

Plasticidad neural en centros de regulación motora:
análisis del sistema endocannabinoide en el cerebelo del ratón PCD



*Neural plasticity in motor control centres:
analysis of the endocannabinoid system in the cerebellum of the PCD mouse*

TESIS DOCTORAL
Rodrigo Muñoz Castañeda
Salamanca 2015



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

Plasticidad neural en el cerebelo: análisis del sistema endocannabinoide en el ratón PCD

Tesis Doctoral

RODRIGO MUÑOZ CASTAÑEDA

Salamanca, septiembre 2015



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Plasticidad neural en el cerebelo:
análisis del sistema endocannabinoide
en el ratón PCD

Memoria presentada por *Rodrigo Muñoz Castañeda* para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:
Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto
Dr. D. David Díaz López

Septiembre 2015



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Plasticidad neural en el cerebelo:
análisis del sistema endocannabinoide
en el ratón PCD

RODRIGO MUÑOZ CASTAÑEDA

Septiembre 2015

D. Eduardo Weruaga Prieto, Profesor Titular de Universidad y D. David Díaz López, Profesor Ayudante Doctor, ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca

HACEMOS CONSTAR:

Que el trabajo titulado **“Plasticidad neural en el cerebelo: análisis del sistema endocannabinoide en el ratón PCD”**, ha sido realizado por D. Rodrigo Muñoz Castañeda en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León bajo nuestra dirección y, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido y optar así al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a dieciséis de septiembre de dos mil quince.

Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto

Fdo.: David Díaz López

Technische Universität München
80290 München · Germany

To whom it may concern

Munich, 13. Sept. 2015

Evaluation of the Thesis of Mr. Rodrigo Munoz Castaneda

Dear Madams, Sirs,

It is a pleasure for me to write the evaluation of the thesis presented to me by Mr. Rodrigo Munoz Castaneda. He applies for a degree of an "international Ph.D." at the University of Salamanca, and the herewith presented evaluation fully supports this application.

Mr. Rodrigo Munoz Castaneda is a psychologist with a Master Degree both in Neuropsychopharmacology as well as in Neuroscience, already showing his dedication to the topic of his thesis. This dedication was confirmed by a 5-month stay abroad in Grenoble with Prof. Annie Andrieux in order to learn cell biological methods needed to solve the scientific questions posed in his thesis. In addition he learnt and mastered a lot of additional techniques during the course of the thesis such as histology, immunohistochemistry, electron microscopy, basic molecular biology, and foremost behavioural neuroscience.

The scientific question he pursued in his thesis was to understand the mechanism leading to the Purkinje Cell degeneration in the PCD (Purkinje Cell Degeneration) mouse model. The PCD model is widely used as a model of cerebellar dysfunction, since this mouse model exhibits a mutation in the CCP1-gene, leading to a selective loss of Purkinje Cells during postnatal stages. Due to the loss of this principal cell population and therefore a complete loss of cerebellar output, the model ideally suited to examine the effect of cerebellar dysfunction not only on motor behavior but also to study the influence of cerebellar function on further behavioural characteristics such as cognition and affective disorders. In this respect the role of the cerebellum has been widely understudied and is now addressed in this thesis. It is done in this thesis in a very comprehensive manner, in that the scientific approach encompasses behavioural studies of the PCD-model, the influence of the endocannabinoid system on cerebellar plasticity in the PCD-model as well as at the molecular level, studying the effect of CCP1 mutation on the microtubule biology.

CCP1 encodes for a carboxypeptidase, which catalyze the shortening of polyglutamate chains of proteins. In fact it also converts detyrosinated tubulin



Technische Universität München



Wissenschaftszentrum
Weihenstephan
Lehrstuhl für
Entwicklungsgenetik

Dr.
Daniela M. Vogt Weisenhorn

Ingoldstädter Landstraße 1
85764 Neuherberg / München
Germany

Tel +49.89.3187 4110
Fax +49.89.3187 3099

daniela.vogt@helmholtz-
muenchen.de
[http://www.helmholtz-
muenchen.de/en/idg/](http://www.helmholtz-
muenchen.de/en/idg/)

Bankverbindung:
Bayerische HypoVereinsbank

Konto-Nr.: 700 211 80
BLZ: 400 10 01

Swift-Code:
HYVEDEMM418

IBAN-Nr.:
DE88 7002 1180 0004 0010 01

UST-ID:
DE 811 193 231

Seite 1



Technische Universität München



Wissenschaftszentrum
Weihenstephan
Lehrstuhl für
Entwicklungsgenetik

into $\Delta 2$ -tubulin. However, the functional impact onto microtubule biology was not known. Thus in the first part of his thesis Mr. Rodrigo Munoz studied the effect of the CCP1-mutation onto microtubule function (during an internship in Grenoble) and indeed could show – using state-of-the-art cellular assays – that the CCP1 mutation highly likely increases the instability of microtubules. This effect could be partially rescued by applying the endogenous agonist of oleoylethanolamide (OEA) of PPAR α , thus it could be an effect of modulating the cannabinoid system.

