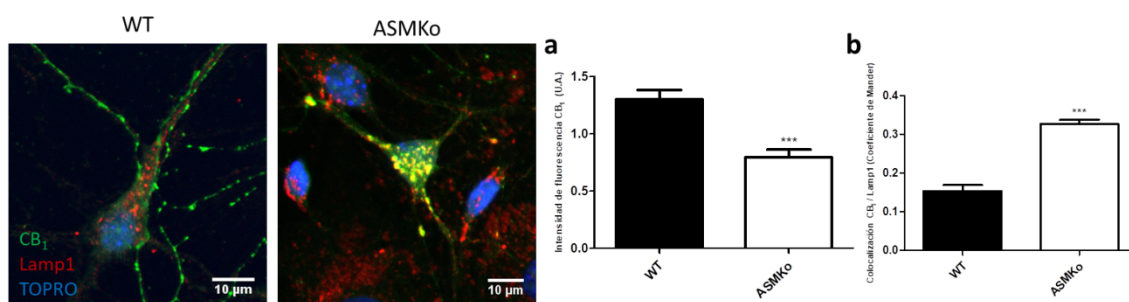


Figura R 8. Expresión de la proteína CB₁ y Lamp1 en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de ratones WT y ASMKo. Imágenes de IF para el CB₁ (verde) con los lisosomas marcados con Lamp1 (rojo) y los núcleos con TOPRO (azul). **a**) Cuantificación del CB₁ en los procesos neuronales (excluyendo el soma) y **b**) Colocalización de CB₁ con Lamp1. Las gráficas muestran la media ± SEM de la intensidad asociada a CB₁ en unidades arbitrarias (a) y la media ± SEM del porcentaje de colocalización con Lamp1 [n = 50 neuronas de 3 cultivos diferentes. P_{WT/ASMKo} < 0,0001(a); P_{WT/ASMKo} < 0,0001(b)].

4.1.3. El aumento de SM causa las alteraciones en niveles y distribución de CB₁ en neuronas ASMKo

La acumulación de SM, debido a la deficiencia de su enzima catabólica ASM, es la principal característica patológica en las células de ratones ASMKo y pacientes NPA. Para determinar si las alteraciones observadas en el receptor CB₁ en neuronas son debidas a la acumulación de

este lípido realizamos una serie de experimentos modulando los niveles de SM en cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratones WT y ASMKo.

Para mimetizar la situación en neuronas ASMKo los niveles de SM se aumentaron en neuronas WT mediante la adición del lípido en el medio de los cultivos. La incubación con 40 μ M SM durante 48h, que eleva la SM a unos niveles similares a los encontrados en neuronas ASMKo (Arroyo et al., 2014) redujo los niveles de ARNm de CB₁, medidos por RT-qPCR, en un 60% (**Figura R 9**) (WT: 1,022 \pm 0,1028 U.A.; WT + 40 μ M SM: 0,4477 \pm 0,07734 U.A.).

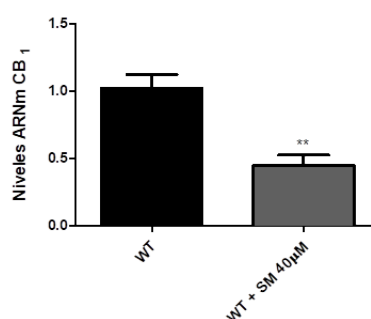


Figura R 2. Niveles de ARNm del CB₁ en cultivos neuronales hipocampales de WT y WT con SM 40 μ M. Las gráficas muestran la media \pm SEM del gen CB₁ en unidades arbitrarias (n = 5 cultivos neuronales diferentes. $P_{WT/WT+SM} = 0,0021$).

Los niveles de proteína CB₁ se midieron por inmunofluorescencia en cultivos neuronales tratados con dosis crecientes de SM en el medio (**Figura R 10**). Se observó una disminución dependiente de dosis del 45% en cultivos tratados con 20 μ M SM y del 60% en los tratados con 40 μ M SM (WT: 1,304 \pm 0,1381 U.A.; WT + 20 μ M SM: 0,7310 \pm 0,1016 U.A.; WT + 40 μ M SM: 0,5364 \pm 0,07172 U.A.).

RESULTADOS

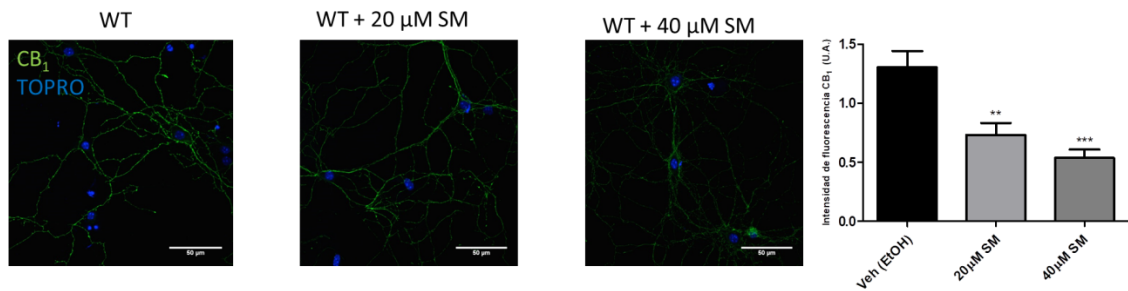


Figura R 3. Expresión del CB₁ en cultivos neuronales WT con adición de SM. Imágenes de IF para el CB₁ (verde) y los núcleos marcados con TOPRO (azul) en neuronas hipocámpales WT tratadas con SM 40 μM durante 48h. La gráfica muestra la media ± SEM de la intensidad asociada a CB₁ en unidades arbitrarias (n = 40 neuronas de 3 cultivos diferentes). $P_{WT/WT+SM\ 20} = 0,0021$; $P_{WT/WT+SM\ 40} < 0,0001$.

Como experimento complementario al aumento de SM en neuronas WT se redujo este lípido en neuronas ASMKo mediante tratamiento con ASMasa exógena. La incubación con 0,1U ASMasa por cada 100 μL de medio durante 48h disminuyó los niveles de SM en un 46% (**Figura R 11a**) (*ASMKo*: $100,0 \pm 3,397\%$; *ASMKo + ASMasa*: $54,59 \pm 10,74\%$). Experimentos de RT-qPCR revelaron que los niveles de ARNm del CB₁ aumentaron en las neuronas ASMKo tratadas con ASMasa respecto a las no tratadas (**Figura R 11b**) (*ASMKo*: $0,5971 \pm 0,02920$ A.U.; *ASMKo + ASMasa*: $0,9227 \pm 0,06264$ A.U.). El análisis por WB también mostró una tendencia al aumento de la proteína CB₁ en las neuronas ASMKo tratadas con ASMasa exógena pero no llegó a ser estadísticamente significativa (**Figura R 11c**) (*ASMKo*: $0,4021 \pm 0,08156\%$; *ASMKo + ASMasa*: $0,5887 \pm 0,07536\%$).

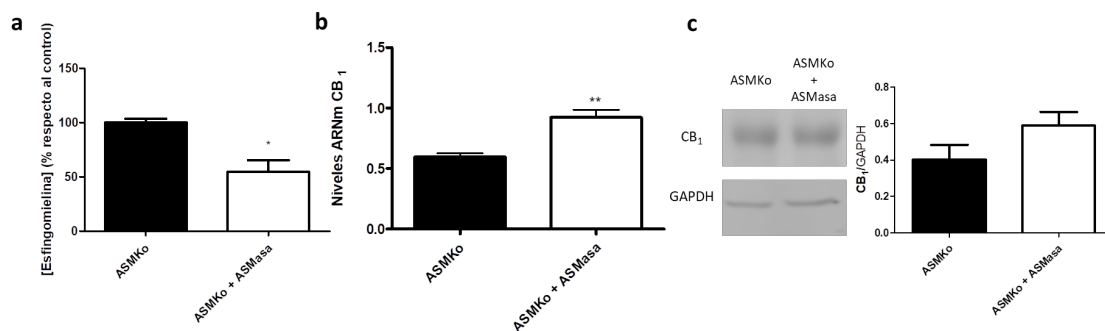


Figura R 4. Expresión de CB₁ con ASMasa exógena en cultivos neuronales de ASMKo. a) Concentración de SM en neuronas ASMKo incubadas con ASMasa exógena. b) Cuantificación de los niveles de ARNm del CB₁ en neuronas

tratadas con ASMas. c) Análisis de WB del CB₁ respecto a GAPDH para los cultivos tratados con ASMas. Las gráficas muestran la media ± SEM [n = 3 cultivos neuronales diferentes. P_{ASMKo/ASMKo+ASMas} = 0,0157 (a); P_{ASMKo/ASMKo+ASMas} = 0,0015 (b)].

Para determinar si la alteración de los niveles de SM también es responsable del cambio de distribución de CB₁ observado en neuronas ASMKo respecto a WT, se cuantificaron por inmunofluorescencia los niveles de CB₁ detectado en los procesos o en los lisosomas, identificados con el marcador Lamp1, de neuronas WT tratadas o no con 40 μM SM por 48 horas. De manera similar a lo que ocurre en neuronas ASMKo el tratamiento con SM redujo la cantidad de CB₁ en los procesos de las neuronas (**Figura R 12a**) (WT: 1,304 ± 0,07810 U.A.; WT+40μM SM: 0,9353 ± 0,07575 U.A) mientras que el receptor se concentró en los lisosomas (**Figura R 12b**) (WT: 0,1540 ± 0,1172 U.A. ; WT+40μM SM: 0,2591 ± 0,1444 U.A.).

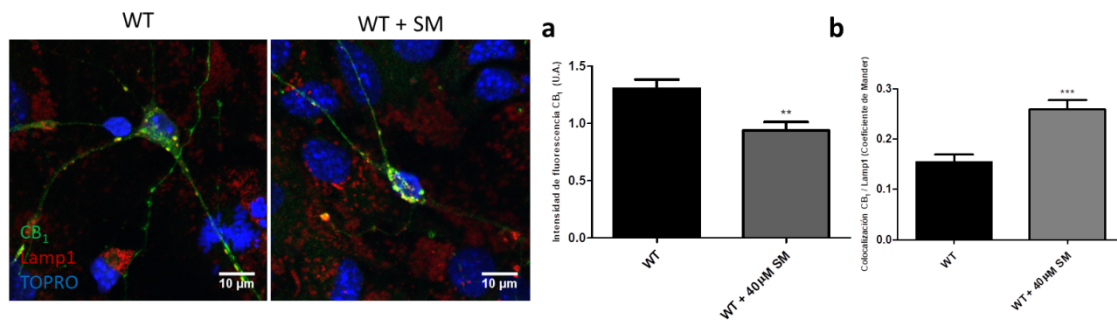


Figura R 5. Expresión de la proteína CB₁ y Lamp1 en cultivos primarios hipocampales WT y WT + SM. Imágenes de IF para el CB₁ (verde) con los lisosomas marcados por Lamp1 (rojo) y los núcleos marcados con TOPRO (azul). **a**) Cuantificación del CB₁ en los procesos neuronales (excluyendo el soma) y **b**) Colocalización de CB₁ con Lamp1 mediante el coeficiente de Manders. Las gráficas muestran la media ± SEM de la intensidad asociada al CB₁ en unidades arbitrarias (a) y la media ± SEM del porcentaje de colocalización con Lamp1 [n = 50 neuronas de 3 cultivos diferentes. P_{WT/WT+40 SM} = 0,0010(a); P_{WT/WT+40 SM} < 0,0001(b)].

La caracterización del SECB llevada a cabo en el cerebro y neuronas de ratones ASMKo permiten concluir que mientras que los niveles de AEA y CB₂ no están alterados, se da una ligera bajada de los niveles de 2-AG y sobretodo una reducción de CB₁ tanto a nivel de ARNm como de expresión proteica. Esta reducción también se observa en el cerebro de un paciente

NPA. Además, los estudios realizados en neuronas en cultivo demuestran que las alteraciones en CB₁ son especialmente acusadas en este tipo celular y se deben a los elevados niveles de SM que reducen la presencia de CB₁ sobretodo en los procesos neuronales concentrándolo de forma anómala en los lisosomas.

4.2. La activación del Sistema Endocannabinoide como terapia para NPA

Los resultados descritos en el apartado anterior, que demuestran la reducción de CB₁ en cerebro y neuronas de ratones ASMKo y en el cerebro de un paciente NPA, sugieren que estrategias orientadas a activar este receptor podrían ser terapéuticas para esta enfermedad incurable. Esta propuesta se vio además reforzada por estudios previos, ya mencionados en la introducción, en los que el uso del agonista de CB₁, cannabidiol, redujo los niveles de SM en fibroblastos de un paciente de NPA (Burstein et al., 1984). Además se había demostrado que la activación de CB₁, mediante la adición de AEA, redujo los niveles de SM al activar la esfingomielinasa neutral (NSM) en astrocitos de rata en cultivo (Blazquez et al., 1999). Por todo ello decidimos explorar las consecuencias de la activación del SECB en neuronas ASMKo en cultivo y en los ratones modelo para NPA.

4.2.1. La aplicación de AEA exógena reduce la SM en cultivos neuronales ASMKo a través de la NSM.

Para determinar si la activación del SEBC podía inducir la disminución de SM en neuronas y ser beneficiosa en el contexto de la NPA se administró el endocannabinoide AEA al medio de cultivo de neuronas hipocampales de ratones ASMKo a distintas concentraciones, 5μM, 25μM y 50μM, durante 1 hora. Los niveles de SM se midieron por un ensayo enzimático confirmándose que la AEA disminuye los niveles del lípido de manera dependiente de dosis

(Figura R 13) (EtOH: 100,9 ± 2,33%; AEA 5μM: 76,89 ± 1,92%; AEA 25μM: 55,15 ± 4,16%; AEA 50μM: 45,5 ± 5,67%).

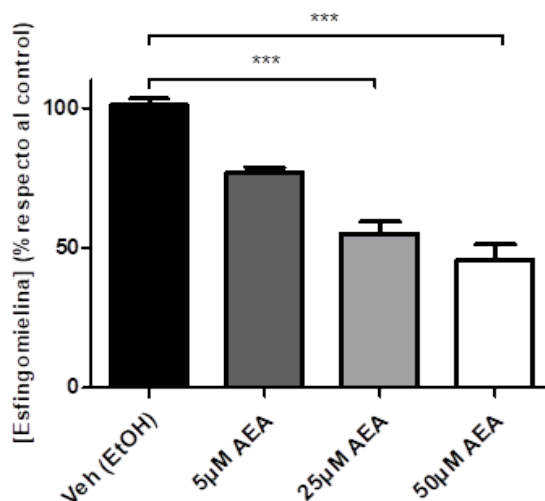


Figura R 6. Concentración de SM tras la adición de AEA exógena. Cuantificación de SM con diferentes concentraciones crecientes de AEA exógena en cultivos neuronales ASMKo. La gráfica muestra la media \pm SEM de los porcentajes de concentración de SM respecto al Veh(EtOH) ($n = 3$ cultivos neuronales diferentes. $P_{\text{Veh}/25 \text{ AEA}} < 0,0001$; $P_{\text{Veh}/50 \text{ AEA}} < 0,0001$).

El análisis por WB de los niveles de NSM tras incubación con AEA a 50µM durante 24h reveló un aumento de los niveles de esta enzima (**Figura R 14**) (EtOH: $11,31 \pm 1,18$ %; AEA 50µM: $16,63 \pm 1,6$ %) lo que sugería su participación en la reducción de SM en neuronas de manera análoga a como se había descrito en astrocitos (Blazquez et al., 1999)

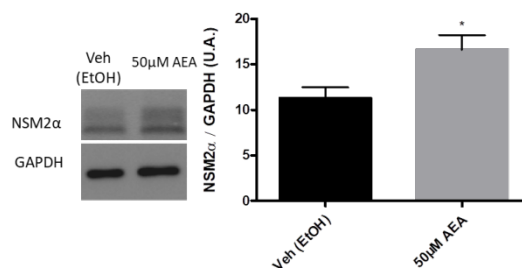


Figura R 14. Expresión de NSM en cultivos neuronales ASMKo con adición de AEA. WB de la proteína NSM y GAPDH como control de carga. La gráfica muestra la media \pm SEM del ratio de intensidad expresado en unidades arbitrarias ($n = 2$ cultivos neuronales diferentes. $P_{\text{Veh}/50 \text{ AEA}} = 0,0230$).

Para confirmarlo, la incubación de las neuronas ASMKo con AEA 25 µM se llevó a cabo en presencia o ausencia del inhibidor específico de NSM GW-4869 a 15µM durante 1 hora. La incubación con GW4869 previno la reducción de SM provocada por la AEA demostrando la

participación de la NSM en el proceso (**Figura R 15**) (EtOH: $100 \pm 2,89\%$; GW $15\mu\text{M}$: $106,3 \pm 2,92\%$; AEA $25\mu\text{M}$: $67,35 \pm 1,54\%$; GW $15\mu\text{M}$ + AEA $25\mu\text{M}$: $115,2 \pm 3,93\%$).

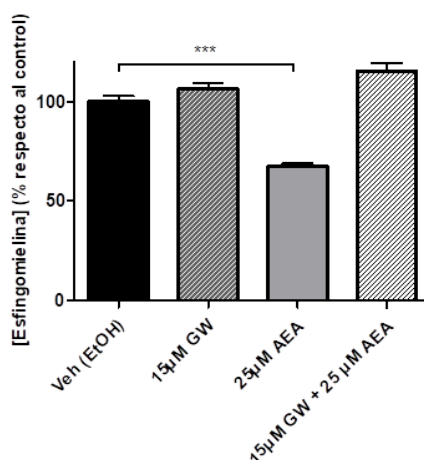


Figura R 7. Concentración de SM con inhibición de la NSM y AEA. Cuantificación de SM en cultivos neuronales de ASMKo con la adición del inhibidor de la NSM GW a $15\mu\text{M}$ durante 1h y la administración de AEA $25\mu\text{M}$ el mismo tiempo. La gráfica muestra la media \pm SEM de los porcentajes de concentración de SM respecto al Veh (EtOH) ($n = 3$ cultivos neuronales diferentes. $P_{\text{Veh}/25 \text{ AEA}} = 0,0006$).

4.2.2 La estimulación de CB_1 mediante inhibidores de la FAAH provoca una disminución de la SM en neuronas ASMKo en cultivo

Los resultados obtenidos demostrando la eficacia de la AEA para disminuir la SM en neuronas ASMKo en cultivo reforzaron nuestra hipótesis que postulaba la activación del SECB como estrategia terapéutica para NPA. Teniendo en cuenta una posible aplicación a pacientes, que debería ser crónica y en población pediátrica, consideramos formas de activación alternativas a la adición directa del endocannabinoide AEA. Una posibilidad era el uso de agonistas del CB_1 , como THC o cannabidiol, pero los efectos secundarios psicoactivos de estos agonistas (Di Marzo, 2008) nos llevaron a descartarla. Otra posibilidad era el bloqueo de la degradación de los endocannabinoides mediante inhibidores de sus enzimas hidrolíticas FAAH o MAGL. La búsqueda de inhibidores que tuvieran la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica para poder suministrarlos de forma no invasiva a pacientes y que se

hubieran probado en ensayos preclínicos o clínicos nos llevó a elegir los inhibidores de la FAAH: JNJ-1661010, PF-04457845 y URB-597 que cumplían con estos requisitos (**Tabla R I**).

NOMBRE	UNIÓN ENZIMA	CRUZA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	INDICACIONES	ESTADO DE DESARROLLO EN ENSAYO CLÍNICO	REFERENCIAS
JNJ-1661010	Parcialmente reversible (80% recuperación)	Sí	Artritis	Preclínico	(Keith et al., 2015)
PF-04457845	Irreversible	Sí	Dolor osteoartrítico/Dependencia alcohol/Síndrome de Tourette	Fase II	(Johnson et al., 2011)
URB-597	Irreversible	Sí	Dolor neuropático	Preclínico	(Parker et al., 2011)

Tabla R I. Tabla descriptiva de los 3 inhibidores de la enzima FAAH seleccionados para el estudio *in vitro*.

Cultivos de neuronas ASMKo se incubaron con 50 μ M JNJ, PF o URB durante 1 hora en presencia o ausencia de 25 μ M AEA. La adición de AEA se llevó a cabo con dos objetivos: asegurar la suficiente cantidad de AEA en el caso de que los cultivos no produjeran bastante de forma endógena y determinar si podía haber un efecto sinérgico entre AEA y los inhibidores de su enzima hidrolítica (**Figura R 16**). La medida de SM por métodos enzimáticos reveló que todos los FAAHi utilizados eran capaces de reducir los niveles del lípido de manera similar y que la presencia de AEA no aumentaba el efecto lo que sugiere que en las condiciones utilizadas se llega a un nivel máximo de AEA, probablemente secretado por las propias células, que es suficiente para saturar la capacidad de FAAH [*Veh (DMSO)*: 100,2 \pm 0,3383 U.A.; 50 μ M JNJ: 46,90 \pm 11,00 U.A.; 50 μ M PF: 58,67 \pm 7,910 U.A.; 50 μ M URB: 43,61 \pm 3,266 U.A.; 50 μ M JNJ + 25 μ M AEA: 49,88 \pm 14,15 U.A.; 50 μ M PF + 25 μ M AEA: 50,50 \pm 15,12 U.A.; 50 μ M URB + 25 μ M AEA: 39,98 \pm 2,997 U.A.].

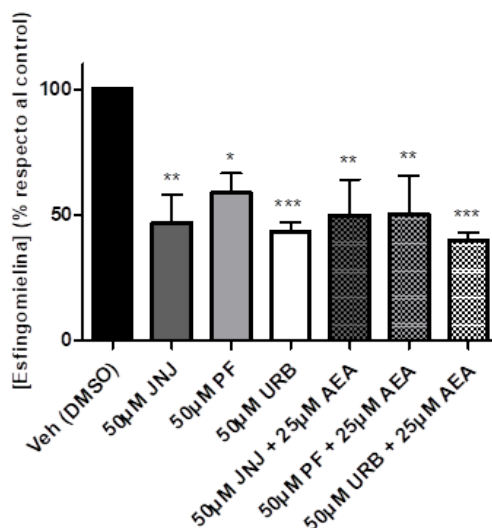


Figura R 16. Concentración de SM con los tratamientos inhibidores de la FAAH (JNJ, PF, URB) en cultivos neuronales ASMKo. Cuantificación de SM en cultivos neuronales de ASMKo con la adición de los inhibidores de la FAAH a 50µM durante 1h (JNJ, PF, URB) y la administración de AEA 25µM el mismo tiempo. La gráfica muestra la media ± SEM de los porcentajes de concentración de SM respecto al Veh (EtOH) (n = 3 cultivos neuronales diferentes. $P_{Veh/JNJ} = 0,0084$. $P_{Veh/PF} = 0,0063$. $P_{Veh/URB} < 0,0001$. $P_{Veh/JNJ+AEA} = 0,0175$. $P_{Veh/PF+AEA} = 0,0216$. $P_{Veh/URB+AEA} < 0,0001$).

4.2.3. Los FAAHi no causan toxicidad en neuronas ASMKo en cultivo

Dada la eficacia de los FAAHi para reducir la SM en neuronas ASMKo y con la idea de trasladar estos tratamientos *in vitro* a la situación *in vivo* en el ratón decidimos comprobar si los tratamientos provocaban toxicidad en las neuronas en cultivo. Se analizaron los posibles efectos tóxicos de los distintos inhibidores mediante dos pruebas: análisis de la morfología de las neuronas mediante la tinción con MAP2 y ensayos de TUNEL para cuantificar células apoptóticas. Ninguno de los tratamientos con 25µM AEA, 50µM JNJ, 50µM PF o 50µM URB durante 1 hora alteró de manera significativa la morfología de las neuronas ASMKo que presentaban procesos homogéneos (**Figura R 17a**). Los tratamientos tampoco aumentaron el número de células apoptóticas medidas por TUNEL que se compararon con neuronas ASMKo tratadas con vehículo o con neuronas tratadas con H₂O₂ como control positivo de apoptosis (**Figura R 17b**) [+Ctrl (H₂O₂): 100%; Veh (DMSO): 8 ± 3,512 %; 25µM AEA: 6,667 ± 2,028 %; 50µM JNJ: 9,000 ± 2,646 %; 50µM PF: 8,333 ± 0,8819 %; 50µM URB: 6,333 ± 2,963 %].

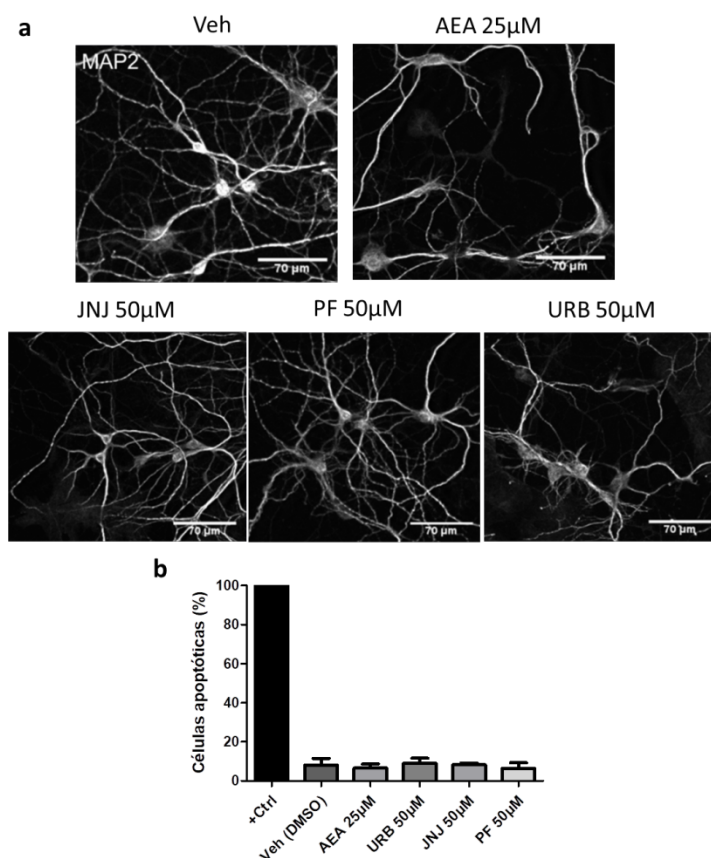


Figura R 17. Toxicidad por los tratamientos con AEA o FAAHi. a) Imágenes de IF para la tinción con el marcador dendrítico MAP2 (blanco) en neuronas hipocámpales de ratones ASMKo en cultivo tratadas con AEA 25µM e inhibidores de la FAAH a 50µM durante 1h (JNJ, PF, URB). b) Cuantificación de las células apoptóticas con la técnica TUNEL. La gráfica muestra la media \pm SEM (b) (n = 2 cultivos neuronales diferentes).

La eficacia para reducir SM y la falta de toxicidad de los FAAHi en neuronas ASMKo en cultivo nos llevó a tratar a los ratones ASMKo. Para tal fin, y teniendo en cuenta el comportamiento similar de todos los FAAHi analizados, seleccionamos PF por tener buena absorción por vía oral, unirse a la enzima FAAH de forma irreversible (Johnson et al., 2011) y por presentar una elevación sostenida de AEA sin efectos adversos en voluntarios sanos (Ahn et al., 2011).

4.3. El tratamiento oral con PF durante dos meses tiene efectos terapéuticos en ratones ASMKo

Para el estudio in vivo se seleccionaron 40 ratones (20 WT y 20 ASMKo) divididos en grupos de 10 (WT vehículo, WT PF, ASMKo vehículo y ASMKo PF) con un número similar de machos y hembras en cada uno. El tratamiento con PF comenzó al mes y medio de edad, cuando los síntomas motores de la enfermedad empiezan a evidenciarse en ligeros temblores y la población neuronal más vulnerable, las células de Purkinje del cerebelo, han empezado a degenerar sobre todo en el lóbulo anterior (Horinouchi et al., 1995). Teniendo en cuenta las dosis utilizadas en el ensayo clínico con voluntarios sanos y la farmacocinética de PF (Ahn et al., 2011) el compuesto se suministró a una dosis de 0,3 mg/kg cada 3 días por vía oral mediante sonda gástrica, siendo el vehículo 0,9% NaCl. Los ratones fueron tratados durante 8 semanas en los que se siguió la evolución del peso corporal.

Tras las 8 semanas se les realizó una batería de tests de comportamiento (explicados en detalle en métodos): Rota-rod para analizar coordinación motora, laberinto en Y para estudiar la memoria hipocampal, suspensión por la cola para analizar síntomas relacionados con la depresión y laberinto elevado en forma de cruz para estudiar los síntomas de ansiedad. Los dos últimos test fueron estudiados por la relación existente entre síntomas psiquiátricos y el SECB (Kaur et al., 2016). Tras los test de comportamiento se sacrificó a la mitad de los ratones para estudiar cambios bioquímicos e inmunohistoquímicos en cerebro y órganos periféricos. La otra mitad (5 ratones de cada grupo) continuó recibiendo el tratamiento para analizar la supervivencia.

4.3.1. El tratamiento con PF mejora el incremento de peso corporal y normaliza el comportamiento motor, cognitivo y psiquiátrico en ratones ASMKo

La curva de ganancia de peso es inferior en los ratones ASMKo comparada con los ratones WT (Perez-Canamas et al., 2016a), haciendo de este parámetro un indicador de la progresión de la enfermedad. La medida semanal del peso de los ratones durante las 8 semanas de tratamiento confirmó la dificultad para ganar peso de los ratones ASMKo sin tratar comparado

con los WT especialmente a partir de las 4 semanas. Sin embargo, el tratamiento con PF mejoró la ganancia de peso en todos los tiempos analizados (**Figura R 18**).

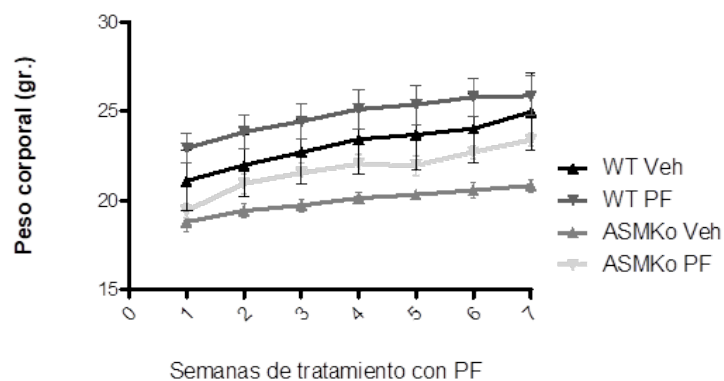


Figura R 18. Peso corporal de los ratones WT y ASMKo tratados con PF. La gráfica muestra la media \pm SEM del seguimiento de peso corporal (gr.) durante 7 semanas de tratamiento con PF (n = 10 ratones por grupo).

Los ratones ASMKo presentan neurodegeneración específica y temprana de las células de Purkinje del cerebelo (Perez-Canamas et al., 2016b) que son responsables de la coordinación motora. Por ello, los ratones ASMKo presentan una falta de coordinación que resulta evidente en la reducción del tiempo que son capaces de permanecer sobre un rodillo en movimiento en el test del Rota-rod. Confirmamos ese defecto en los ratones ASMKo sin tratar comparado con los WT. El tratamiento con PF aumentó significativamente el tiempo de permanencia sobre el rodillo de los ratones ASMKo en todos los ensayos realizados evidenciando la mejora en la coordinación motora. El tratamiento no tuvo efectos significativos en los ratones WT (**Figura R 19**).

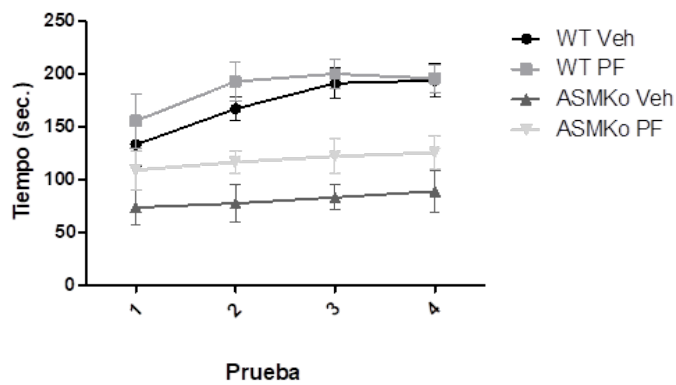


Figura R 19. Test del rota-rod en ratones WT y ASMKo tratados con PF. La gráfica muestra la media \pm SEM del tiempo (sec.) que se mantiene el animal en el rodillo en las 4 pruebas (n = 8 ratones por grupo).

Aunque no presentan muerte neuronal en el hipocampo, los ratones ASMKo tienen problemas sinápticos (Camoletto et al., 2009; Arroyo et al., 2014) en este área cerebral que llevan a una memoria hipocampal deficiente como evidencia el menor tiempo de exploración que los ratones pasan en el brazo nuevo del test del laberinto en Y (Arroyo et al., 2014). Confirmamos esta deficiencia en los ratones ASMKo que pasaron menos tiempo en el brazo abierto que el que pasan los ratones WT, mientras que el tratamiento no afecta a los WT pero sí aumenta el tiempo que pasaron en el brazo abierto los ratones ASMKo (**Figura R 20**) (*WT Veh*: $27,22 \pm 1,656$ %; *WT PF*: $27,22 \pm 1,656$ %; *ASMKo Veh*: $10,38 \pm 3,806$ %; *ASMKo PF*: $22,74 \pm 3,511$ %).

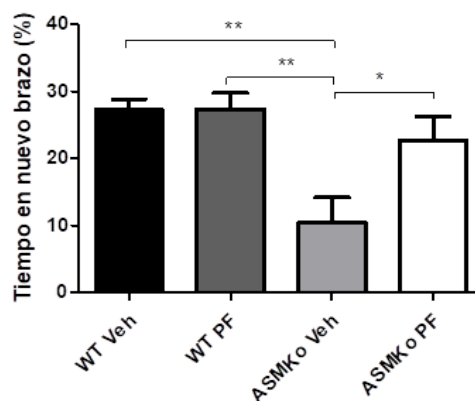


Figura R 20. Prueba Y-maze en ratones WT y ASMKo tratados con PF. La gráfica muestra la media \pm SEM del tiempo (%) que permanece el ratón en el brazo nuevo (n = 8 ratones por grupo. $P_{WT\ veh/ASMKo\ veh} = 0,0011$. $P_{WT\ PF/ASMKo\ Veh} = 0,006$. $P_{ASMKo\ Veh/ASMKo\ PF} = 0,0325$).

El SECB está relacionado con el control de emociones y sus alteraciones pueden provocar estados de depresión y ansiedad (Kaur et al., 2016). Teniendo en cuenta la baja expresión de CB_1 en los ratones ASMKo exploramos estos estados mediante los test de suspensión por la cola y el del laberinto elevado en cruz, respectivamente. Los ratones ASMKo se movieron menos que los ratones WT, lo que sugiere un estado depresivo. El tratamiento con PF aumentó el tiempo de movilidad de los ratones ASMKo que fue parecido al de los ratones WT. El tratamiento con PF no alteró los tiempos de movilidad en los ratones WT (**Figura R 21a**) (*WT Veh: 116,1 \pm 10,72 seg; WT PF: 124,4 \pm 5,862 seg; ASMKo Veh: 52,83 \pm 16,47 seg; ASMKo PF: 95,17 \pm 23,76 seg*).

En el laberinto elevado en cruz los ratones ASMKo pasaron menos tiempo (11% menos) que los WT en los brazos abiertos indicativo de una mayor ansiedad. El tratamiento con PF normalizó el tiempo que los ratones ASMKo pasaron en los brazos abiertos (25%) comparable al que pasan los ratones WT cuyo comportamiento no se vio alterado por el tratamiento (**Figura R 21b**) (*WT Veh: 25,92 \pm 3,772 %; WT PF: 27,22 \pm 1,656%; ASMKo Veh: 14,17 \pm 3,295 %; ASMKo PF: 25.52 \pm 4.627 %*).

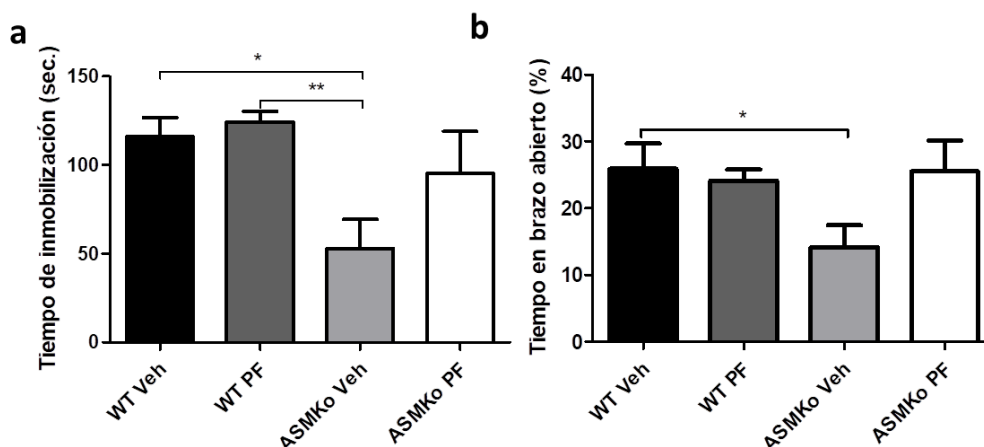


Figura R 21. Tests de la suspensión por la cola y del laberinto elevado en cruz realizados en ratones WT y ASMKo con el tratamiento de PF. Las gráficas muestra la media \pm SEM del tiempo (sec.) que permanece el animal inmóvil en la prueba de suspensión por la cola (a) y del tiempo (%) que permanece el ratón en el brazo abierto (b) [n = 8 ratones por grupo. $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,049(a)$; $P_{WT PF/ASMKo Veh} = 0,004(a)$; $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0342(b)$].

Los resultados obtenidos del análisis *in vivo* durante el tratamiento con PF indicaron beneficios en la ganancia del peso corporal, la coordinación motora, la memoria y los síntomas psiquiátricos en los ratones ASMKo. Ésto nos animó a llevar a cabo el análisis celular y molecular, por métodos bioquímicos y por microscopía, en el cerebro y en tejidos periféricos tras el tratamiento.