Therefore Mr. Munoz went on to examine whether these molecular changes might also have an effect on Purkinje Cell development and the death process in the PCD-model. He found that indeed morphological changes can be detected already during the pre-degenerative phase and that OEA might prevent these changes and even Purkinje cell death, but only when applied early enough and at specific concentrations. Interestingly he could detect that the expression of PPAR α is increased in early degenerative stages, whereas the CB2 receptor increased in later stages. However, OEA treatment could only increase the PPAR α expression even further, but did not have an effect on CB2 expression.

Finally he determined the behavioral phenotype of the PCD model during the early degenerative stage, the degenerative stage and after treatment with OEA. He could clearly show that motor coordination, cognition and social behavior is strongly correlated with the loss of Purkinje cells, whereas general movement parameters was not affected and explorative behavior only during the early degenerative phase. In contrast to the hypothesis based on his findings at the cellular and histological level motor coordination was not altered after OEA treatment. However, and in sum, he could clearly show that cerebellar dysfunction influences cognitive and affective functions in a progressive manner in the PCD model paralleling the observed cellular and histological changes.

In the discussion Mr. Munoz clearly demonstrates that he is well capable of interpreting his results, put them into the context of the published literature. Still, sometimes a tendency of overinterpreting the results can be observed, which, however, might be necessary to ask the next scientific questions, and highly likely is due to his enthusiasm concerning his research.

In sum, I fully support the acceptance of the thesis of Mr. Rodrigo Munoz as an international Ph.D., since the amount and quality of work is equivalent to the ones I was honored to supervise in Germany. Thus his thesis – according to my opinion - has the quality to be accepted as a thesis also in the German system.

Yours sincerely

Dr. Daniela Vogt Weisenhorn
Deputy Director



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

DEPT. OF BIOLOGY
UNIVERSITY OF PADOVA – VIA U. BASSI 58
VENETIAN INSTITUTE OF MOLECULAR MEDICINE – VIA G. ORUS 2
35129 PADOVA
(ITALY)



RUBÉN QUINTANA-CABRERA, PH.D.
Biomedical Scientist

Padova, 27/08/2015

Report on the PhD Thesis entitled

“Neuronal Plasticity in motor control centers: analysis of the endocannabinoid system in the cerebellum of the PCD mutant mouse”

submitted by **Rodrigo Muñoz Castañeda**.

The cerebellum, a main player in motor control, has also been suggested to have a role in other processes such as cognition and affection. This has prompted the idea that its dysfunction may be linked to disorders such as schizophrenia or autism; however, evidences supporting that role for the cerebellum are still weak and controversial.

To shed new light in this field, Rodrigo Muñoz Castañeda elegantly addresses in his thesis work the involvement of cerebellar purkinje cells (PC) degeneration in cognitive and affective processes. To this aim, Rodrigo main focused on the involvement of the endocannabinoid system, a major modulator of affect, emotions and motivation. Using as a model PCD (Purkinje Cell Degeneration) mice carrying a loss of function mutation in the *Cop1/Nna1* -responsible for de-polyglutamylation of microtubules-, he first addressed the dynamics and structure of microtubules (MTs) underlying cerebellar degeneration in these mice. To this end Rodrigo tracked the status of microtubules in PCD mouse embryonic fibroblasts (MEFs). In deep analysis of MTs dynamics and structure indicated an increased MTs instability in PCD cells. Of note, this effect was partially reverted by oleoylethanolamide (OEA), shown to increase MT associated proteins expression in a peroxisome proliferator activated receptor (PPAR α) dependent manner. The improved stability of MTs triggered by OEA merged a prevention of PCs morphological alterations *in vivo*, as quantified by changes in soma and dendrite morphology. Interestingly, the increased apoptotic PC death occurring in the cerebellum was also reduced by OEA administration at the pre-neurodegenerative stage, thus providing a path to improve neuronal fate in PCD animals. Considering the PPAR α agonistic activity of OEA, analysis of endocannabinoid receptors further showed a progressive enrichment on PPAR α and CB2 receptors in PCD cerebellum during the pre- and neurodegenerative stages, respectively. Administration of OEA was able to further specifically increase the expression of PPAR α , hence confirming its effects on these receptors.

Finally, to address behavioral changes due to PC loss, Rodrigo performed a wide range of motor, long-term memory, social and home-cage behavior analyses at early and late states of

neurodegeneration. Results suggest social deficits and long-term memory impairment, independently from the intrinsic motor deficits occurring in PCD mice. Thus, these results support a role for cerebellum in cognition and social behavior.