4.3.2. El tratamiento con PF reduce la neurodegeneración, la astrogliosis, la microgliosis y el tamaño de los lisosomas en el cerebelo de ratones ASMKo

La neurodegeneración de las células de Purkinje (PC) del cerebelo es una característica patológica temprana en ratones ASMKo (Macauley et al., 2008) (Perez-Canamas et al., 2016a) que explica los problemas motores. Para determinar si el tratamiento con PF, que mejoró la coordinación motora en estos ratones, prevenía la muerte de las PC se realizaron inmunofluorescencias con un anticuerpo contra el marcador específico de estas neuronas, la calbindina. Este análisis reveló una notable disminución (71%) del número de PC en ratones ASMKo comparado con ratones WT. El tratamiento con PC previno la muerte de las PC en un

15% en los ratones ASMKo mientras que no tuvo efecto en el número de PC de ratones WT (**Figura R 22**) (*WT Veh*: $55,35 \pm 4,766$ Cel/mm²; *WT PF*: $53,64 \pm 2,995$ Cel/mm²; *ASMKo Veh*: $15,71 \pm 2,324$ Cel/mm²; *ASMKo PF*: $32,96 \pm 3,368$ Cel/mm²).

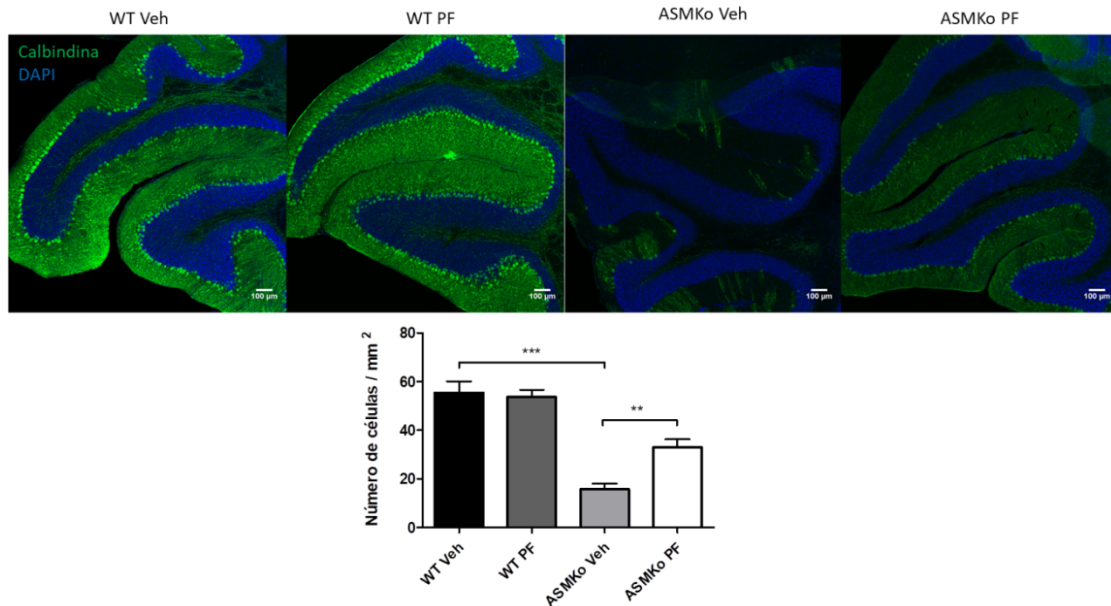


Figura R 22. Expresión de Calbindina en el cerebelo de los ratones WT y ASMKo tratados con PF. Imágenes de IF en el cerebelo de animales tratados con la Calbindina marcando las PC (verde) y DAPI los núcleos (azul). La gráfica muestra la media \pm SEM del número de células de Calbindina/mm² (n = 5 ratones por grupo. $P_{WT\ Veh/ASMKo\ Veh} < 0,0001$; $P_{ASMKo\ Veh/ASMKo\ PF} = 0,004$).

La neurodegeneración en el cerebelo de los ratones ASMKo se ha relacionado con la presencia de astrogliosis y microgliosis en esta área cerebral que no son tan evidentes en otras regiones como el hipocampo y corteza donde no hay muerte neuronal (Gabande-Rodriguez et al., 2018). Por ello, y como forma de analizar la neuroinflamación, se realizaron inmunofluorescencias en estas áreas cerebrales, con un anticuerpo contra el marcador de astrocitos GFAP (**Figura R 23**) (*WT Veh*: $170,8 \pm 6,640$ U.A.; *WT PF*: $189,0 \pm 7,545$ U.A.; *ASMKo Veh*: $292,2 \pm 20,59$ U.A.; *ASMKo PF*: $236,3 \pm 5,443$ U.A.). Confirmamos que la intensidad asociada a GFAP era 80% mayor en el cerebelo de los ratones ASMKo comparado con los WT sin tratar. El tratamiento

RESULTADOS

con PF disminuyó la intensidad asociada a GFAP en el cerebelo de los ratones ASMKo en un 45% mientras que no tuvo efecto en los ratones WT.

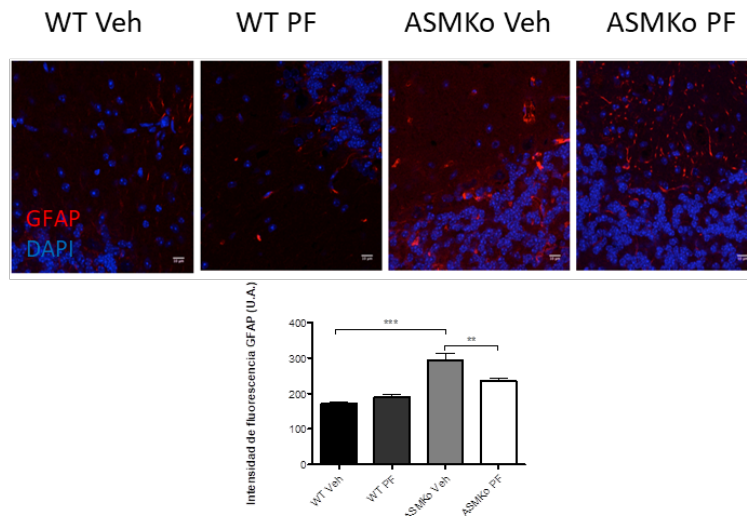


Figura R 23 Expresión de GFAP en cerebelo de ratones WT y ASMKo tratados con PF. Imágenes representativas de IF para GFAP (rojo), marcador de astrocitos, y DAPI(azul) como marcador del núcleo. La gráfica muestra la media \pm SEM de la intensidad de fluorescencia de GFAP medida en unidades arbitrarias ($n = 5$ ratones por grupo. $P_{WT Veh/ASMKo Veh} < 0,0001$; $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,00136$).

La medida del número de microglía gracias a la tinción con el marcador específico Iba1 (**Figura 24a**) (*WT Veh: $0,02294 \pm 0,002631$ Cel*1.000/ μm^2 ; WT PF: $0,02512 \pm 0,004504$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo Veh: $0,07428 \pm 0,005410$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF: $0,05025 \pm 0,005261$ Cel*1.000/ μm^2) también confirmó la existencia de microgliosis (200% más células de microglía) en el cerebelo de los ratones ASMKo comparado con los ratones WT en el cerebelo pero no en hipocampo y corteza. El tratamiento con PF redujo el número de microglía en un 30% en el cerebelo de los ratones ASMKo sin tener efectos en los ratones WT ni en otras áreas cerebrales. Un estado activado de la microglía puede cambiar su morfología pasando de tener ramificaciones a una forma ameboides. La tinción con Iba1 puso de manifiesto que el área de la microglía es significativamente mayor en los ratones ASMKo y que el tratamiento con PF la disminuye en un 30% (**Figura 24b**) (*WT Veh: $51,16 \pm 4,782$ μm^2 ; WT PF: $53,24 \pm 7,266$ μm^2 ; ASMKo Veh: $165,9 \pm 12,24$ μm^2 ; ASMKo PF: $104,9 \pm 15,81$ μm^2).**

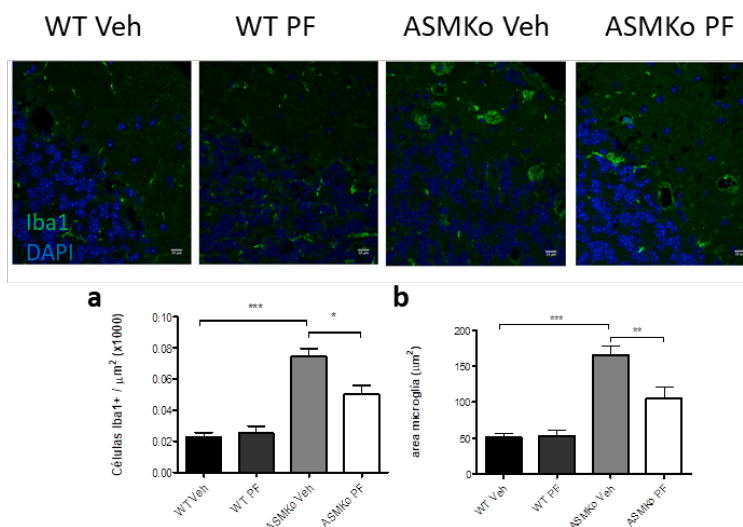


Figura R 24. Expresión de Iba1 en el cerebelo de los animales WT y ASMKo con el tratamiento de PF. Imágenes de IF del cerebelo de los WT y ASMKo tratados con PF con el anticuerpo Iba1 (verde) y los núcleos con DAPI (azul). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número de células positivas para Iba1 ($\times 1000$)/ μm^2 (a) y el área (μm^2) de las células Iba1 (b) [n = 5 ratones por grupo. $P_{\text{WT Veh/ASMKo Veh}} < 0,0001$ (a); $P_{\text{ASMKo Veh/ASMKo PF}} = 0,00136$ (a); $P_{\text{WT Veh/ASMKo Veh}} < 0,0001$ (b) $P_{\text{ASMKo Veh/ASMKo PF}} = 0,0048$ (b)].

El aumento del tamaño de los lisosomas debido a la acumulación de lípidos es característica en las PC de ratones ASMKo (Gabande-Rodriguez et al., 2014; Perez-Canamas et al., 2016a). Analizamos el tamaño lisosomal en las PC del cerebelo mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la proteína de membrana lisosomal Lamp1 (**Figura R 25**) (WT Veh: $0,7185 \pm 0,06832 \mu\text{m}^2$; WT PF: $0,5590 \pm 0,1022 \mu\text{m}^2$; ASMKo Veh: $1,305 \pm 0,1198 \mu\text{m}^2$; ASMKo PF: $0,8376 \pm 0,09139 \mu\text{m}^2$). El área media de los lisosomas fue 80% mayor en las PC de ratones ASMKo comparado con ratones WT sin tratar. El tratamiento con PF redujo en un 40% el área lisosomal en ratones ASMKo mientras que no tuvo efecto en los lisosomas de ratones WT.

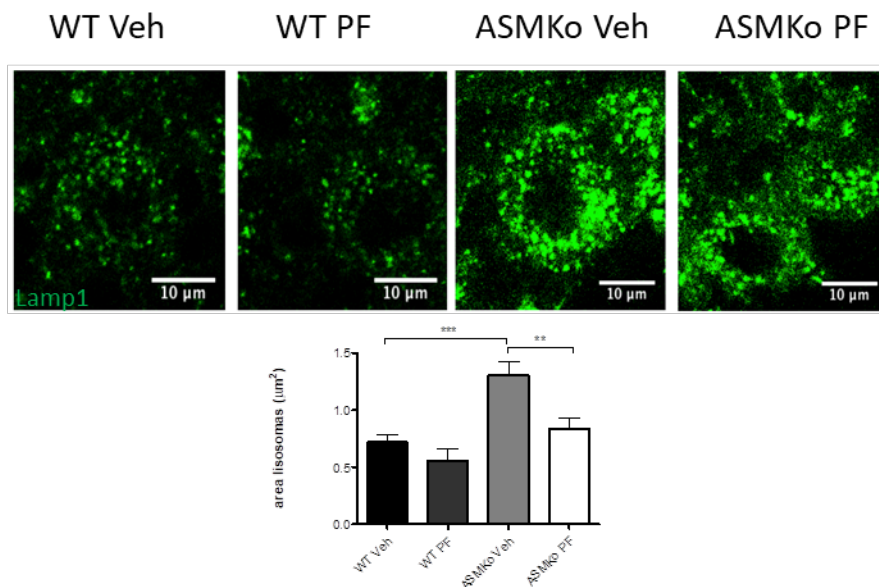


Figura R 25. Marcaje lisosomal en el cerebelo de los ratones WT y ASMKo tratados con PF. Imágenes de IF para la tinción de lisosomas mediante Lamp1 (verde). La gráfica muestra la media \pm SEM del área de los lisosomas (μm^2) ($n = 5$ ratones por grupo. $P_{\text{WT Veh/ASMKo Veh}} < 0,0001$; $P_{\text{ASMKo Veh/ASMKo PF}} = 0,0027$).

4.3.3. El tratamiento con PF no cambia los niveles de CB_1 pero aumenta los niveles de AEA y de NSM en el cerebro de ratones ASMKo

Teniendo en cuenta que el mecanismo de acción de PF impacta directamente en el SECB mediante la inhibición de la enzima hidrolítica de AEA, FAAH, decidimos analizar los efectos del tratamiento en distintos componentes de SECB. Se midió la concentración de AEA por espectrometría de masas y HPLC en extractos cerebrales de ratones WT y ASMKo tratados o no con PF (**Figura R 26**) (*WT Veh*: $2,100 \pm 0,4564 \text{ pmol/mL}$; *WT PF*: $4,400 \pm 0,2646 \text{ pmol/mL}$; *ASMKo Veh*: $2,325 \pm 0,2394 \text{ pmol/mL}$; *ASMKo PF*: $4,575 \pm 0,3966 \text{ pmol/mL}$). El tratamiento duplicó la cantidad AEA en el cerebro de ratones WT (110% más) y ASMKo (95% más) confirmando la eficacia de PF para inhibir la FAAH *in vivo*.

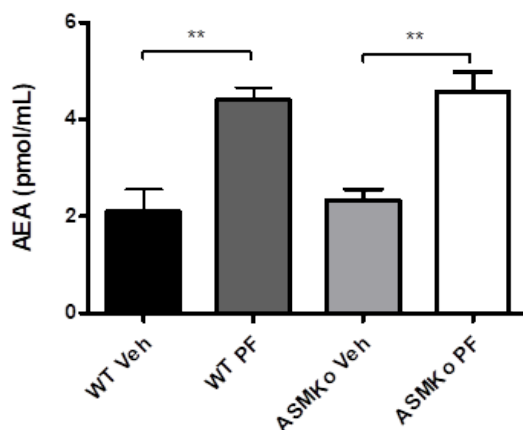


Figura R 26. Concentración de AEA en hipocampo de los ratones WT y ASMKo tratados con PF. Medición de la concentración de AEA hecha con espectroscopía de masas. La gráfica muestra la media \pm SEM de la concentración de AEA (pmol/mL) (n = 4 ratones por grupo. $P_{WT\ Veh/WT\ PF} = 0,0048$; $P_{ASMKo\ Veh/ASMKo\ PF} = 0,0028$).

El análisis por WB de la expresión proteica de la NSM en extractos hipocámpales reveló un leve incremento no significativo de la enzima en los ratones WT y un aumento significativo en los ASMKo tratados con PF respecto a los no tratados, aunque fue significativo sólo en los ratones ASMKo (**Figura R 27**) (WT Veh: $2,100 \pm 0,4564$ U.A.; WT PF: $4,400 \pm 0,2646$ U.A.; ASMKo Veh: $2,325 \pm 0,2394$ U.A.; ASMKo PF: $4,575 \pm 0,3966$ U.A.).

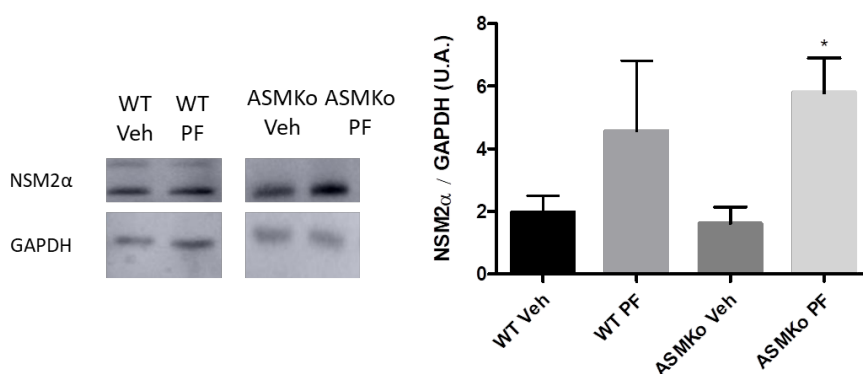


Figura R 27. Expresión de NSM en el hipocampo de los ratones con el tratamiento de PF. WB de la proteína NSM y GAPDH como control de carga en los ratones WT y ASMKo tratados con PF. La gráfica muestra la media \pm SEM del ratio de intensidad de NSM/GAPDH medido en unidades arbitrarias (n = 4 ratones por grupo. $P_{ASMKo\ Veh/ASMKo\ PF} = 0,0271$).

RESULTADOS

Para determinar si el incremento de AEA provocado por el tratamiento con PF resultaba en un aumento de los niveles de CB₁, que están anormalmente reducidos en los ratones ASMKo, analizamos los niveles de ARNm y de proteína del receptor por RT-qPCR y por inmunofluorescencia, respectivamente. El tratamiento produjo un aumento ligero (10%) pero significativo del ARNm de CB₁ en el hipocampo de los ratones ASMKo sin afectar a los WT (Figura R 28) (WT Veh: $1,022 \pm 0,1173$ U.A.; WT PF: $0,8823 \pm 0,08711$ U.A.; ASMKo Veh: $0,4380 \pm 0,01355$ U.A.; ASMKo PF: $0,5135 \pm 0,02417$ U.A.) Este tratamiento también aumentó la proteína CB₁ en el hipocampo de los ratones ASMKo, pero no hubo incremento ni en cerebelo ni en corteza (Figura R 29).

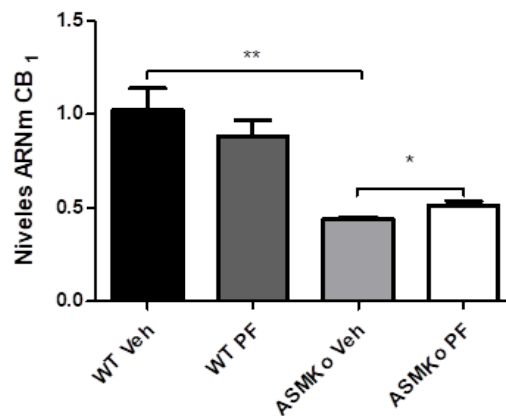


Figura R 28. Expresión génica del CB₁ en el hipocampo de los ratones tratados con PF. La gráfica muestra la media \pm SEM de los niveles del gen CB₁ en unidades arbitrarias (n = 4 ratones por grupo. $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0026$; $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0345$).