In sum, Rodrigo has characterized the changes occurring in MTs architecture and in the endocannabinoid system underlying PC progressive loss. These alterations are responsible for cognitive, social and motor deficits caused by PC death in PCD mice. Importantly, this work further supports a role for cerebellum in cognition and social behavior. Moreover, it underscores the therapeutic use of OEA in the modulation of PC fate, which may suggest its therapeutic use in the prevention of cognitive impairment in cerebellar diseases.

Rodrigo has written his thesis work in Spanish, including a summary in English. The thesis is well structured and the reading is fluent and clear, as so does the message of this work. To address the proposed hypothesis, Rodrigo performed a large number of experimental biology and behavioral tests, thus justifying the wide broad of techniques learnt by the PhD candidate. Moreover, to wider his research background on microtubules biology, he carried out an internship in the laboratory of Prof. Annie Andrieux (Grenoble Institute of Neurosciences, France), a recognized expert in the field. The large number of excellent and convincing data obtained and the accurate statistical analysis strongly support the main conclusions of the work. I have no doubt that the results reported here will be soon published and will represent a substantial contribution to the field.

The broad spectrum of experimental abilities of Rodrigo is strengthened by an exceptional scientific background, which includes a master in "Neuropsychopharmacology of drugs of abuse" and another in "Neurosciences". Jointly with his educational background in Clinical Psychology, these facts render Rodrigo a great candidate to perform successful research in the future. In summary, and considering the outstanding research performed, I have no hesitation to strongly recommend the acceptance of the PhD entitled "Neuronal Plasticity in motor control centers: analysis of the endocannabinoid system in the cerebellum of the PCD mutant mouse" submitted by Rodrigo Muñoz Castañeda and supervised by Dr. Eduardo Weruaga and Dr. David Díaz for an International Doctorate degree.

Yours sincerely,

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'R' followed by 'Q' and 'C', with a horizontal line underneath.

Rubén Quintana Cabrera

A mis padres y hermanos

A María

Agradecimientos

Después de 5 años en el laboratorio, 4 de ellos realizando esta Tesis, hay muchas personas que se merecen más de un agradecimiento por mi parte. En primer lugar agradecer a mis directores de Tesis, los Dres. Eduardo Weruaga y David Díaz, por haberme dado la oportunidad de poder disfrutar durante estos años aprendiendo e investigando a su lado. Gracias por ayudarme a aprender de mis errores; por todas las críticas que me han permitido mejorar y avanzar; por todos los consejos y paciencia, sin los cuales no podría haber realizado esta Tesis. En definitiva, gracias por haberme dirigido durante todo este camino. También agradecer al Dr. Alonso Peña que, aunque aparentemente estaba ausente, siempre ha estado ahí dispuesto a ayudarme y aconsejarme en todo lo necesario.

Cómo no, agradecer a toda el área de Biología Celular y Patología, encabezada por el Dr. Aijón, no sólo su acogimiento, sino también su ayuda y consejos durante todos estos años. Muchas gracias Dr. Lara, Dra. Arévalo, Dr. Briñón, Dra. Velasco, Dr. Porteros y Dra. Lillo. No me olvido de los becarios, tanto pasados como presentes, que me han acompañado durante todos estos años (Dra. Rodrigo Murias, Dr. Moyano Téllez, Dr. Carreño Gutiérrez, Dr. Herranz Martín, Dra. Ogueta Gutiérrez, Fer, Antonio, Rafa, Xavier y Carlos). Agradecer especialmente en este caso a Fer y Antonio, con los que comencé mi andadura en el departamento 5 años atrás. También agradecer enormemente a Maite Sánchez Montero y Carmen Payán toda su ayuda y disponibilidad. También quiero dar un enorme y especial agradecimiento a Marisán, siempre presente, cuyas enseñanzas y charlas han sido de enorme utilidad en el laboratorio.

También agradecer a todos los integrantes del Instituto de Neurociencias de Castilla y León con los que he pasado estos años. Gracias por la ayuda y los consejos de estos años, y más importante, por el apoyo y los ánimos diarios (¿cómo dejar atrás esos saludos matinales a la puerta del instituto?). Y cómo olvidar a todo el elenco de becarios –y no becarios- que habita o a habitado en los laboratorios del INCyL (Marta, Ada, Ana, Adrián, Dani, Myriam, Dr. Maru, Emmanuel). También agradecer a las Dras. Rodríguez Rodríguez y Tabernero su especial apoyo, ánimo y consejos durante todos estos años, tanto en lo personal como en lo referente a la realización de la Tesis. Le prometo firmemente a Raquel intentar dejar de fumar alguna vez...

Mención especial merece el Dr. Ávila Zarza, perteneciente al Departamento de Estadística, por su ayuda en el análisis de datos, y más importante por su alegría e ilusión en todo momento.

Gracias al Dr. Villoslada del *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (IDIBAPS), donde tuve mi primera experiencia con las técnicas de cultivo. Especialmente agradecer a Ohiana, que me enseñó lo necesario para poder realizar yo mismo mis cultivos en el laboratorio, aunque finalmente no se pudiera llevar a cabo en este proyecto.

Gracias a la Dra. Andrieux del *Grenoble Institut des Neurosciences*, donde realicé el estudio de los microtúbulos. Gracias por enseñarme todo lo necesario durante los meses que pase en el laboratorio, y sobre todo muchas gracias por el acogimiento. Especialmente agradecer a las Dras. Moutin y Peris, que estuvieron apoyándome y enseñándome directamente tanto dentro como fuera del laboratorio. También agradecer a los Dres. Deloulme y Denarier, con quienes mantuve muy conversaciones muy fructíferas y agradables. No podía olvidarme tampoco de Chrystelle y Benoît, quienes me enseñaron y acogieron dentro y fuera del laboratorio.

Gracias en especial a todos mis amigos. Gracias por estar ahí en todo momento para disfrutar, apoyar y seguir disfrutando. Gracias por darme alegría y apoyo a pesar de mis continuas ausencias durante estos años.

Por último, muchas gracias a María, a Knocky y a toda mi familia. Siempre habéis estado apoyándome y animándome a que hiciera lo que me gustara, y puedo decir que gracias a vosotros he llegado hoy aquí. Muy especialmente María, cuyo apoyo me ha permitido seguir adelante más de una vez ¡Muchas gracias!

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	4
<i>Receptores endocannabinoides clásicos</i>	4
<i>Ligandos cannabinoides endógenos</i>	6
<i>Otros componentes del sistema endocannabinoide</i>	6
<i>Sistema endocannabinoide y cerebelo</i>	7
CEREBELO	8
<i>Estructura macroscópica.....</i>	8
<i>Estructura de la corteza cerebelosa</i>	8
Células en cesto.....	10
Células estrelladas.....	10
Células de Purkinje	11
Células de Golgi	12
Granos	12
<i>Conectividad externa de la corteza cerebelosa</i>	13
Aferencias.....	13
Eferencias	14
<i>Funciones del cerebelo</i>	15
<i>Otras funciones del cerebelo</i>	17
<i>Desarrollo de la corteza cerebelosa</i>	19
Desarrollo macroscópico.....	20
Desarrollo neuronal y sináptico.....	21
EL RATÓN MUTANTE PCD	22
<i>Mutación pcd</i>	23
<i>Efecto de la mutación pcd</i>	25
<i>El ratón mutante PCD como modelo de trastornos del desarrollo y alteraciones microtubulares</i>	26
LOS MICROTÚBULOS	26
<i>Microtúbulos y neuronas.....</i>	30
LA N-OLEILETANOLAMINA COMO FÁRMACO NEUROPROTECTOR.....	32
<i>N-oleiletanolamina</i>	32
<i>Receptores PPARα.....</i>	33
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	41
<i>Cría y genotipado de animales.....</i>	41
<i>Extracción de ADN.....</i>	41
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	42
Electroforesis.....	43
ANÁLISIS COMPORTAMENTAL	43
<i>Rota-rod</i>	44
<i>Test de comportamiento en jaula</i>	44
<i>Test de reconocimiento de objetos (NOR).....</i>	45

<i>Test de preferencia social</i>	46
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	47
OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO.....	48
<i>Sacrificio y disección</i>	48
<i>Seccionamiento del tejido</i>	49
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	49
<i>Inmunofluorescencia indirecta</i>	50
<i>TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labelling)</i>	51
CULTIVOS CELULARES.....	51
<i>Cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de ratón</i>	51
Transfección de MEF	52
Tratamiento farmacológico con OEA en cultivo	52
Adquisición y análisis de los microtúbulos en MEF mediante <i>time-lapse</i>	53
Análisis de la curvatura de los microtúbulos	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
RESULTADOS	57
ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DE LA DINÁMICA Y ESTRUCTURA DE LOS MICROTÚBULOS	59
<i>Efecto de la mutación PCD en la dinámica y estructura de los microtúbulos</i>	59
<i>Efecto del tratamiento con OEA en la dinámica y estructura de los microtúbulos</i>	60
ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL CEREBELO DEL RATÓN PCD	61
<i>Desarrollo morfológico de las células de Purkinje</i>	62
<i>Proceso de muerte neuronal</i>	62
<i>Expresión del sistema endocannabinoide</i>	63
<i>Efecto de la administración de OEA en la morfología de las células de Purkinje</i>	64
<i>Efecto de la administración de OEA en el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje del ratón PCD</i>	65
<i>Efecto de la administración de OEA en la expresión de receptores endocannabinoides</i> .	65
ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL RATÓN MUTANTE PCD	66
<i>Análisis de la prueba de rota-rod</i>	66
<i>Análisis de la prueba de comportamiento en jaula</i>	67
<i>Análisis de la memoria de reconocimiento</i>	67
<i>Análisis del test de preferencia social</i>	68
<i>Efecto de la administración de OEA en la coordinación motora del ratón mutante PCD</i> . 68	
DISCUSIÓN	69
EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE OEA EN LA MUTACIÓN PCD	71
Efecto de la OEA en la expresión del sistema endocannabinoide.....	73
Efecto de la OEA en la morfología de las células de Purkinje.....	73
DESARROLLO DEL RATÓN MUTANTE PCD	74
<i>La regulación de la poliglutamilación de los microtúbulos es esencial durante el desarrollo cerebeloso</i>	74
<i>Efecto de la mutación pcd en las primeras semanas de desarrollo postnatal</i>	75
<i>Pre-neurodegeneración de las células de Purkinje</i>	76
Efecto de la pre-neurodegeneración en el comportamiento del ratón PCD.....	77
<i>Neurodegeneración de las células de Purkinje</i>	77
Efecto de la neurodegeneración en el comportamiento del ratón PCD	78