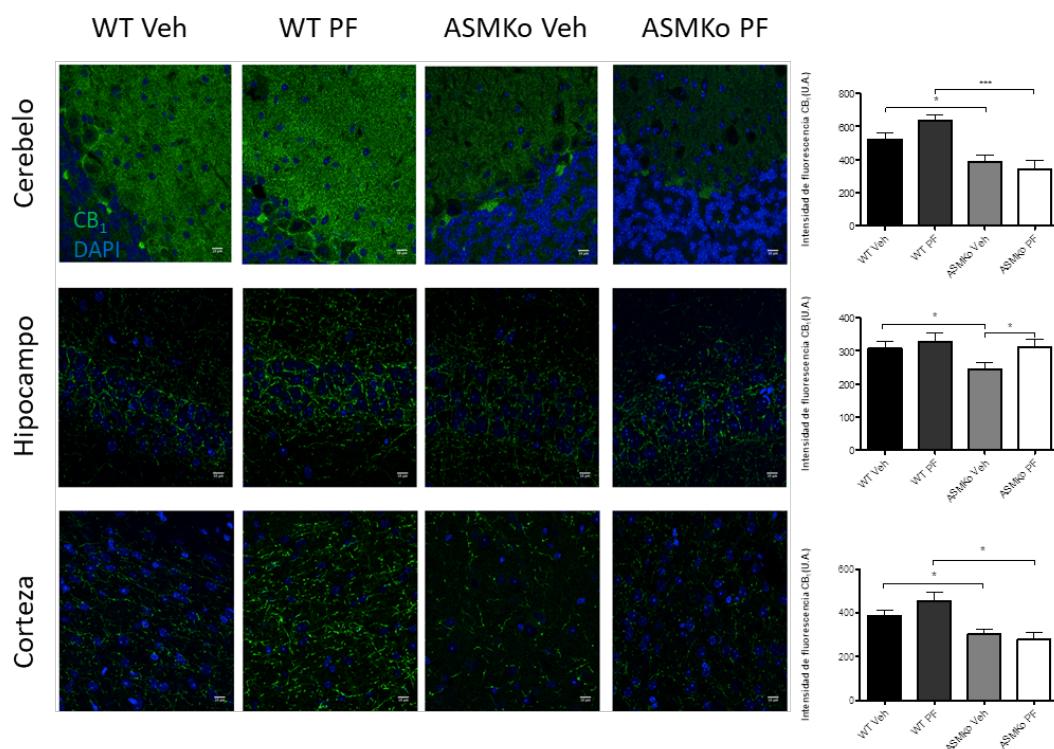


Figura R 29. Expresión del CB₁ en el cerebro de los animales tratados con PF. Imágenes de IF de cerebelo, hipocampo y corteza para el CB₁ (verde) y marcando los núcleos con DAPI (azul). Las gráficas muestran la media \pm SEM la intensidad de fluorescencia del CB₁ en unidades arbitrarias [n = 5 ratones por grupo. $P_{WT\ Veh/ASMKo\ Veh} = 0,0227$ (Cer); $P_{WT\ PF/ASMKo\ PF} < 0,0001$ (Cer); $P_{WT\ Veh/ASMKo\ Veh} = 0,026$ (Hip); $P_{ASMKo\ Veh/ASMKo\ PF} = 0,0345$ (Hip); $P_{WT\ Veh/ASMKo\ Veh} = 0,0225$ (Cor); $P_{WT\ PF/ASMKo\ PF} = 0,026$ (Cor)].

4.4.3. El tratamiento con PF reduce los niveles de SM en cerebro y tejidos periféricos de los ratones ASMKo y alarga su esperanza de vida.

El aumento de la AEA y de NSM y los beneficios en las alteraciones celulares y moleculares en el cerebro de ratones ASMKo tratados con PF nos llevó a analizar si el tratamiento reducía los niveles anormalmente altos de SM que caracteriza al cerebro y tejidos periféricos de los ratones ASMKo. La concentración de SM se midió por ensayos enzimáticos en extractos conteniendo la misma cantidad de proteína de distintas áreas cerebrales. La reducción de los niveles de lípido fue evidente en todas ellas: 23% en cerebelo (**Figura R 30a**) (WT Veh: $50,21 \pm 2,178$ nmol/mg de prot.; WT PF: $48,34 \pm 4,475$ nmol/mg de prot.; ASMKo Veh: $91,01 \pm 0,7001$ nmol/mg de prot.; ASMKo PF: $67,18 \pm 3,757$ nmol/mg de prot.), 13% en hipocampo (**Figura R 30b**) (WT Veh: $74,85 \pm 2,379$

RESULTADOS

nmol/mg de prot.; WT PF: $74,24 \pm 4,397$ nmol/mg de prot.; ASMKo Veh: $128,8 \pm 7,220$ nmol/mg de prot.; ASMKo PF: $109,3 \pm 2,155$ nmol/mg de prot.) y 37% en corteza (**Figura R 30c**) (WT Veh: $38,02 \pm 2,011$ nmol/mg de prot.; WT PF: $46,53 \pm 1,847$ nmol/mg de prot.; ASMKo Veh: $130,1 \pm 24,87$ nmol/mg de prot.; ASMKo PF: $82,15 \pm 4,240$ nmol/mg de prot.). Los niveles de SM en los ratones WT no se vieron alterados por el tratamiento con PF.

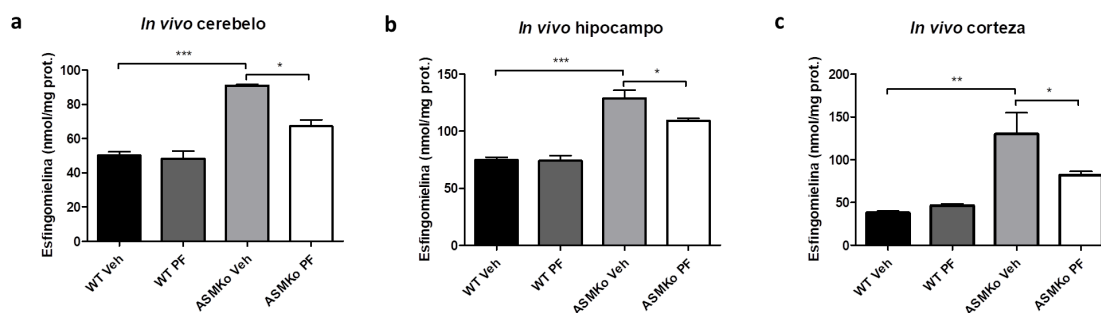


Figura R 30. Concentración de SM en cerebro de los WT y ASMKo tratados con PF. Las gráficas muestran la media \pm SEM de la concentración de SM (nmol/mg prot.) en el cerebelo(a), hipocampo(b), y corteza(c) de los ratones WT y ASMKo tratados con PF [n = 4 ratones por grupo. $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0002$ (a); $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0135$ (a); $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0007$ (b); $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0236$ (b); $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0041$ (c); $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0439$ (c)].

Al ser el tratamiento con PF oral y por tanto sistémico analizamos los niveles de SM no sólo en cerebro si no también en tejidos periféricos como el hígado, bazo y pulmones donde la acumulación del lípido es particularmente marcada en NPA (Schuchman y Wasserstein, 2015). Los ratones ASMKo tratados con PF presentaron menores niveles de SM en el hígado (35% menos) (**Figura R 31a**) (WT Veh: $121,7 \pm 10,66$ nmol/mg de prot.; WT PF: $119,3 \pm 9,523$ nmol/mg de prot.; ASMKo Veh: $299,4 \pm 5,723$ nmol/mg de prot.; ASMKo PF: $207,3 \pm 7,965$ nmol/mg de prot.) y en el bazo (30% menos) (**Figura R 31b**) (WT Veh: $100,0 \pm 10,02$ nmol/mg de prot.; WT PF: $93,79 \pm 3,795$ nmol/mg de prot.; ASMKo Veh: $226,1 \pm 18,66$ nmol/mg de prot.; ASMKo PF: $153,4 \pm 10,85$ nmol/mg de prot.) comparados con los ratones ASMKo sin tratar. En los pulmones se observó una tendencia a la disminución (25%) pero no significativa (**Figura R 31c**) (WT Veh: $117,8 \pm 8,810$ nmol/mg de prot.; WT PF: $121,3 \pm 9,206$ nmol/mg de prot.; ASMKo Veh: $252,6 \pm 80,99$ nmol/mg de prot.; ASMKo PF: $174,7 \pm 27,73$ nmol/mg de prot.). Este menor efecto en pulmones podría deberse a una menor expresión de CB₁ en este tejido

comparado con cerebro, hígado o bazo (Buchholz et al., 2017). El tratamiento con PF no alteró los niveles de SM en ratones WT en ninguno de los tejidos analizados.

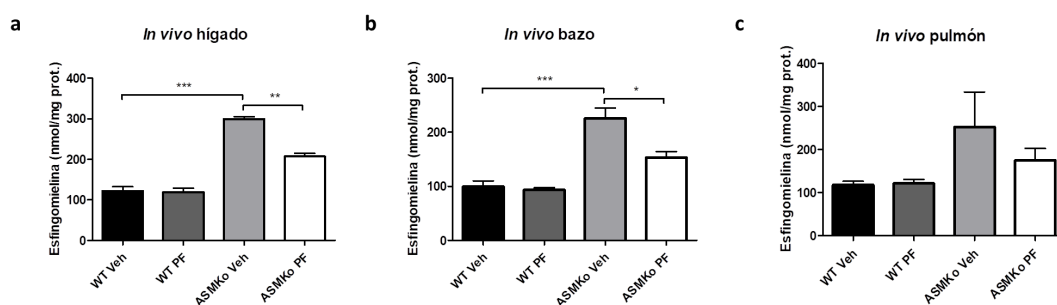


Figura R 31. Concentración de SM en tejidos periféricos de los WT y ASMKo tratados con PF. Las gráficas muestran la media \pm SEM de la concentración de SM (nmol/mg prot.) en el hígado(a), bazo(b), y pulmón(c) de los ratones WT y ASMKo tratados con PF [n = 4 ratones por grupo. $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0004$ (a); $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0037$ (a); $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0026$ (b); $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0346$ (b); $P_{WT Veh/ASMKo Veh} = 0,0041$ (c); $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0439$ (c)].

Los beneficios observados en los ratones ASMKo tras el tratamiento oral durante 8 semanas nos animaron a prolongarlo en un grupo de ratones para analizar el efecto en la supervivencia (**Figura R 32**). Mientras que la esperanza de vida media de los ratones ASMKo sin tratar fue de 29 semanas el tratamiento con PF la aumentó a 38 semanas, lo que supone un incremento del 31%. El tratamiento con PF no afectó la supervivencia de los ratones WT durante las 50 semanas analizadas.

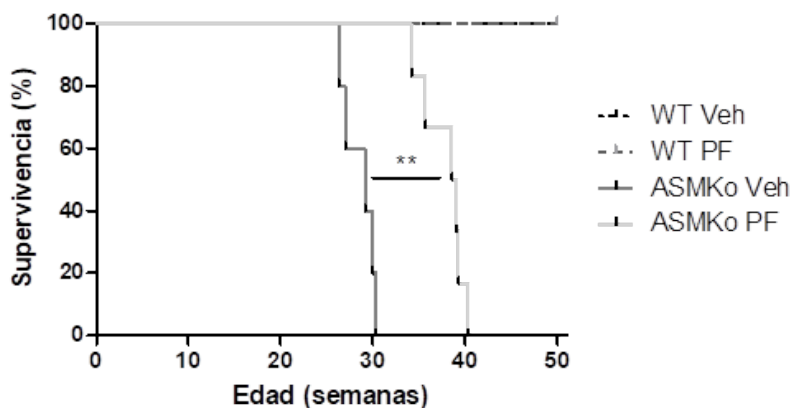


Figura R 32. Supervivencia de los ratones WT y ASMKo tratados con PF. La gráfica el número de ratones (%) por la edad (semanas) que sobreviven mediante el tratamiento de PF (n = 5 ratones por grupo, 6 de ASMKo PF. $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF} = 0,0031$).

4.4. El tratamiento agudo con PF en estadios avanzados de la enfermedad no produce toxicidad y disminuye la SM y la inflamación en ratones ASMKo

Los efectos beneficiosos observados en ratones ASMKo tras el tratamiento durante dos meses con PF que disminuyó la acumulación de SM, previno la neurodegeneración y la gliosis y mejoró el comportamiento motor, cognitivo y psiquiátrico, así como la esperanza de vida cuando el tratamiento se prolongó hasta los diez meses de edad, apoyaban la aplicación de este tratamiento en pacientes NPA. A través de la Fundación Wylder Nation y gracias a la Dra. Melissa Wasserstein del Hospital infantil Montefiore de Nueva York se planteó tratar a un paciente de NPA con la enfermedad muy avanzada. En este estadio, la acumulación de SM es muy alta y su degradación rápida y masiva podría llevar a niveles elevados de los metabolitos de este lípido como la ceramida y la esfingosina que son proinflamatorios (Dbaibo et al., 1993). El tratamiento con PF que llevamos a cabo en ratones ASMKo sin evidenciar toxicidad comenzó a una edad (1,5 meses) en la que el aumento de los niveles de SM no es aún muy marcado (menos del doble comparado con el aumento de casi 5 veces que se observa a los 4 meses de

edad (Horinouchi et al., 1995). Para descartar toxicidad de PF en un estadio avanzado de la enfermedad, similar al del paciente a tratar, decidimos hacer un tratamiento agudo en ratones ASMKo de 4 meses de edad utilizando diferentes dosis de PF. En este estudio se utilizaron 15 ratones ASMKo divididos en varios grupos: vehículo; 0,1mg/kg PF; 1 mg/kg PF y 5 mg/kg PF. Ratones WT se dividieron en dos grupos: vehículo y 5 mg/kg PF. Se les administró PF por vía oral mediante sonda gástrica y se les sacrificó a las 48h para analizar toxicidad y medir los niveles de SM.

4.4.1. El tratamiento agudo con PF en ratones ASMKo de 4 meses no evidencia toxicidad a ninguna de las dosis utilizadas

Ninguno de los ratones, tanto ASMKo como WT, presentó reacciones adversas evidentes (i.e. pérdida de pelo o peso, letargia, convulsiones) tras la administración de PF y hasta el sacrificio a las 48 horas. El análisis visual de cerebro e hígado no reveló cambios morfológicos significativos. La toxicidad tisular se analizó mediante microscopía en cortes teñidos con Hematoxilina y eosina (H&E) de distintas regiones cerebrales: cerebelo, hipocampo y corteza, y del hígado (**Figura R 33**). No se observó muerte celular en ninguno de los casos. En los ratones ASMKo si se observaron células agrandadas (“foam cells”) que son características en este estadio de la enfermedad por la acumulación de lípidos y que no se encontraron en los ratones WT. La apariencia de estas células no cambió significativamente tras el tratamiento con PF durante 48 horas en ninguna de las dosis administradas.

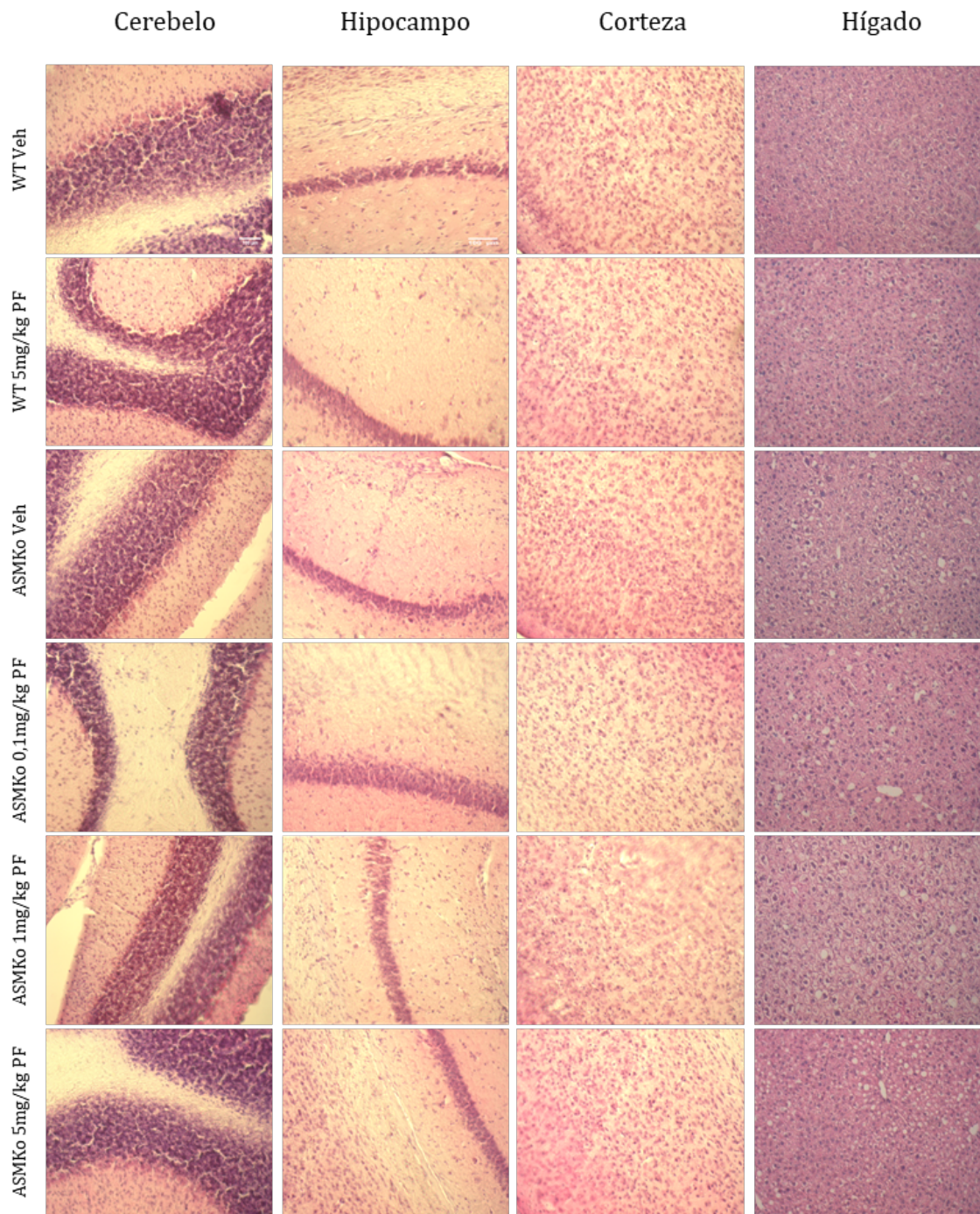


Figura R 33. H&E en cerebro e hígado de los ratones WT y ASMKo tratados con una dosis aguda de PF.
 Imágenes de H&E en cerebelo, hipocampo, corteza e hígado de WT y ASMKo tratados con 0,1mg/kg PF; 1 mg/kg PF y 5 mg/kg PF.

4.4.2. El tratamiento agudo con dosis altas de PF reduce ligeramente la SM en corteza y la inflamación en cerebro e hígado de ratones ASMKo

La falta de toxicidad evidente sugería que la degradación de SM no es excesiva en el tratamiento agudo a edades avanzadas utilizando la dosis de PF que se administraron en el

tratamiento crónico o dosis 10 y 50 veces mayores. Para confirmarlo procedimos a medir la cantidad de SM mediante ensayos enzimáticos en extractos de cerebelo (**Figura R 34a**) (*WT Veh*: $110,5 \pm 3,505$ nmol/mg de prot.; *WT PF 5*: $91,02 \pm 2,990$ nmol/mg de prot.; *ASMKo Veh*: $187,5 \pm 16,86$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 0,1*: $197,3 \pm 44,08$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 1*: $158,7 \pm 15,35$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 5*: $146,4 \pm 14,65$ nmol/mg de prot.), hipocampo (**Figura R 34b**) (*WT Veh*: $105,3 \pm 16,27$ nmol/mg de prot.; *WT PF 5*: $91,29 \pm 12,34$ nmol/mg de prot.; *ASMKo Veh*: $177,3 \pm 22,76$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 0,1*: $147,4 \pm 4,388$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 1*: $173,8 \pm 20,97$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 5*: $180,1 \pm 53,69$ nmol/mg de prot.), corteza (**Figura R 34c**) (*WT Veh*: $86,93 \pm 7,031$ nmol/mg de prot.; *WT PF 5*: $66,56 \pm 1,135$ nmol/mg de prot.; *ASMKo Veh*: $121,0 \pm 0,7273$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 0,1*: $115,5 \pm 3,229$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 1*: $119,0 \pm 1,302$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 5*: $101,8 \pm 3,003$ nmol/mg de prot.) e hígado (**Figura R 34d**) (*WT Veh*: $125,2 \pm 34,83$ nmol/mg de prot.; *WT PF 5*: $82,45 \pm 6,144$ nmol/mg de prot.; *ASMKo Veh*: $299,3 \pm 12,07$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 0,1*: $280,7 \pm 5,724$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 1*: $273,8 \pm 4,113$ nmol/mg de prot.; *ASMKo PF 5*: $233,0 \pm 12,48$ nmol/mg de prot.) conteniendo la misma cantidad de proteína. Los resultados evidenciaron el aumento de SM en los ratones ASMKo sin tratar comparados con los ratones WT. El tratamiento con dosis elevadas de PF en los ratones WT no afectó los niveles de SM. Tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de SM de los ratones ASMKo en ninguno de los tejidos analizados y a ninguna de las dosis de PF administradas excepto en la corteza a la dosis máxima de 5mg/kg. En estas condiciones la SM bajó en un 23% respecto a los ratones ASMKo tratados con vehículo. Se observó también una disminución dosis dependiente en el hígado pero que no llegó a ser significativa.

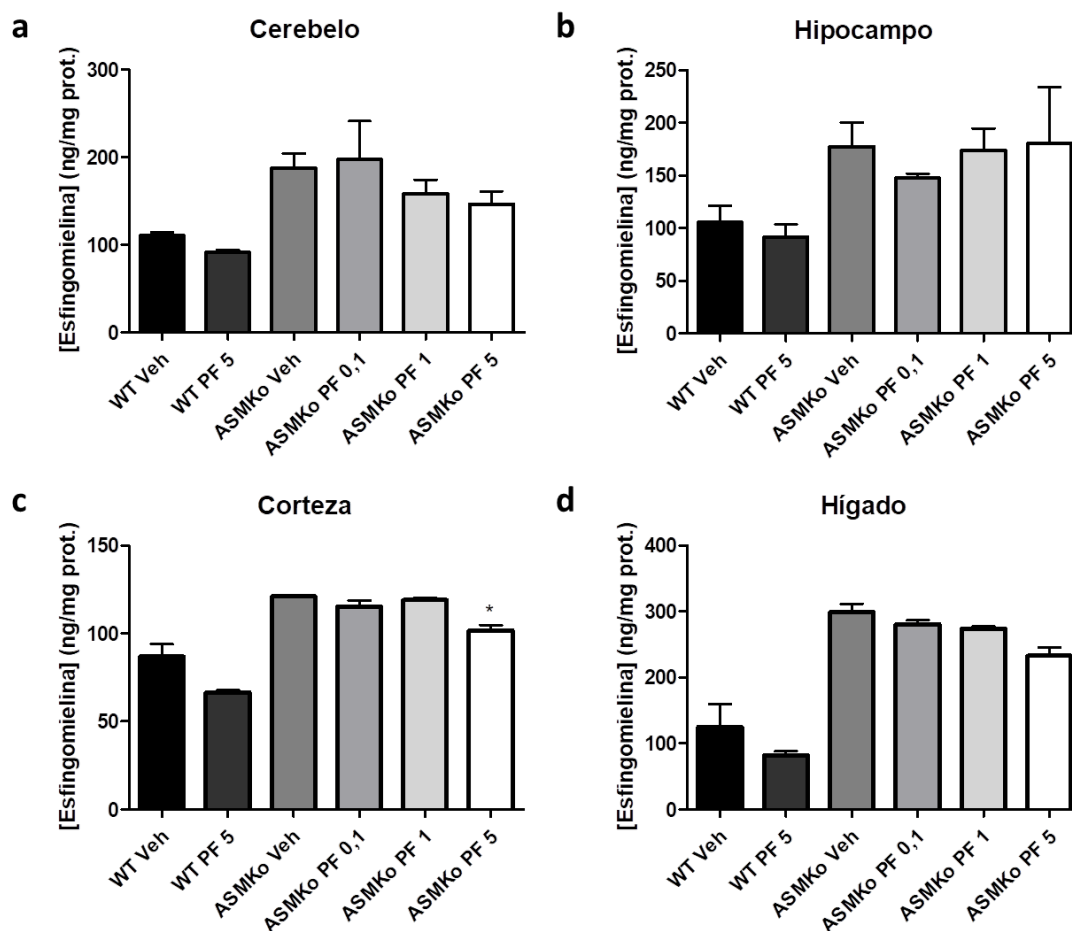


Figura R 34. Concentración de SM en cerebro e hígado de los ratones WT y ASMKo con dosis aguda de PF. Las gráficas muestran la media \pm SEM de la concentración de SM (nmol/mg prot.) en el cerebelo(a), hipocampo(b), corteza(c) e hígado(d) de los ratones WT y ASMKo tratados con 0,1mg/kg PF; 1 mg/kg PF y 5 mg/kg PF [n = 3 ratones por condición. $P_{ASMKo Veh/ASMKo PF 5} = 0,034$ (c)]

Como último análisis de los efectos de la administración aguda de PF en ratones ASMKo con la enfermedad avanzada determinamos el grado de inflamación en distintas áreas del cerebro mediante la tinción con Iba1. En cerebelo (**Figura R 35a**) (WT Veh: $0,1382 \pm 0,07136$ Cel*1.000/ μm^2 ; WT PF 5: $0,09212 \pm 0,04606$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo Veh: $0,5757 \pm 0,06595$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF 0,1: $0,5988 \pm 0,02913$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF 1: $0,6448 \pm 0,08493$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF 5: $0,4606 \pm 0,05826$ Cel*1.000/ μm^2), en hipocampo (**Figura R 35b**) (WT Veh: $0,1355 \pm 0,01166$ Cel*1.000/ μm^2 ; WT PF 5: $0,1732 \pm 0,01506$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo Veh: $0,6286 \pm 0,05197$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF 0,1: $0,6437 \pm 0,03438$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF 1: $0,5609 \pm 0,06072$ Cel*1.000/ μm^2 ; ASMKo PF 5: $0,3915 \pm 0,02075$ Cel*1.000/ μm^2), en corteza (**Figura R 35c**) (WT Veh: $0,3544 \pm 0,06070$ Cel*1.000/ μm^2 ; WT PF 5: $0,4017 \pm 0,06766$ Cel*1.000/ μm^2 ;

ASMKo Veh: $1,772 \pm 0,1083$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo PF 0,1: $1,701 \pm 0,1553$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo PF 1: $1,701 \pm 0,2005$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo PF 5: $1,205 \pm 0,06070$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$) y en el hígado mediante la tinción de macrófagos F4/80 (**Figura R 35d**) (WT Veh: $59,80 \pm 9,763$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; WT PF 5: $47,91 \pm 14,97$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo Veh: $179,6 \pm 10,35$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo PF 0,1: $165,9 \pm 12,24$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo PF 1: $147,3 \pm 9,370$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$; ASMKo PF 5: $126,4 \pm 8,835$ Cel* $1.000/\mu\text{m}^2$). El tratamiento con dosis máxima de PF 5mg/kg fue el único que disminuyó la inflamación significativamente en hipocampo, corteza e hígado de ratones ASMKo. Ningún tratamiento tuvo efecto en los ratones WT.

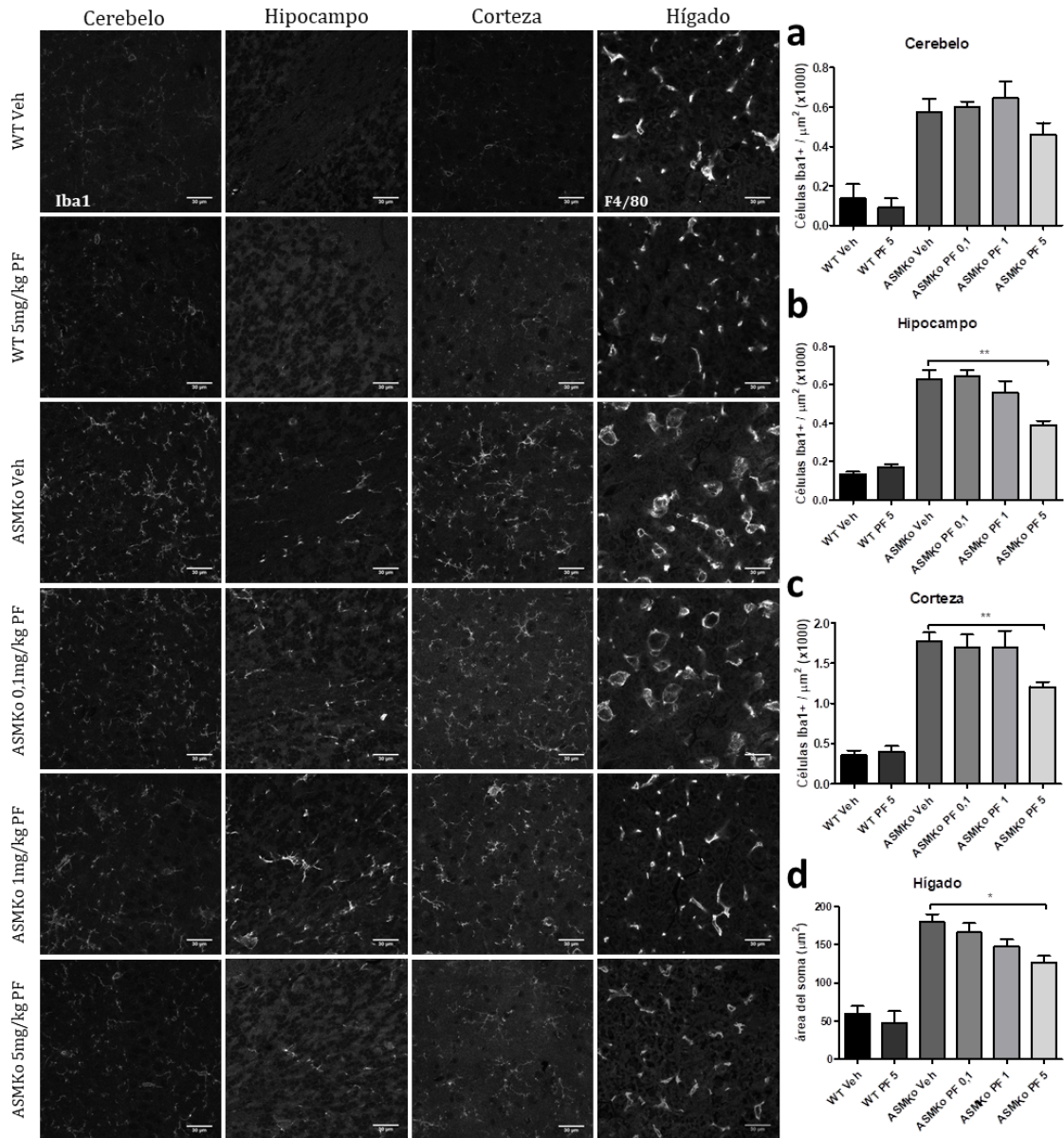


Figura R 35. Expresión de Iba1 en cerebro y área de los macrófagos en hígado. Imágenes de IF para cerebelo(a), hipocampo(b) y corteza(c) del marcaje con Iba1(blanco) de las células de microglía y marcaje de F4/80(blanco) de los macrófagos en el hígado(d). Las gráficas muestran la media \pm SEM del número de células positivas para Iba1 ($\times 1000$)/ μm^2 (a, b y c) y el área (μm^2) de las células F4/80 (d) [n = 3 ratones por grupo. $P_{\text{ASMKo Veh/ASMKo PF 5}} = 0,0017$ (b); $P_{\text{ASMKo Veh/ASMKo PF 5}} = 0,0010$ (c); $P_{\text{ASMKo Veh/ASMKo PF 5}} = 0,0012$ (d)].

5. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral, realizada en el modelo ASMKo para estudiar NPA, hemos identificado una nueva diana terapéutica para el tratamiento de esta patología en humanos. Al probar el mecanismo de acción para reducir SM a través de los CB₁ se abre una vía para reducir los síntomas y la inflamación que sucede en NPA. Además, hemos encontrado una relación entre los CB₁ y la SM, puesto que en los ratones ASMKo hemos descrito una reducción de los niveles de ARNm y de proteína de este receptor, debido a las altas concentraciones de SM. A su vez, la SM provoca un cambio en la localización de este receptor hacia los lisosomas, desvelando una nueva conexión entre la SM y la composición molecular de las membranas. Y por último hemos validado el tratamiento con un inhibidor de la enzima FAAH como efectivo para aliviar los síntomas y bajar la concentración de SM en el modelo ASMKo.

5.1. Influencia de la SM sobre el CB₁ en la membrana plasmática, su relación con los receptores mGlu5 y con el envejecimiento

La SM, al ser un componente esencial en la membrana plasmática, está implicada en multitud de procesos. Como he descrito en la introducción, la SM pertenece al grupo de lípidos que se intercalan con el colesterol para formar las balsas lipídicas (Kan et al., 1991). Las balsas lipídicas son dominios de membrana enriquecidos en lípidos que regulan procesos como la señalización celular o la exocitosis y endocitosis independiente de clatrina (Simons y Ikonen, 1997). Que se produzcan cambios en la concentración de SM, en este caso en la membrana plasmática, termina afectando a la composición de poblaciones de receptores o de los niveles de proteínas de membrana. Por ejemplo, observamos una disminución de los receptores mGluR1 con un aumento de la SM, impidiendo su unión a membrana y su actividad (Arroyo et

al., 2014). Este balance y homeostasis entre proteínas y lípidos es clave para el correcto funcionamiento de las sinapsis. El incremento de SM genera un menor tamaño de la espina dendrítica (Arroyo et al., 2014) y una disminución de SM incrementa la polimerización de la actina, aumentando el tamaño de la espina dendrítica (Franco-Villanueva et al., 2014). Relacionándolo con otros lípidos, la sinapsis excitatoria glutamatérgica continuada provoca una disminución de colesterol, cambiando la composición lipídica de la membrana plasmática neuronal (Sodero et al., 2012).

Estos resultados se pueden relacionar con lo ocurrido en el CB₁. Esta proteína es el receptor acoplado a proteínas G más abundante en el cerebro (Howlett et al., 2010) y junto con los otros componentes del SECB forman un sistema de neuroseñalización conservado evolutivamente que tiene un rol crucial en el sistema nervioso central (Katona y Freund, 2008). Durante los últimos años se ha vuelto evidente el papel de los lípidos de membrana, especialmente colesterol y esfingolípidos. Ambos lípidos regulan receptores acoplados a proteínas G como los β_2 -adrenérgicos o los de serotonina_{1A}, así como muchas proteínas asociadas a la membrana como las caveolinas (Pontier et al., 2008; Prinetti et al., 2009; Paila et al., 2010; Shrivastava et al., 2010). Por ello no es accidental que si existen cambios en la concentración de SM, el CB₁ se vea afectado. Relacionándolo con colesterol, se observó que la destrucción de las balsas lipídicas por la retirada de colesterol mediante metilciclodextrina doblaba la señalización de la vía adenilato ciclasa dependiente del CB₁ y las kinasas neuronales (Bari et al., 2005a; Bari et al., 2005b). Al contrario, ni el CB₂ que es estructural y funcionalmente parecido al CB₁, ni el TRPV1, fueron modificados por la depleción de colesterol (Bari et al., 2006). Este resultado concuerda con que ni el CB₂ ni la AEA se encuentran en estas balsas lipídicas (Bari et al., 2006; Maccarrone, 2008; Rimmerman et al., 2008). En el modelo ASMKo o en condiciones con alta concentración de SM vemos una reducción de la proteína y del ARNm del CB₁, mientras que en el mismo modelo no se observan diferencias en el CB₂ ni en el ligando endógeno AEA. Por eso nuestra hipótesis es que la SM está generando balsas

lipídicas aberrantes que encierran este receptor, impidiendo su correcto funcionamiento. Por otro lado, los receptores o proteínas no ancladas en las balsas lipídicas no se verían afectadas.

Por otro lado, existe una relación entre varios sistemas de neurotransmisión y el SECB. El núcleo estriado cerebral es una región subcortical rica en receptores CB₁. Estos receptores controlan tanto la señalización glutamatérgica como GABAérgica, principalmente a través de los mecanismos presinápticos (Ferre et al., 2010; Rossi et al., 2010). La aplicación directa de agonistas del CB₁ se ha demostrado que reduce la liberación de ambos neurotransmisores (Szabo et al., 1998; Gerdeman y Lovinger, 2001). Estas vías de señalización son las principales pero no las únicas, puesto que el CB₁ interviene también en vías de neurotransmisores, como por ejemplo en la vía dopaminérgica de los receptores D₂ (Centonze et al., 2004), regulando la neurotensina (Yin et al., 2008), la acetilcolina a través de los receptores M₁ (Narushima et al., 2007) y los receptores glutamatérgicos metabotrópicos mGlu5 (Maccarrone et al., 2008). La estimulación de los mGlu5 promueve la actividad de la enzima encargada de sintetizar 2-AG, la diacilglicerol lipasa (Jung et al., 2005; Jung et al., 2007), y el 2-AG sintetizado junto con la actividad fisiológica del CB₁ inhibe la corriente post-sináptica inhibitoria GABAérgica en el estriado (Maccarrone et al., 2008). Además, la elevación de AEA mediante la inhibición de la FAAH regula la interacción de mGlu5/2-AG por estimular el canal TRPV1 y el consecuente bloqueo del metabolismo de glutatión (Maccarrone et al., 2008) (**FIGURA D 1**). La evidencia muestra que el 2-AG es producido en la post-sinapsis en las neuronas estriatales en respuesta a los mGlu5 y que actúa en los receptores CB₁ presinápticos inhibiendo la liberación de GABA (Katona et al., 2006). De acuerdo con lo anterior, un estudio de ultraestructura demostró que la enzima diacilglicerol lipasa y mGlu5 están próximos en la superficie somatodendrítica de las proyecciones neuronales mientras que CB₁ estaba particularmente enriquecido en los axones terminales GABAérgicos de las neuronas estriatales (Uchigashima et al., 2007)

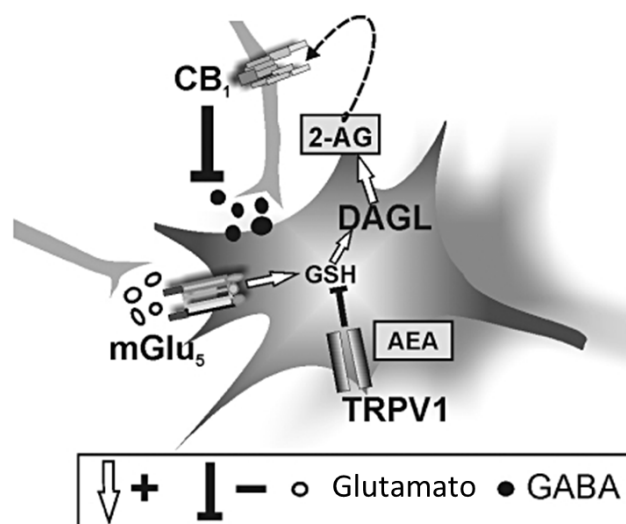


Figura D 1. Esquema de la activación del CB₁ a través del mGlu₅. Se representa que la estimulación excitatoria post-sináptica de glutamato en los mGlu₅ produce un incremento de glutatión que genera actividad de la diacilglicerol lipasa (DAGL), sintetizando 2-AG, ligando endocannabinoide. Este lípido viajará a la presinapsis donde activará los CB₁ que inhibirán la liberación de neurotransmisores.