Efecto de la OEA en el proceso neurodegenerativo del ratón PCD	80
CONCLUSIONES	83
ENGLISH SUMMARY	87
INTRODUCTION	91
HYPOTHESIS AND OBJECTIVES.....	92
MATERIAL AND METHODS	93
<i>Animals</i>	<i>93</i>
<i>Mouse genotyping</i>	<i>93</i>
<i>Tissue extraction and preparation</i>	<i>94</i>
<i>Immunofluorescence.....</i>	<i>94</i>
<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Fluorescein dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) detection</i>	<i>94</i>
<i>Quantification of the endocannabinoid receptors</i>	<i>95</i>
<i>Morphological analysis of PCs.....</i>	<i>95</i>
<i>Behavioural analyses</i>	<i>95</i>
<i>Cell culture and transfection</i>	<i>96</i>
<i>Video microscopy</i>	<i>97</i>
<i>Microtubules dynamics and structure analysis</i>	<i>97</i>
<i>OEA administration</i>	<i>98</i>
<i>Statistical analysis.....</i>	<i>98</i>
RESULTS.....	98
<i>In vitro analysis of microtubule dynamics and structure.....</i>	<i>98</i>
<i>Effect of OEA on microtubules dynamics and structure</i>	<i>99</i>
<i>Morphological changes in the main dendrite of PCs begin during the pre-neurodegenerative process.....</i>	<i>100</i>
<i>Effect of OEA administration on PCs morphology.....</i>	<i>100</i>
<i>TUNEL analysis revealed a general neuronal death in the cerebellum of PCD mice</i>	<i>101</i>
<i>OEA administration prevents PCs death</i>	<i>101</i>
<i>Changes in the endocannabinoid receptors expression during both pre- and neurodegenerative processes</i>	<i>102</i>
<i>OEA administration changes endocannabinoid receptors expression</i>	<i>102</i>
<i>Motor coordination is only affected during the neurodegenerative process.....</i>	<i>102</i>
<i>Home-cage behaviour is altered in PCD mice before PCs death</i>	<i>103</i>
<i>Long-term memory is only affected in late degenerative stages</i>	<i>103</i>
<i>Social preference is affected in PCD mice as a result of cerebellar degeneration.....</i>	<i>103</i>
<i>OEA administration did not affect motor behaviour in PCD mice</i>	<i>104</i>
DISCUSSION.....	104
<i>pcd mutation increase MTs instability but not early cerebellar structure.....</i>	<i>105</i>
<i>Morphological defects of PCs influence non-motor behaviour</i>	<i>105</i>
<i>Progression of cerebellar defects affects behavioural tasks progressively</i>	<i>107</i>
<i>OEA administration prevents cerebellar alterations in the PCD mouse</i>	<i>108</i>
CONCLUSIONS	111
ICONOGRAFÍA/FIGURES	113
BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES	145

INTRODUCCIÓN

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas son disfunciones del sistema nervioso (SN) que se caracterizan por un aumento patológico de la muerte neuronal. Sin embargo, su etiología y pronóstico varía enormemente en función de la enfermedad concreta a la que se haga referencia. Éstas pueden afectar a muy diversas áreas del SN como, por ejemplo, la sustancia negra en el Parkinson, la corteza cerebral en el Alzheimer o el cerebelo en la degeneración espino-cerebelosa. Aunque hoy en día existen tratamientos capaces de ralentizar el proceso degenerativo de algunas de estas enfermedades, aún no se conoce ningún tratamiento verdaderamente eficaz para ninguna de ellas. Ello hace que estas enfermedades tengan un gran impacto tanto personal como social, ya que el deterioro con el que cursan dichas patologías suele incapacitar a los pacientes, haciéndolos totalmente dependientes. Esta dependencia, a su vez, afecta a todo el entorno de la persona, generando además unos gastos personales y económicos de gran envergadura. Además, según la Organización Mundial de la Salud, se espera que con el avance de la Medicina las enfermedades neurodegenerativas, al estar asociadas en gran medida al envejecimiento, tengan todavía una mayor prevalencia con el tiempo (World Health Organization, 2006).