En nuestro modelo ASMKo vemos una reducción de la proteína y del ARNm del CB₁, un receptor que se sintetiza bajo demanda, es decir, la estimulación de este receptor provoca que se sintetice en mayor concentración (Marsicano et al., 2003). Por este mecanismo de síntesis, por tener en estos ratones menor concentración de 2-AG, y por el esquema representado en la Figura D 1, nos preguntamos si esta vía está afectada. Estudios previos en nuestro laboratorio han descrito que en los ASMKo hay una disminución significativa de los receptores mGlu₅ (Arroyo et al., 2014), también presentes en las balsas lipídicas (Fourgeaud et al., 2003). Por lo tanto, observamos una disminución de una población de receptores excitatorios (mGlu₅), que promueven la síntesis del ligando endocannabinoide 2-AG y activan los receptores CB₁. Además, hemos realizado estudios preliminares con un modulador alostérico del mGlu₅, el CDPPB (Doria et al., 2015), (**Figura D 2**) para intentar reducir la SM a través de la activación del CB₁ tal y como aparece en el esquema de la Figura D 1.

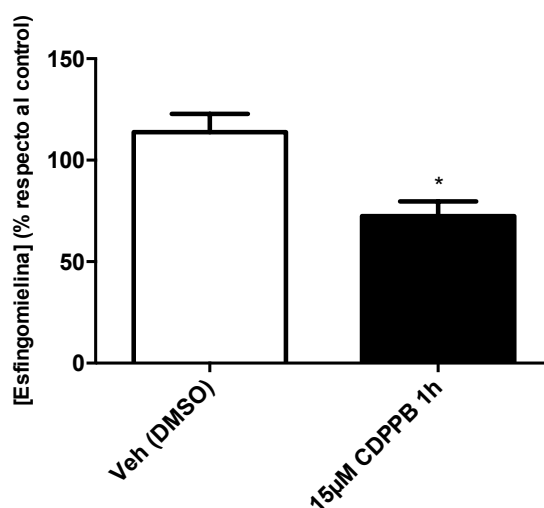


Figura D 2. Medida de SM con el tratamiento de un modulador del mGlu5. Se observa una reducción de la SM cuando tratamos las neuronas de ASMKo con un modulador alostérico del mGlu5, corroborando la hipótesis de que la activación de estos receptores provoca una activación de los CB₁.

No está definido todavía si el problema de los mGlu5 provoca la reducción de los CB₁ o si es un problema de la existencia de las balsas lipídicas afuncionales que bloquean la entrada de receptores (tanto mGlu5 como CB₁) pero lo que es probable es que sea un conjunto de ambos razonamientos. Y es que otro problema que existe en los ASMKo es el cambio de localización de los receptores CB₁ cuando los medimos mediante IF en neuronas con SM como en las de ASMKo. Aquí observamos una disminución de los receptores en la membrana plasmática, mientras que su concentración aumentaba en los lisosomas, donde también son activos. Otra de las hipótesis que barajamos para la reducción de los niveles de esta proteína es que al aumentar su localización en los lisosomas, se promueva aquí una mayor degradación, puesto que estos orgánulos están encargados del metabolismo y degradación de lípidos y proteínas. Así vemos un problema para que lleguen los CB₁ a la membrana plasmática, ya sea por las balsas lipídicas aberrantes, por una disminución de un mecanismo de síntesis directo (vía mGlu5), o porque esta patología cursa con más lisosomas y de mayor tamaño debido a la alta concentración de SM (Gabande-Rodriguez et al., 2018).

Para concluir esta cuestión, es destacable también que existe otra relación entre los receptores CB₁ y la SM. Hay varias evidencias en ratones y humanos que indican que el SECB tiene cambios durante el envejecimiento. En roedores, el ARNm y la unión específica de agonistas del CB₁ tienen un pico durante la pubertad en el cerebro, se mantiene estable en el adulto y decae dramáticamente en el cerebelo, hipocampo y corteza de los animales ancianos (Berrendero et al., 1998). Y en humanos ocurre el mismo proceso con los niveles de proteína entre jóvenes y adultos (Glass et al., 1997). De hecho, se le puede considerar un buen biomarcador de envejecimiento (Lopez-Otin et al., 2013). Al contrario que este receptor, los niveles de SM, o el porcentaje de esfingolípidos que son SM aumenta con la edad de los animales (Trovo et al., 2011). Por lo tanto, ya sea por los problemas en las balsas lipídicas o por la disminución de los mGlu5, esto es algo que ocurre también en condiciones normales, durante el envejecimiento hay un aumento progresivo de SM y una reducción de CB₁.

5.2. Modificaciones del SECB y su relevancia patológica

Como primer punto importante es que, aparte de verse afectadas por las técnicas experimentales, las medidas de endocannabinoides en tejido no reflejan necesariamente los niveles extracelulares de los ligandos (el 2-AG es un intermediario en el metabolismo de fosfolípidos) (Di Marzo, 2008). Por lo tanto, los cambios que se puedan producir en la concentración de endocannabinoides asociada con una patología deben ser evaluada y se debe medir su impacto biológico. Y es que hay multitud de ejemplos en la mayoría de áreas de interés terapéutico donde hay alteraciones del SECB relacionadas con la enfermedad. Muchas de estas áreas son las enfermedades neurodegenerativas, que están caracterizadas por deterioro cognitivo y otros defectos neurológicos. Tanto la progresión como la señalización que subyace a la mayoría de estas enfermedades no están bien definidas. El SECB a menudo se ve alterado por las perturbaciones celulares y desempeña una función pro-homeostática. (Di Marzo, 2008). Particularmente, cambios en la concentración de dos de los ligandos más estudiados, AEA y 2-AG, han sido observados en muchos desórdenes. Estos incluyen dolor e

inflamación (Hohmann y Suplita, 2006; Jhaveri et al., 2007) o trastornos del sistema inmune (Lambert, 2007).

Por ejemplo, estudios realizados en ratones CB₁Ko observaron que tenían peores resultados en aprendizaje o memoria medido con paradigmas de comportamiento entre un animal CB₁Ko y un WT (Albayram et al., 2012), situación que se corresponde con la baja tasa de aprendizaje y memoria que tienen los ASMKo como hemos observado en esta tesis y que hemos mejorado con el potenciamiento del SECB como tratamiento. Otro aspecto que se presenta en los CB₁Ko durante la edad es la pérdida acelerada de neuronas de CA1 y CA3 y la astrogliosis presente en esa región cerebral, del mismo modo que también hay microgliosis y elevación de las interleukinas proinflamatorias (Bilkei-Gorzo et al., 2012), al igual que los ratones ASMKo. Además, la presencia de estos receptores en astrocitos y microglía pone de manifiesto su función en el sistema inmune. De hecho se está planteando que la masiva respuesta inmune en las enfermedades neurodegenerativas provoca que haya más activación de los receptores cannabinoides dando lugar a una señalización antiinflamatoria (Hegde et al., 2010). Otro dato importante medido en los CB₁Ko es que muestran esos signos de neuroinflamación, aunque de forma más leve a nuestro modelo ASMKo, por ello la activación de estos receptores es clave para contrarrestar esta situación (Zoppi et al., 2011). En un ratón modelo de esclerosis múltiple se obtiene un aumento del 200% en la expresión del CB₂ en la microglía (Maresz et al., 2005) mientras que los niveles del CB₁ disminuyen en las neuronas (Maresz et al., 2007) siendo muy parecido a lo que ocurre en el ASMKo.

En los últimos 10-15 años, la capacidad de usar el SECB como diana terapéutica para proteger neuronas y algunas células gliales contra diferentes tipos de citotoxicidad ha sido investigada por diferentes grupos. Estos estudios se han concentrado en identificar dianas del SECB, como los receptores cannabinoides o enzimas del SECB que pueden ser farmacológicamente activadas o inhibidas, provocando neuroprotección en modelos

experimentales de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes (Fernandez-Ruiz et al., 2010a). Estos estudios exhaustivos han puesto al SECB en una posición relevante, desde que los resultados que se han generado indican que estos compuestos pueden servir como terapia para enfermedades neurodegenerativas modificando su progresión (Fernandez-Ruiz et al., 2010a). Y todo esto junto con los estudios clínicos en los que se analizó la eficacia de los inhibidores de la FAAH y más concretamente del PF (Ahn et al., 2011) nos encaminaron a comprobar si funcionaba en nuestro modelo animal. Primero comprobamos que efectivamente reducía la SM y no era tóxico *in vitro*, siendo estos resultados nuestros principales objetivos, y después, pasamos a proponer el estudio *in vivo*.

5.3. Uso del SECB para enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas

Cada vez hay más evidencias que indican que la inflamación y la neurodegeneración coexisten en los inicios de las clásicas enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias. La enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la esclerosis lateral amiloidea son los mejores ejemplos de enfermedades neurodegenerativas con intensa inflamación, mientras que la esclerosis múltiple o la demencia asociada al VIH son desórdenes inflamatorios que cursan con daño neuronal. De hecho, la activación de la microglía y astrocitos, que son parte del sistema inmune innato del sistema nervioso central, ha sido identificada como un evento clave en la patología de la enfermedad de Alzheimer. Al igual que el punto anterior, el daño neuronal existente en la esclerosis múltiple ha sido descrito desde sus inicios (Zipp y Aktas, 2006). Estos resultados se relacionan con lo que ocurre en NPA, donde tenemos neurodegeneración drástica en el cerebelo de las células de purkinje y neuroinflamación por activación de la microglía y los astrocitos (Gabande-Rodriguez et al., 2018). Y con el tratamiento con PF que hemos probado, conseguimos reducir al menos en el cerebelo la neurodegeneración de las células de Purkinje, además de disminuir la activación de la

microglía al haber menos células Iba1+, así como también la reactividad de los astrocitos, midiéndolo por la tinción de GFAP.

Para el SECB se trata de una oportunidad de mejorar la inflamación y la neurodegeneración, cubriendo las dianas terapéuticas para estas patologías mediante la modulación de la actividad de los receptores CB₁/CB₂. Estos receptores se encuentran de forma abundante en las neuronas y en las células del sistema inmune, tanto del sistema nervioso central como en órganos periféricos. Sin embargo, su uso clínico se ha visto cuestionado y reducido por sus efectos psicotrópicos (Fowler, 2005), siendo esta la razón para optar por inhibidores de la degradación de los ligandos endógenos en nuestro estudio. Y es que la caracterización progresiva de los mecanismos que regulan la síntesis, el transporte y la degradación de los endocannabinoides ha extendido la investigación de este sistema en varias patologías como las enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias (Di Marzo et al., 2004). En este contexto, se puede recalcar que la liberación de endocannabinoides durante el daño neuronal constituye una respuesta de protección (Marsicano et al., 2003) y los cannabinoides exógenos y endógenos han demostrado neuroprotección *in vitro* e *in vivo* en modelos de daño neuronal (Sarne y Mechoulam, 2005; Van Der Stelt y Di Marzo, 2005). Esta actividad neuroprotectora ocurre a través de diferentes mecanismos, incluyendo la prevención de la excitotoxicidad (Marsicano et al., 2003), la reducción del flujo de Ca²⁺ tanto en la pre y la postsinapsis, la actividad antioxidante de los cannabinoides, la supresión de la producción de TNF- α , la activación de la fosfatidilinositol 3-kinasa y protein kinasa B y la inducción de la expresión de factores de transcripción y neurotrofinas. Estas características concuerdan con los efectos que necesitamos para tratar NPA, ya que además de neurodegeneración y neuroinflamación, hay un incremento del calcio intracelular y estrés oxidativo en las neuronas de los animales ASMKo (Perez-Canamas et al., 2016a).

A pesar de que estas propuestas son relativamente novedosas, la explotación de los efectos terapéuticos de los endocannabinoides está promoviéndose rápidamente por las evidencias de que hay alteraciones en varias patologías, como se ha descrito en la discusión anterior. Ahora mismo hay varios ejemplos de resultados satisfactorios del uso del SECB para aliviar los síntomas de neurodegeneración e inflamación en varios modelos animales, pero a la hora de trasladar estos resultados a ensayos clínicos, solo unos pocos (como el cannabidiol en la espasticidad de la esclerosis múltiple (Giacoppo et al., 2017)) han conseguido superar la eficacia de los fármacos ya aprobados. Además, los resultados positivos del estudio crónico y agudo han hecho que actualmente se esté usando el PF como tratamiento de un paciente de NPA y estamos a la espera de los resultados que salgan de él.

Otro síntoma a tratar que es diferente aunque relacionado con el daño neuronal, son los efectos psiquiátricos que presentan los ratones ASMKo. Estos animales, tal y como se ha visto en los resultados, parecen presentar una sintomatología relacionada con la ansiedad ya que dan resultados bajos de tiempo en el brazo abierto del Elevated Plus Maze, y un efecto similar a la depresión (incoherente a priori pero relacionado con el bajo aprendizaje que tienen estos animales) que se obtiene de la mala realización del Tail Suspension. Estos resultados han sido mejorados con el tratamiento de PF, lo que indica una relación entre los efectos psiquiátricos y la potenciación del SECB. A este sistema se le ha relacionado históricamente con condiciones psiquiátricas (Zuardi, 2006) y aunque la psiquiatría es muy difícil de investigar, puesto que no tenemos modelos animales apropiados ni se conocen bien los déficits neurológicos y cognitivos que provocan estos síntomas, se intentan hacer estudios traslacionales para aliviar esta sintomatología. Por ello, se considera que existe un defecto en el SECB en estos déficits emocionales y psiquiátricos, ya que el SECB está relacionado con los sistemas dopaminérgico (Fernandez-Ruiz et al., 2010b) y GABAérgico (Rubino et al., 2015). Aquí también es importante destacar no solo que el SECB tiene especial relevancia en la patología psiquiátrica, sino que también la SM tiene un papel en estos comportamientos. Tratando de dilucidar el mecanismo

de acción de los antidepresivos, se observó que actúan sobre la ASM y Cer (Gulbins et al., 2013). La amitriptilina y la fluoxetina actúan inhibiendo parte de la acción de la ASM y reduciendo la concentración de Cer, y eso demostró que disminuía los síntomas de ansiedad y redujo la depresión inducida por estrés. Sin embargo, con el mismo modelo que usamos nosotros, el ASMKo, observaron que se producía una situación opuesta, ya que aumentaba los síntomas de ansiedad y depresión inducida por estrés. Lo que quiere decir es que una concentración un poco elevada de SM mejora los síntomas psiquiátricos pero cuando esa concentración es muy alta, provoca una serie de cambios que empeoran estos síntomas. Esta situación se replica en nuestros resultados, teniendo esos problemas que muestran los ASMKo en las pruebas de comportamiento que usan paradigmas de trastornos psiquiátricos. Estos resultados también nos indican que la terapia con inhibidores de la FAAH revierte parte de la sintomatología psiquiátrica y observamos mejora de capacidades cognitivas como la memoria en los ASMKo.

5.4. Buscando una terapia para NPA

NPA es una enfermedad sin ningún tratamiento efectivo actualmente, que acaba conduciendo a la muerte en edades comprendidas entre los 2-4 años. Hay varios motivos que dificultan encontrar terapias apropiadas para esta enfermedad. Lo primero que se debe valorar es su efectividad para reducir la SM. Lo segundo es si merece la pena el alivio de los síntomas por el sufrimiento que se le puede causar al paciente o al entorno cercano (terapias invasivas). Además, la baja prevalencia de esta enfermedad dificulta el correcto estudio de esta patología en humanos, que puede ser diferente al modelo animal en ciertos detalles. Aunque los pacientes de NPA nacen aparentemente sanos, cuando se les detecta la enfermedad, alrededor de los 4-5 meses, ya tienen una acumulación de SM significativa, y es demasiado tarde para probar diferentes tratamientos. A menudo solo reciben cuidados paliativos y alivio de síntomas como dolor o insomnio. Por este motivo, existe una acuciante

necesidad de encontrar posibles dianas terapéuticas o estrategias para tratar esta enfermedad. Para conseguir que el daño por la acumulación de SM se pueda revertir, se debería empezar a tratar lo más pronto posible, si no, órganos como el cerebro tendrán daños irreparables. Y este órgano es también un importante factor limitante, puesto que no todos los tratamientos cruzan la barrera hematoencefálica de forma apropiada y en esta patología es necesario que la crucen para la correcta reducción de los síntomas. Como factor patológico clave está la alta acumulación de SM por el defecto en la proteína ASM.

Gracias a que existe el modelo murino ASMKo, que mimetiza fielmente esta patología, se pueden estudiar y entender los mecanismos patológicos presentes en NPA y a la vez comprobar la eficacia de posibles opciones terapéuticas. Un dato importante es que se ha comprobado que solo con un mínimo porcentaje de actividad de la ASM se pueden revertir los daños neurológicos. Este hecho se ha estudiado en los enfermos de NPB, donde tienen afectación periférica que cursa con hepatoesplenomegalia pero no tienen un daño cerebral significativo. Además, estos resultados se corroboraron con un modelo animal para NPB que mostraba que una actividad de la ASM del 8% evitaba la patología neurológica (Jones et al., 2008). Para el tratamiento de NPA se han propuesto diferentes aproximaciones,

Mediante el estudio del SECB en este modelo ASMKo, se abre una nueva vía que no había sido descrita con anterioridad, con nuevos procesos patológicos desconocidos y nuevas conexiones entre vías de señalización. Hemos obtenido evidencias de que hay una alteración en el SECB, y entender o contrarrestar estas alteraciones puede ser una buena estrategia para reducir los síntomas de esta patología. Primero se caracterizó el SECB mientras se estudiaba el mecanismo de acción para conseguir el efecto que deseamos, reducir la SM. Con esa caracterización llegaron las primeras relaciones entre la SM y el SECB. Vimos que la concentración de SM modula la concentración de ciertos componentes del SECB y con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se obtienen evidencias de que potenciar esa

señalización del SECB consigue reducir la concentración de SM *in vitro* en neuronas e *in vivo* en varios tejidos, incluyendo el cerebro. Esto se demostró tanto en el estudio crónico como en el agudo, en el primero vimos una disminución de la neurodegeneración y de la neuroinflamación, una disminución significativa de la SM en todos los órganos medidos excepto en los pulmones, donde relacionamos que no tuvo tanto efecto porque es un órgano donde hay menor concentración de CB₁ (Buchholz et al., 2017). Relacionado con el alivio de los síntomas relacionados con NPA, obtuvimos un aumento de la esperanza en el estudio de supervivencia de los animales ASMKo tratados de forma crónica con PF.

Estos resultados positivos propiciaron que los miembros de la fundación Wylder, a los que informamos y con los que colaboramos, propusieran tratar a un paciente de NPA especialmente complicado porque había dado reacción inmune frente a la ASM inyectada. Después, los resultados que obtuvimos en el estudio agudo, con una dosis única de PF cincuenta veces más elevada que la recomendada para inhibir la FAAH, demuestran que no hay toxicidad evidente con esa dosis tan alta ni a nivel inflamatorio ni a nivel morfológico. Y no solo eso, sino que además con esta dosis obtuvimos una reducción significativa en ciertos tejidos de la concentración de SM y de la inflamación, medida en células Iba1+ en cerebro y en área de macrófagos en el hígado. Así se promovió ese tratamiento y a día de hoy seguimos pendientes de los avances con el tratamiento oral de PF y su posible distribución como terapia en NPA.

Con los estudios y resultados de esta tesis doctoral esperamos que de lugar a un conocimiento más profundo y analítico de NPA, que se profundice en los mecanismos moleculares que regulan la síntesis y degradación de lípidos, y que la búsqueda de tratamientos efectivos se encuentre más cerca para que el día de mañana sea una enfermedad curable.

6. CONCLUSIONES

1. Ni el ligando AEA ni el CB₂ presentan alteraciones en el hipocampo de los ASMKo pero el ligando 2-AG está ligeramente reducido.
2. Los niveles de ARNm y de proteína del receptor cannabinoide CB₁ están reducidos en el cerebro y neuronas de los ratones ASMKo.
3. El ligando cannabinoide AEA y los inhibidores de su enzima de degradación FAAH reducen los niveles de SM en cultivos neuronales de ASMKo a través de la activación de la NSM.
4. El tratamiento *in vitro* con los inhibidores de la enzima FAAH (JNJ, PF y URB) disminuye la concentración de SM y no muestra signos de toxicidad en cultivos neuronales de ASMKo.
5. El tratamiento oral con el inhibidor de la enzima FAAH (PF) reduce los niveles de SM en diferentes áreas cerebrales y órganos periféricos, mejora las habilidades motoras y la memoria, previene la neurodegeneración de células de Purkinje, reduce los signos de neuroinflamación y aumenta la esperanza de vida en los ratones ASMKo.
6. La administración con PF no evidencia toxicidad incluso en dosis altas en ratones ASMKo con estadios avanzados de la enfermedad, además la dosis más alta reduce levemente la SM y disminuye la inflamación en hipocampo, corteza e hígado.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAM-KLAGES, S., ADAM, D., WIEGMANN, K., STRUVE, S., KOLANUS, W., SCHNEIDER-MERGENER, J. y KRONKE, M. 1996. FAN, a novel WD-repeat protein, couples the p55 TNF-receptor to neutral sphingomyelinase. *Cell*, 86, 937-47.
- AHN, K., JOHNSON, D. S. y CRAVATT, B. F. 2009. Fatty acid amide hydrolase as a potential therapeutic target for the treatment of pain and CNS disorders. *Expert Opin Drug Discov*, 4, 763-784.
- AHN, K., SMITH, S. E., LIIMATTA, M. B., BEIDLER, D., SADAGOPAN, N., DUDLEY, D. T., YOUNG, T., WREN, P., ZHANG, Y., SWANEY, S., VAN BECELAERE, K., BLANKMAN, J. L., NOMURA, D. K., BHATTACHAR, S. N., STIFF, C., NOMANBHOY, T. K., WEERAPANA, E., JOHNSON, D. S. y CRAVATT, B. F. 2011. Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: a highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther*, 338, 114-24.
- ALBAYRAM, O., BILKEI-GORZO, A. y ZIMMER, A. 2012. Loss of CB1 receptors leads to differential age-related changes in reward-driven learning and memory. *Front Aging Neurosci*, 4, 34.
- ARROYO, A. I., CAMOLETTO, P. G., MORANDO, L., SASSOE-POGNETTO, M., GIUSTETTO, M., VAN VELDHOVEN, P. P., SCHUCHMAN, E. H. y LEDESMA, M. D. 2014. Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model. *EMBO Mol Med*, 6, 398-413.
- BACCI, A., HUGUENARD, J. R. y PRINCE, D. A. 2004. Long-lasting self-inhibition of neocortical interneurons mediated by endocannabinoids. *Nature*, 431, 312-6.
- BARBON, C. M., ZIEGLER, R. J., LI, C., ARMENTANO, D., CHERRY, M., DESNICK, R. J., SCHUCHMAN, E. H. y CHENG, S. H. 2005. AAV8-mediated hepatic expression of acid sphingomyelinase corrects the metabolic defect in the visceral organs of a mouse model of Niemann-Pick disease. *Mol Ther*, 12, 431-40.
- BARI, M., BATTISTA, N., FEZZA, F., FINAZZI-AGRO, A. y MACCARRONE, M. 2005a. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 12212-20.
- BARI, M., PARADISI, A., PASQUARIELLO, N. y MACCARRONE, M. 2005b. Cholesterol-dependent modulation of type 1 cannabinoid receptors in nerve cells. *J Neurosci Res*, 81, 275-83.
- BARI, M., SPAGNUOLO, P., FEZZA, F., ODDI, S., PASQUARIELLO, N., FINAZZI-AGRO, A. y MACCARRONE, M. 2006. Effect of lipid rafts on Cb2 receptor signaling and 2-arachidonoyl-glycerol metabolism in human immune cells. *J Immunol*, 177, 4971-80.
- BERRENDERO, F., ROMERO, J., GARCIA-GIL, L., SUAREZ, I., DE LA CRUZ, P., RAMOS, J. A. y FERNANDEZ-RUIZ, J. J. 1998. Changes in cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several brain regions of aged rats. *Biochim Biophys Acta*, 1407, 205-14.
- BILKEI-GORZO, A., DREWS, E., ALBAYRAM, O., PIYANOVA, A., GAFFAL, E., TUETING, T., MICHEL, K., MAUER, D., MAIER, W. y ZIMMER, A. 2012. Early onset of aging-like changes is restricted to cognitive abilities and skin structure in Cnr1(-)/(-) mice. *Neurobiol Aging*, 33, 200 e11-22.
- BISOGNO, T. y MACCARRONE, M. 2013. Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*, 8, 509-22.
- BLAZQUEZ, C., SANCHEZ, C., DAZA, A., GALVE-ROPERH, I. y GUZMAN, M. 1999. The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem*, 72, 1759-68.
- BOLTE, S. y CORDELIERES, F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*, 224, 213-32.
- BOUABOULA, M., POINOT-CHAZEL, C., BOURRIE, B., CANAT, X., CALANDRA, B., RINALDI-CARMONA, M., LE FUR, G. y CASELLAS, P. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J*, 312 (Pt 2), 637-41.

- BRADY, R. O., KANFER, J. N., MOCK, M. B. y FREDRICKSON, D. S. 1966. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55, 366-9.
- BUCCINNA, B., PICCININI, M., PRINETTI, A., SCANDROGLIO, F., PRIONI, S., VALSECCHI, M., VOTTA, B., GRIFONI, S., LUPINO, E., RAMONDETTI, C., SCHUCHMAN, E. H., GIORDANA, M. T., SONNINO, S. y RINAUDO, M. T. 2009. Alterations of myelin-specific proteins and sphingolipids characterize the brains of acid sphingomyelinase-deficient mice, an animal model of Niemann-Pick disease type A. *J Neurochem*, 109, 105-15.
- BUCHHOLZ, H. G., UEBBING, K., MAUS, S., PEKTOR, S., AFAHAENE, N., WEYER-ELBERICH, V., LUTZ, B., SCHRECKENBERGER, M. y MIEDERER, I. 2017. Whole-body biodistribution of the cannabinoid type 1 receptor ligand [(18)F]MK-9470 in the rat. *Nucl Med Biol*, 52, 63-69.
- BURSTEIN, S., HUNTER, S. A. y RENZULLI, L. 1984. Stimulation of sphingomyelin hydrolysis by cannabidiol in fibroblasts from a Niemann-Pick patient. *Biochem Biophys Res Commun*, 121, 168-73.
- CAMOLETTO, P. G., VARA, H., MORANDO, L., CONNELL, E., MARLETTO, F. P., GIUSTETTO, M., SASSOE-POGNETTO, M., VAN VELDHOVEN, P. P. y LEDESMA, M. D. 2009. Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18. *PLoS One*, 4, e5310.
- CAN, A., DAO, D. T., TERRILLION, C. E., PIANTADOSI, S. C., BHAT, S. y GOULD, T. D. 2012. The tail suspension test. *J Vis Exp*, e3769.
- CARVALHO, A. F. y VAN BOCKSTAELE, E. J. 2012. Cannabinoid modulation of noradrenergic circuits: implications for psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 38, 59-67.
- CENTONZE, D., BATTISTA, N., ROSSI, S., MERCURI, N. B., FINAZZI-AGRO, A., BERNARDI, G., CALABRESI, P. y MACCARRONE, M. 2004. A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal gabaergic Transmission. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1488-97.
- CLARKE, C. J., GUTHRIE, J. M. y HANNUN, Y. A. 2008. Regulation of neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) by tumor necrosis factor-alpha involves protein kinase C-delta in lung epithelial cells. *Mol Pharmacol*, 74, 1022-32.
- CLARKE, C. J., TRUONG, T. G. y HANNUN, Y. A. 2007. Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J Biol Chem*, 282, 1384-96.
- COGNATO, G. P., AGOSTINHO, P. M., HOCKEMEYER, J., MULLER, C. E., SOUZA, D. O. y CUNHA, R. A. 2010. Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J Neurochem*, 112, 453-62.
- CORCELLE-TERMEAU, E., VINDELOV, S. D., HAMALISTO, S., MOGRABI, B., KELDSBO, A., BRASEN, J. H., FAVARO, E., ADAM, D., SZYNIAROWSKI, P., HOFMAN, P., KRAUTWALD, S., FARKAS, T., PETERSEN, N. H., ROHDE, M., LINKERMANN, A. y JAATTELA, M. 2016. Excess sphingomyelin disturbs ATG9A trafficking and autophagosome closure. *Autophagy*, 12, 833-49.
- CROCKER, A. C. y MAYS, V. B. 1961. Sphingomyelin synthesis in Niemann-Pick disease. *Am J Clin Nutr*, 9, 63-7.
- D'ANGELO, G., POLISHCHUK, E., DI TULLIO, G., SANTORO, M., DI CAMPLI, A., GODI, A., WEST, G., BIELAWSKI, J., CHUANG, C. C., VAN DER SPOEL, A. C., PLATT, F. M., HANNUN, Y. A., POLISHCHUK, R., MATTJUS, P. y DE MATTEIS, M. A. 2007. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature*, 449, 62-7.
- DA VEIGA PEREIRA, L., DESNICK, R. J., ADLER, D. A., DISTECHE, C. M. y SCHUCHMAN, E. H. 1991. Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1---p15.4. *Genomics*, 9, 229-34.
- DBAIBO, G. S., OBEID, L. M. y HANNUN, Y. A. 1993. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) signal transduction through ceramide. Dissociation of growth inhibitory effects of TNF-alpha from activation of nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem*, 268, 17762-6.
- DEVANE, W. A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R. G., STEVENSON, L. A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. y MECHOULAM, R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-9.
- DEVINSKY, O., MARSH, E., FRIEDMAN, D., THIELE, E., LAUX, L., SULLIVAN, J., MILLER, I., FLAMINI, R., WILFONG, A., FILLOUX, F., WONG, M., TILTON, N., BRUNO, P., BLUVSTEIN, J., HEDLUND, J.,

- KAMENS, R., MACLEAN, J., NANGIA, S., SINGHAL, N. S., WILSON, C. A., PATEL, A. y CILIO, M. R. 2016. Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *Lancet Neurol*, 15, 270-8.
- DHAMI, R., PASSINI, M. A. y SCHUCHMAN, E. H. 2006. Identification of novel biomarkers for Niemann-Pick disease using gene expression analysis of acid sphingomyelinase knockout mice. *Mol Ther*, 13, 556-64.
- DI MARZO, V. 2008. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*, 7, 438-55.
- DI MARZO, V. 2009. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res*, 60, 77-84.
- DI MARZO, V., BIFULCO, M. y DE PETROCELLIS, L. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 771-84.
- DI MARZO, V., BISOGNO, T., MELCK, D., ROSS, R., BROCKIE, H., STEVENSON, L., PERTWEE, R. y DE PETROCELLIS, L. 1998. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett*, 436, 449-54.
- DI MARZO, V., FONTANA, A., CADAS, H., SCHINELLI, S., CIMINO, G., SCHWARTZ, J. C. y PIOMELLI, D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372, 686-91.
- DI, S., POPESCU, I. R. y TASKER, J. G. 2013. Glial control of endocannabinoid heterosynaptic modulation in hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells. *J Neurosci*, 33, 18331-42.
- DIANA, G., MALLONI, M. y PIERI, M. 2003. Effects of the synthetic cannabinoid nabilone on spatial learning and hippocampal neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav*, 75, 585-91.
- DICKSON, R. C., SUMANASEKERA, C. y LESTER, R. L. 2006. Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res*, 45, 447-65.
- DODGE, J. C., CLARKE, J., SONG, A., BU, J., YANG, W., TAKSIR, T. V., GRIFFITHS, D., ZHAO, M. A., SCHUCHMAN, E. H., CHENG, S. H., O'RIORDAN, C. R., SHIHABUDDIN, L. S., PASSINI, M. A. y STEWART, G. R. 2005. Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17822-7.
- DORIA, J. G., DE SOUZA, J. M., ANDRADE, J. N., RODRIGUES, H. A., GUIMARAES, I. M., CARVALHO, T. G., GUATIMOSIM, C., DOBRANSKY, T. y RIBEIRO, F. M. 2015. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, 73, 163-73.
- DOTTI, C. G., SULLIVAN, C. A. y BANKER, G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 8, 1454-68.
- DUAN, R. D., BERGMAN, T., XU, N., WU, J., CHENG, Y., DUAN, J., NELANDER, S., PALMBERG, C. y NILSSON, A. 2003. Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *J Biol Chem*, 278, 38528-36.
- FERNANDEZ-RUIZ, J., GARCIA, C., SAGREDO, O., GOMEZ-RUIZ, M. y DE LAGO, E. 2010a. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin Ther Targets*, 14, 387-404.
- FERNANDEZ-RUIZ, J., HERNANDEZ, M. y RAMOS, J. A. 2010b. Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther*, 16, e72-91.
- FERRE, S., LLUIS, C., JUSTINOVA, Z., QUIROZ, C., ORRU, M., NAVARRO, G., CANELA, E. I., FRANCO, R. y GOLDBERG, S. R. 2010. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br J Pharmacol*, 160, 443-53.
- FOURGEAUD, L., BESSIS, A. S., ROSSIGNOL, F., PIN, J. P., OLIVO-MARIN, J. C. y HEMAR, A. 2003. The metabotropic glutamate receptor mGluR5 is endocytosed by a clathrin-independent pathway. *J Biol Chem*, 278, 12222-30.
- FOWLER, C. J. 2005. Pharmacological properties and therapeutic possibilities for drugs acting upon endocannabinoid receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4, 685-96.
- FOWLER, S. 1969. Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 191, 481-4.
- FRANCO-VILLANUEVA, A., FERNANDEZ-LOPEZ, E., GABANDE-RODRIGUEZ, E., BANON-RODRIGUEZ, I., ESTEBAN, J. A., ANTON, I. M. y LEDESMA, M. D. 2014. WIP modulates dendritic spine

- actin cytoskeleton by transcriptional control of lipid metabolic enzymes. *Hum Mol Genet*, 23, 4383-95.
- FUTERMAN, A. H., STIEGER, B., HUBBARD, A. L. y PAGANO, R. E. 1990. Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J Biol Chem*, 265, 8650-7.
- GABANDE-RODRIGUEZ, E., BOYA, P., LABRADOR, V., DOTTI, C. G. y LEDESMA, M. D. 2014. High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A. *Cell Death Differ*, 21, 864-75.
- GABANDE-RODRIGUEZ, E., PEREZ-CANAMAS, A., SOTO-HUELIN, B., MITROI, D. N., SANCHEZ-REDONDO, S., MARTINEZ-SAEZ, E., VENERO, C., PEINADO, H. y LEDESMA, M. D. 2018. Lipid-induced lysosomal damage after demyelination corrupts microglia protective function in lysosomal storage disorders. *EMBO J*.
- GALVAN, C., CAMOLETTO, P. G., CRISTOFANI, F., VAN VELDHoven, P. P. y LEDESMA, M. D. 2008. Anomalous surface distribution of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins in neurons lacking acid sphingomyelinase. *Mol Biol Cell*, 19, 509-22.
- GALVE-ROPERH, I., SANCHEZ, C., CORTES, M. L., GOMEZ DEL PULGAR, T., IZQUIERDO, M. y GUZMAN, M. 2000. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med*, 6, 313-9.
- GERDEMAN, G. y LOVINGER, D. M. 2001. CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*, 85, 468-71.
- GIACOPPO, S., BRAMANTI, P. y MAZZON, E. 2017. Sativex in the management of multiple sclerosis-related spasticity: An overview of the last decade of clinical evaluation. *Mult Scler Relat Disord*, 17, 22-31.
- GLASS, M., DRAGUNOW, M. y FAULL, R. L. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, 77, 299-318.
- GONG, J. P., ONAIVI, E. S., ISHIGURO, H., LIU, Q. R., TAGLIAFERRO, P. A., BRUSCO, A. y UHL, G. R. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res*, 1071, 10-23.
- GULBINS, E., PALMADA, M., REICHEL, M., LUTH, A., BOHMER, C., AMATO, D., MULLER, C. P., TISCHBIREK, C. H., GROEMER, T. W., TABATABAI, G., BECKER, K. A., TRIPAL, P., STAEDTLER, S., ACKERMANN, T. F., VAN BREDERODE, J., ALZHEIMER, C., WELLER, M., LANG, U. E., KLEUSER, B., GRASSME, H. y KORNHUBER, J. 2013. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs. *Nat Med*, 19, 934-8.
- HANNUN, Y. A. 1994. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J Biol Chem*, 269, 3125-8.
- HANNUN, Y. A., LOOMIS, C. R., MERRILL, A. H., JR. y BELL, R. M. 1986. Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*, 261, 12604-9.
- HANNUN, Y. A. y LUBERTO, C. 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*, 10, 73-80.
- HANNUN, Y. A. y OBEID, L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 139-50.
- HASHIMOTODANI, Y., OHNO-SHOSAKU, T., TANIMURA, A., KITA, Y., SANO, Y., SHIMIZU, T., DI MARZO, V. y KANO, M. 2013. Acute inhibition of diacylglycerol lipase blocks endocannabinoid-mediated retrograde signalling: evidence for on-demand biosynthesis of 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol*, 591, 4765-76.
- HEGDE, V. L., NAGARKATTI, M. y NAGARKATTI, P. S. 2010. Cannabinoid receptor activation leads to massive mobilization of myeloid-derived suppressor cells with potent immunosuppressive properties. *Eur J Immunol*, 40, 3358-71.
- HENRY, B., ZIOBRO, R., BECKER, K. A., KOLESNICK, R. y GULBINS, E. 2013. Acid sphingomyelinase. *Handb Exp Pharmacol*, 77-88.
- HERKENHAM, M. 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in brain: an in vitro technique using slide-mounted tissue sections. *NIDA Res Monogr*, 112, 129-45.
- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., DE COSTA, B. R. y RICHFIELD, E. K. 1991a. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*, 547, 267-74.