Debido al desconocimiento acerca de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, resulta complicado poder realizar un diagnóstico temprano que mejore el desarrollo de los tratamientos existentes. Ello se debe principalmente a la dificultad para encontrar bio-marcadores específicos de cada una de estas enfermedades. Por tanto, este diagnóstico suele hacerse en base a indicios y pruebas neuropsicológicas. Así, el conocimiento de las alteraciones comportamentales que preceden a los procesos patológicos de muerte neuronal, no sólo es esencial para poder realizar un diagnóstico temprano, sino también para poder llevar a cabo un diagnóstico diferencial. Esto permitiría la adopción de tratamientos más específicos y anticipados, mejorando así el pronóstico y la calidad de vida de las personas afectadas.

Un aspecto que desarrollaremos en esta Tesis Doctoral es la relación que tiene el sistema endocannabinoide con los procesos neurodegenerativos. Como se verá más adelante, en las últimas décadas el sistema endocannabinoide ha adquirido una gran importancia en Neurobiología. Esto se debe principalmente a que tanto sus agonistas como sus receptores desempeñan un papel esencial tanto en procesos de desarrollo como de muerte neuronal. En este sentido, estudios recientes han demostrado que este sistema ejerce un papel neuroprotector en patologías concretas del SN.

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se caracterizará el desarrollo de un modelo de degeneración cerebelosa, lo que nos permitirá tener una comprensión mejor del proceso de muerte neuronal en el cerebelo y sus efectos comportamentales. Para ello usaremos el ratón mutante

Introducción

PCD (*Purkinje Cell Degeneration*), que sufre un proceso de muerte neuronal que afecta a las células de Purkinje del cerebelo a las pocas semanas del nacimiento. Tanto las fases previas a la muerte de las células de Purkinje como el progreso de la degeneración *per se* nos permitirán estudiar cómo las alteraciones en el funcionamiento del cerebelo pueden generar disfunciones cognitivo-comportamentales.

Asimismo, se estudiará el posible efecto paliativo de un agonista perteneciente al sistema endocannabinoide, la oleiletanolamida (OEA). Aunque esta sustancia es sintetizada de manera endógena, estudios recientes demuestran que su administración exógena puede tener efectos preventivos en procesos de muerte neuronal. El conocimiento en detalle del modelo neurodegenerativo PCD nos permitirá extraer conclusiones precisas de la actividad de la OEA cuando se aplica como un fármaco.

SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

El sistema endocannabinoide está compuesto por un conjunto de ligandos lipídicos, las enzimas que intervienen en su síntesis y degradación, y los receptores de dichos ligandos. Además, su primer ligando exógeno conocido es el Δ -9-tetrahidro-cannabinol (Δ 9-THC), la sustancia psicoactiva principal de la planta de *Cannabis sativa*. Precisamente, el descubrimiento de la unión de este alcaloide exógeno a receptores concretos del SN dio nombre al conjunto de elementos que componen el sistema endocannabinoide. Esta caracterización se llevó a cabo en 1988, nombrándose a los receptores diana del Δ 9-THC como receptores endocannabinoides tipo 1 (CB1; Devane et al., 1988; Pertwee, 2006; Wang y Ueda, 2009). Por su parte, la araquidonoil-etanolamida o anandamida (AEA), que fue el primer ligando endógeno de los CB1 sintetizado, es un lípido cuya estructura química es muy semejante al Δ 9-THC, y pertenece a la familia de las *N*-aciletanolaminas (NAEs; Dewey, 1986; Howlett, 1995). Posteriormente se sintetizó el 2-araquidonilglicerol (2-AG), ligando de los receptores CB1, pero también de los receptores endocannabinoides tipo 2 (CB2; De Petrocellis et al., 2004). De este modo, el conjunto de estos dos receptores, CB1 y CB2, y sus respectivos ligandos, AEA y 2-AG, representan los elementos clásicos del sistema endocannabinoide.

Receptores endocannabinoides clásicos

Los receptores cannabinoides clásicos (CB1 y CB2) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, y tienen una homología del 44% en su secuencia de aminoácidos. Además, en los siete dominios transmembrana la homología de su secuencia asciende al 68% (**Fig. 1a**; Pacher et al., 2006). Sin embargo, difieren entre ellos tanto en su localización como en la especificidad de sus ligandos. En este sentido, los CB1 se encuentran mayoritariamente en el sistema ner-

Introducción

vioso central (SNC), prácticamente en todas sus estructuras (**Fig. 1b**). De hecho, se considera que los CB1 son los receptores acoplados a proteínas G más abundante del SNC (Kawamura et al., 2006; Kishimoto y Kano, 2006). En el SNC el sistema endocannabinoide actúa como un sistema de señalización retrógrada, inhibiendo la liberación de neurotransmisores desde las neuronas presinápticas; por ello se le atribuye a dicho sistema una función neuromoduladora de los procesos de neurotransmisión (Marsicano y Lutz, 2006; Carey et al., 2011; Castillo et al., 2012).