- HERKENHAM, M., LYNN, A. B., JOHNSON, M. R., MELVIN, L. S., DE COSTA, B. R. y RICE, K. C. 1991b. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*, 11, 563-83.
- HOHMANN, A. G. y SUPLITA, R. L., 2ND 2006. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J*, 8, E693-708.
- HOJJATI, M. R. y JIANG, X. C. 2006. Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine. *J Lipid Res*, 47, 673-6.
- HORINOCHI, K., ERLICH, S., PERL, D. P., FERLINZ, K., BISGAIER, C. L., SANDHOFF, K., DESNICK, R. J., STEWART, C. L. y SCHUCHMAN, E. H. 1995. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet*, 10, 288-93.
- HOWLETT, A. C. 1998. The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis*, 5, 405-16.
- HOWLETT, A. C., BLUME, L. C. y DALTON, G. D. 2010. CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem*, 17, 1382-93.
- ISHIBASHI, Y., KOHYAMA-KOGANEYA, A. y HIRABAYASHI, Y. 2013. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1831, 1475-85.
- JHAVERI, M. D., RICHARDSON, D. y CHAPMAN, V. 2007. Endocannabinoid metabolism and uptake: novel targets for neuropathic and inflammatory pain. *Br J Pharmacol*, 152, 624-32.
- JOHNSON, D. S., STIFF, C., LAZERWITH, S. E., KESTEN, S. R., FAY, L. K., MORRIS, M., BEIDLER, D., LIHATTA, M. B., SMITH, S. E., DUDLEY, D. T., SADAGOPAN, N., BHATTACHAR, S. N., KESTEN, S. J., NOMANBHOY, T. K., CRAVATT, B. F. y AHN, K. 2011. Discovery of PF-04457845: A Highly Potent, Orally Bioavailable, and Selective Urea FAAH Inhibitor. *ACS Med Chem Lett*, 2, 91-96.
- JONES, I., HE, X., KATOZIAN, F., DARROCH, P. I. y SCHUCHMAN, E. H. 2008. Characterization of common SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease and generation of mutation-specific mouse models. *Mol Genet Metab*, 95, 152-62.
- JUNG, K. M., ASTARITA, G., ZHU, C., WALLACE, M., MACKIE, K. y PIOMELLI, D. 2007. A key role for diacylglycerol lipase- α in metabotropic glutamate receptor-dependent endocannabinoid mobilization. *Mol Pharmacol*, 72, 612-21.
- JUNG, K. M., MANGIERI, R., STAPLETON, C., KIM, J., FEGLEY, D., WALLACE, M., MACKIE, K. y PIOMELLI, D. 2005. Stimulation of endocannabinoid formation in brain slice cultures through activation of group I metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*, 68, 1196-202.
- KAN, C. C., RUAN, Z. S. y BITTMAN, R. 1991. Interaction of cholesterol with sphingomyelin in bilayer membranes: evidence that the hydroxy group of sphingomyelin does not modulate the rate of cholesterol exchange between vesicles. *Biochemistry*, 30, 7759-66.
- KATONA, I. y FREUND, T. F. 2008. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*, 14, 923-30.
- KATONA, I., URBAN, G. M., WALLACE, M., LEDENT, C., JUNG, K. M., PIOMELLI, D., MACKIE, K. y FREUND, T. F. 2006. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 26, 5628-37.
- KAUR, R., AMBWANI, S. R. y SINGH, S. 2016. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Curr Clin Pharmacol*, 11, 110-7.
- KEITH, J. M., JONES, W. M., TICHENOR, M., LIU, J., SEIERSTAD, M., PALMER, J. A., WEBB, M., KARBARZ, M., SCOTT, B. P., WILSON, S. J., LUO, L., WENNERHOLM, M. L., CHANG, L., RIZZOLIO, M., RYNBERG, R., CHAPLAN, S. R. y BREITENBUCHER, J. G. 2015. Preclinical Characterization of the FAAH Inhibitor JNJ-42165279. *ACS Med Chem Lett*, 6, 1204-8.
- KIM, J. y ALGER, B. E. 2010. Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci*, 13, 592-600.
- KIRKEGAARD, T., ROTH, A. G., PETERSEN, N. H., MAHALKA, A. K., OLSEN, O. D., MOILANEN, I., ZYLICZ, A., KNUDSEN, J., SANDHOFF, K., ARENZ, C., KINNUNEN, P. K., NYLANDSTED, J. y JAATTELA, M. 2010. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*, 463, 549-53.
- KOLESNICK, R. N. y KRONKE, M. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*, 60, 643-65.
- KRUT, O., WIEGMANN, K., KASHKAR, H., YAZDANPANA, B. y KRONKE, M. 2006. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J Biol Chem*, 281, 13784-93.

- LAMBERT, D. M. 2007. Allergic contact dermatitis and the endocannabinoid system: from mechanisms to skin care. *ChemMedChem*, 2, 1701-2.
- LEVRAN, O., DESNICK, R. J. y SCHUCHMAN, E. H. 1991. Niemann-Pick disease: a frequent missense mutation in the acid sphingomyelinase gene of Ashkenazi Jewish type A and B patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 3748-52.
- LINGWOOD, D. y SIMONS, K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327, 46-50.
- LISTER, R. G. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92, 180-5.
- LOPEZ-OTIN, C., BLASCO, M. A., PARTRIDGE, L., SERRANO, M. y KROEMER, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194-217.
- MACAULEY, S. L., SIDMAN, R. L., SCHUCHMAN, E. H., TAKSIR, T. y STEWART, G. R. 2008. Neuropathology of the acid sphingomyelinase knockout mouse model of Niemann-Pick A disease including structure-function studies associated with cerebellar Purkinje cell degeneration. *Exp Neurol*, 214, 181-92.
- MACCARRONE, M. 2008. Good news for CB1 receptors: endogenous agonists are in the right place. *Br J Pharmacol*, 153, 179-81.
- MACCARRONE, M., ROSSI, S., BARI, M., DE CHIARA, V., FEZZA, F., MUSELLA, A., GASPERI, V., PROSPERETTI, C., BERNARDI, G., FINAZZI-AGRO, A., CRAVATT, B. F. y CENTONZE, D. 2008. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci*, 11, 152-9.
- MACKIE, K., LAI, Y., WESTENBROEK, R. y MITCHELL, R. 1995. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci*, 15, 6552-61.
- MARCHESINI, N., OSTA, W., BIELAWSKI, J., LUBERTO, C., OBEID, L. M. y HANNUN, Y. A. 2004. Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells. *J Biol Chem*, 279, 25101-11.
- MARESZ, K., CARRIER, E. J., PONOMAREV, E. D., HILLARD, C. J. y DITTEL, B. N. 2005. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem*, 95, 437-45.
- MARESZ, K., PRYCE, G., PONOMAREV, E. D., MARSICANO, G., CROXFORD, J. L., SHRIVER, L. P., LEDENT, C., CHENG, X., CARRIER, E. J., MANN, M. K., GIOVANNONI, G., PERTWEE, R. G., YAMAMURA, T., BUCKLEY, N. E., HILLARD, C. J., LUTZ, B., BAKER, D. y DITTEL, B. N. 2007. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med*, 13, 492-7.
- MARSICANO, G., GOODENOUGH, S., MONORY, K., HERMANN, H., EDER, M., CANNICH, A., AZAD, S. C., CASCIO, M. G., GUTIERREZ, S. O., VAN DER STELT, M., LOPEZ-RODRIGUEZ, M. L., CASANOVA, E., SCHUTZ, G., ZIEGLGANSBERGER, W., DI MARZO, V., BEHL, C. y LUTZ, B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302, 84-8.
- MATSUDA, L. A., LOLAIT, S. J., BROWNSTEIN, M. J., YOUNG, A. C. y BONNER, T. I. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346, 561-4.
- MECHOULAM, R. y GAONI, Y. 1965. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron*, 21, 1223-9.
- MELIS, M. R., SUCCU, S., MASCIA, M. S. y ARGJOLAS, A. 2004. Antagonism of cannabinoid CB1 receptors in the paraventricular nucleus of male rats induces penile erection. *Neurosci Lett*, 359, 17-20.
- MIRANDA, S. R., ERLICH, S., FRIEDRICH, V. L., JR., GATT, S. y SCHUCHMAN, E. H. 2000a. Hematopoietic stem cell gene therapy leads to marked visceral organ improvements and a delayed onset of neurological abnormalities in the acid sphingomyelinase deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Gene Ther*, 7, 1768-76.
- MIRANDA, S. R., ERLICH, S., FRIEDRICH, V. L., JR., HASKINS, M. E., GATT, S. y SCHUCHMAN, E. H. 1998. Biochemical, pathological, and clinical response to transplantation of normal bone marrow cells into acid sphingomyelinase-deficient mice. *Transplantation*, 65, 884-92.
- MIRANDA, S. R., HE, X., SIMONARO, C. M., GATT, S., DAGAN, A., DESNICK, R. J. y SCHUCHMAN, E. H. 2000b. Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into niemann-pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology. *FASEB J*, 14, 1988-95.

- MIZUTANI, Y., TAMIYA-KOIZUMI, K., NAKAMURA, N., KOBAYASHI, M., HIRABAYASHI, Y. y YOSHIDA, S. 2001. Nuclear localization of neutral sphingomyelinase 1: biochemical and immunocytochemical analyses. *J Cell Sci*, 114, 3727-36.
- MUNRO, S., THOMAS, K. L. y ABU-SHAAR, M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365, 61-5.
- MURRAY, J. M., THOMPSON, A. M., VITSKY, A., HAWES, M., CHUANG, W. L., PACHECO, J., WILSON, S., MCPHERSON, J. M., THURBERG, B. L., KAREY, K. P. y ANDREWS, L. 2015. Nonclinical safety assessment of recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) for the treatment of acid sphingomyelinase deficiency: the utility of animal models of disease in the toxicological evaluation of potential therapeutics. *Mol Genet Metab*, 114, 217-25.
- NARUSHIMA, M., UCHIGASHIMA, M., FUKAYA, M., MATSUI, M., MANABE, T., HASHIMOTO, K., WATANABE, M. y KANO, M. 2007. Tonic enhancement of endocannabinoid-mediated retrograde suppression of inhibition by cholinergic interneuron activity in the striatum. *J Neurosci*, 27, 496-506.
- OBEID, L. M., LINARDIC, C. M., KAROLAK, L. A. y HANNUN, Y. A. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259, 1769-71.
- OTTERBACH, B. y STOFFEL, W. 1995. Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell*, 81, 1053-61.
- PAILA, Y. D., GANGULY, S. y CHATTOPADHYAY, A. 2010. Metabolic depletion of sphingolipids impairs ligand binding and signaling of human serotonin1A receptors. *Biochemistry*, 49, 2389-97.
- PARKER, L. A., ROCK, E. M. y LIMEBEER, C. L. 2011. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids. *Br J Pharmacol*, 163, 1411-22.
- PENTCHEV, P. G., COMLY, M. E., KRUTH, H. S., VANIER, M. T., WENGER, D. A., PATEL, S. y BRADY, R. O. 1985. A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8247-51.
- PENTCHEV, P. G., GAL, A. E., BOOTH, A. D., OMODEO-SALE, F., FOUKS, J., NEUMEYER, B. A., QUIRK, J. M., DAWSON, G. y BRADY, R. O. 1980. A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim Biophys Acta*, 619, 669-79.
- PEREZ-CANAMAS, A., BENVENU, S., RUEDA, C. B., RABANO, A., SATRUSTEGUI, J. y LEDESMA, M. D. 2016a. Sphingomyelin-induced inhibition of the plasma membrane calcium ATPase causes neurodegeneration in type A Niemann-Pick disease. *Mol Psychiatry*.
- PEREZ-CANAMAS, A., SARROCA, S., MELERO-JEREZ, C., PORQUET, D., SANSÁ, J., KNAFO, S., ESTEBAN, J. A., SANFELIU, C. y LEDESMA, M. D. 2016b. A diet enriched with plant sterols prevents the memory impairment induced by cholesterol loss in senescence-accelerated mice. *Neurobiol Aging*, 48, 1-12.
- PONTIER, S. M., PERCHERANCIER, Y., GALANDRIN, S., BREIT, A., GALES, C. y BOUVIER, M. 2008. Cholesterol-dependent separation of the beta2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *J Biol Chem*, 283, 24659-72.
- PRINETTI, A., LOBERTO, N., CHIGORNO, V. y SONNINO, S. 2009. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 184-93.
- RIMMERMAN, N., HUGHES, H. V., BRADSHAW, H. B., PAZOS, M. X., MACKIE, K., PRIETO, A. L. y WALKER, J. M. 2008. Compartmentalization of endocannabinoids into lipid rafts in a dorsal root ganglion cell line. *Br J Pharmacol*, 153, 380-9.
- ROCHE, M. y FINN, D. P. 2010. Brain CB(2) Receptors: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Pharmaceuticals (Basel)*, 3, 2517-2553.
- ROSSI, S., BERNARDI, G. y CENTONZE, D. 2010. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*, 224, 92-102.
- RUBINO, T., ZAMBERLETTI, E. y PAROLARO, D. 2015. Endocannabinoids and Mental Disorders. *Handb Exp Pharmacol*, 231, 261-83.
- SAITO, V. M., REZENDE, R. M. y TEIXEIRA, A. L. 2012. Cannabinoid modulation of neuroinflammatory disorders. *Curr Neuropharmacol*, 10, 159-66.
- SANCHEZ, C., GALVE-ROPERH, I., RUEDA, D. y GUZMAN, M. 1998. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-

- tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol*, 54, 834-43.
- SANCHEZ, C., RUEDA, D., SEGUI, B., GALVE-ROPERH, I., LEVADE, T. y GUZMAN, M. 2001. The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol*, 59, 955-9.
- SARNATARO, D., GRIMALDI, C., PISANTI, S., GAZZERRO, P., LAEZZA, C., ZURZOLO, C. y BIFULCO, M. 2005. Plasma membrane and lysosomal localization of CB1 cannabinoid receptor are dependent on lipid rafts and regulated by anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett*, 579, 6343-9.
- SARNE, Y. y MECHOULAM, R. 2005. Cannabinoids: between neuroprotection and neurotoxicity. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4, 677-84.
- SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., PREIBISCH, S., RUEDEN, C., SAALFELD, S., SCHMID, B., TINEVEZ, J. Y., WHITE, D. J., HARTENSTEIN, V., ELICEIRI, K., TOMANCAK, P. y CARDONA, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9, 676-82.
- SCHUCHMAN, E. H. y WASSERSTEIN, M. P. 2015. Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29, 237-47.
- SHARMA, A., VIRVILIS, V., DEFTEREOS, S. y PERSIDIS, A. 2011. Literature mining, ontologies and information visualization for drug repurposing. *Brief Bioinform*, 12, 357-368.
- SHRIVASTAVA, S., PUCADYIL, T. J., PAILA, Y. D., GANGULY, S. y CHATTOPADHYAY, A. 2010. Chronic cholesterol depletion using statin impairs the function and dynamics of human serotonin(1A) receptors. *Biochemistry*, 49, 5426-35.
- SIMONARO, C. M., DESNICK, R. J., MCGOVERN, M. M., WASSERSTEIN, M. P. y SCHUCHMAN, E. H. 2002. The demographics and distribution of type B Niemann-Pick disease: novel mutations lead to new genotype/phenotype correlations. *Am J Hum Genet*, 71, 1413-9.
- SIMONS, K. y IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-72.
- SODERO, A. O., VRIENS, J., GHOSH, D., STEGNER, D., BRACHET, A., PALLOTTO, M., SASSOPOGNETTO, M., BROUWERS, J. F., HELMS, J. B., NIESWANDT, B., VOETS, T. y DOTTI, C. G. 2012. Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity. *EMBO J*, 31, 1764-73.
- SZABO, B., DORNER, L., PFREUNDTNER, C., NORENBURG, W. y STARKE, K. 1998. Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum. *Neuroscience*, 85, 395-403.
- TAFESSE, F. G., TERNES, P. y HOLTHUIS, J. C. 2006. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem*, 281, 29421-5.
- TANI, M. y HANNUN, Y. A. 2007. Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2. *FEBS Lett*, 581, 1323-8.
- TOMIUK, S., ZUMBANSEN, M. y STOFFEL, W. 2000. Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 275, 5710-7.
- TOTH, B., ERDOS, M., SZEKELY, A., RITLI, L., BAGOSSI, P., SUMEGI, J. y MARODI, L. 2012. Molecular genetic characterization of novel sphingomyelin phosphodiesterase 1 mutations causing niemann-pick disease. *JIMD Rep*, 3, 125-9.
- TROVO, L., VAN VELDHOVEN, P. P., MARTIN, M. G. y DOTTI, C. G. 2011. Sphingomyelin upregulation in mature neurons contributes to TrkB activity by Rac1 endocytosis. *J Cell Sci*, 124, 1308-15.
- TURCOTTE, C., BLANCHET, M. R., LAVIOLETTE, M. y FLAMAND, N. 2016. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci*, 73, 4449-4470.
- UCHIGASHIMA, M., NARUSHIMA, M., FUKAYA, M., KATONA, I., KANO, M. y WATANABE, M. 2007. Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. *J Neurosci*, 27, 3663-76.
- ULUGOL, A. 2014. The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Med J*, 31, 115-20.
- VAN DER STELT, M. y DI MARZO, V. 2005. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*, 7, 37-50.
- VELASCO, G., GALVE-ROPERH, I., SANCHEZ, C., BLAZQUEZ, C., HARO, A. y GUZMAN, M. 2005. Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Sci*, 77, 1723-31.

- VICTOR, S., COULTER, J. B., BESLEY, G. T., ELLIS, I., DESNICK, R. J., SCHUCHMAN, E. H. y VELLODI, A. 2003. Niemann-Pick disease: sixteen-year follow-up of allogeneic bone marrow transplantation in a type B variant. *J Inherit Metab Dis*, 26, 775-85.
- WILSON, R. I., KUNOS, G. y NICOLL, R. A. 2001. Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron*, 31, 453-62.
- YIN, H. H., ADERMARK, L. y LOVINGER, D. M. 2008. Neurotensin reduces glutamatergic transmission in the dorsolateral striatum via retrograde endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology*, 54, 79-86.
- ZHUANG, J., YANG, D. P., NIKAS, S. P., ZHAO, J., GUO, J. y MAKRIYANNIS, A. 2013. The interaction of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors with an anandamide carrier protein using (19)F-NMR. *AAPS J*, 15, 477-82.
- ZIPP, F. y AKTAS, O. 2006. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, 29, 518-27.
- ZOPPI, S., PEREZ NIEVAS, B. G., MADRIGAL, J. L., MANZANARES, J., LEZA, J. C. y GARCIA-BUENO, B. 2011. Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation. *Neuropsychopharmacology*, 36, 805-18.
- ZUARDI, A. W. 2006. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry*, 28, 153-7.