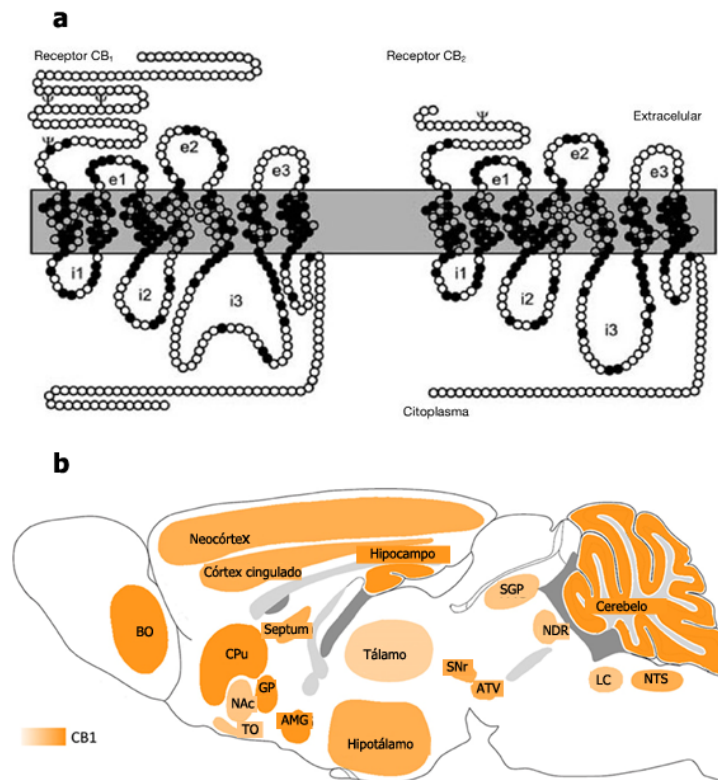


Figura 1: a) Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Los círculos negros representan aminoácidos comunes entre los dos receptores. b) Esquema de la localización de los receptores CB1 en el SNC del ratón. La diferente intensidad del color representa las diferencias en la expresión del receptor CB1 en cada área del SNC. AMG: amígdala; ATV: área tegmental ventral; BO: bulbo olfativo; CPu: caudado putamen; GP: globo pálido; LC: *locus coeruleus*; NAc: núcleo accumbens; NDR: núcleo dorsal del rafe; NTS: núcleo del tracto solitario; SGP: sustancia periacueductal; SNr: sustancia negra *pars reticulata*; TO: tubérculo olfativo. Modificado de Erdozain et al., 2009; Flores et al., 2013.

Por su parte, los CB2 se expresan esencialmente en células de los sistemas inmunológico y hematopoyético (Munro et al., 1993; Ofek et al., 2006). No obstante, en las últimas décadas diferentes estudios han observado que los CB2 podrían expresarse también en el SNC, concretamente en las células microgliales (Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006). Sin embargo, a día de hoy tanto su expresión en el SNC como su posible función dentro del mismo siguen siendo controvertidas debido al poco interés suscitado en comparación con los receptores CB1. Además, se cree que la baja expresión de los receptores CB2 en el SNC hace que su identificación mediante anticuerpos –por otra parte de baja especificidad- resulte complicada (Onaivi, 2011).

Ligandos cannabinoides endógenos

Los ligandos endógenos del sistema endocannabinoide son lípidos poliinsaturados pertenecientes a la familia de los eicosanoides y que derivan principalmente del ácido araquidónico, como la AEA y el 2-AG (Pacher et al., 2006). Una de las principales características de los endocannabinoides es que son sintetizados “a demanda”, es decir, que se generan en el momento como respuesta a un aumento del calcio intracelular o la activación de receptores metabotrópicos, y no se almacenan en vesículas sinápticas (Rodríguez de Fonseca et al., 2005; Liu et al., 2006; Pacher et al., 2006).

Aunque ambos compuestos se unen a los receptores CB1 y CB2, la capacidad de cada una de estas moléculas para activar dichos receptores difiere considerablemente (Pacher et al., 2006; Placzek et al., 2008; Roche y Finn, 2010). La AEA y el 2-AG tienen la misma afinidad por los receptores CB2, pero únicamente el 2-AG actúa como agonista de dichos receptores. De este modo, se ha demostrado que la función de la AEA como ligando de los receptores CB2 es más la modulación de su actividad que su activación directa (Gonsiorek et al., 2000). Por el contrario, en relación a los receptores CB1, la AEA tiene mayor afinidad por éstos que el 2-AG (Hillard, 2000).

En la última década diferentes autores han demostrado la implicación de estos dos agonistas endocannabinoides en la activación de otros receptores diferentes a los CB1 y CB2, destacando entre ellos los receptores vaniloideos tipo 1 (TRPV1) y los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR; Wiley y Martin, 2002; Maccarrone et al., 2010).

Otros componentes del sistema endocannabinoide

Tal y como se ha indicado, se ha demostrado recientemente que los ligandos endógenos de los receptores CB1 y CB2 también pueden actuar como agonistas de otros receptores no considerados inicialmente como pertenecientes al sistema endocannabinoide, como los receptores activados por proliferadores de peroxisomas subtipo alfa (PPAR α). Es por ello que tanto estos receptores como sus ligandos endógenos se han relacionado con el sistema endocannabinoide. Entre estos ligandos endógenos se encuentran algunas NAEs diferentes de la AEA, como la oleiletanolamida (OEA) o la palmitoiletanolamida (PEA; Facci et al., 1995; Berdyshev et al., 2001). Así, la OEA se ha observado que se une principalmente a los receptores PPAR α , TRPV1 y GPR55, mientras que la PEA se une únicamente a los receptores PPAR α y GPR55 (Guzmán et al., 2004; Brown, 2007; Ryberg et al., 2007; Ross, 2009). Además, ambos compuestos, al igual que los endocannabinoides clásicos, son sintetizados a demanda a partir de fosfolípidos de membrana. Asimismo, se ha demostrado que ambas moléculas pueden modular los efectos derivados de la administración de agonistas de los receptores CB1 y CB2 (Pacher et al., 2006; Brown, 2007). Además, tanto la biosín-

tesis como la biodegradación de ambos compuestos están íntimamente relacionadas con las de la anandamida. De este modo, aunque estas moléculas no se unen a ninguno de los receptores cannabinoides clásicos (CB1 y CB2), la similitud de su estructura química y su mecanismo de actuación con la AEA y el 2-AG han llevado a muchos investigadores a considerarlos finalmente como parte de dicho sistema (Cravatt y Lichtman, 2004; Sagar et al., 2009).

Sistema endocannabinoide y cerebelo

El cerebelo constituye el principal centro de coordinación motora del SNC (Glickstein et al., 2009; Voogd, 2011). Como se explicará más detalladamente en el próximo apartado, la corteza cerebelosa está compuesta por tres capas. Estas capas se organizan en torno a las células de Purkinje, cuyos somas se encuentran en la capa central (la capa de las células de Purkinje) y sus árboles dendríticos en la capa superior (la capa molecular). Es en esta última capa donde existe una mayor expresión de receptores CB1 (Kawamura et al., 2006; Suárez et al., 2008). Asimismo, existe una expresión muy elevada de receptores CB1 en la formación sináptica que se forma alrededor del soma y el inicio del axón de las células de Purkinje, la denominada “formación de *Pinceaux*” (Suárez et al., 2008). A pesar de la relación existente entre la expresión de los receptores CB1 y las células de Purkinje, éstas no expresan dichos receptores (Herkenham et al., 1991; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993; Suárez et al., 2008), sino que aquellas neuronas que contactan con las células de Purkinje en las zonas mencionadas son quienes los expresan.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la función del sistema endocannabinoide en el SNC es la modulación de los procesos de neurotransmisión. Esta modulación se lleva a cabo mediante un proceso de señalización retrógrada, es decir, a través de la liberación por parte de la neurona post-sináptica de agonistas de los receptores CB1, que se encuentran en la neurona pre-sináptica (Marsicano y Lutz, 2006; Carey et al., 2011; Castillo et al., 2012). Los receptores CB1 se expresan en los axones de neuronas que contactan con las células de Purkinje, y son estas últimas las que sintetizan y liberan ligandos cannabinoides (Cristino et al., 2006; Suárez et al., 2008). En el cerebelo, esta función neuromoduladora adquiere gran importancia en procesos de plasticidad sináptica, como la potenciación o la depresión a largo plazo (LTP¹ y LTD², respectivamente). Estos dos procesos, LTP y LTD, son considerados como la base electrofisiológica del aprendizaje dependiente del cerebelo (Ito, 2002a, 2006), y los receptores CB1 desempeñan un papel esencial en su generación (Carey et al., 2011). De este modo, el sistema endocannabinoide se erige como un elemento esencial a la hora de comprender tanto el desarrollo como el funcionamiento del cerebelo.

¹ Del inglés *Long Term Potentiation*

² Del inglés *Long Term Depression*

CEREBELO

Estructura macroscópica

El término cerebelo deriva del latín *cerebellum*, que significa “cerebro pequeño”. Macroscópicamente el cerebelo -al igual que la corteza cerebral- se divide en dos grandes hemisferios, separados entre sí por el vermis, que se encuentra en la parte central. Además, el cerebelo presenta un conjunto de circunvoluciones, tanto en los hemisferios como en el vermis, que delimitan los diferentes lóbulos cerebelosos (nombrados de I a X). Finalmente, también podemos observar externamente los flóculos y paraflóculos, que se encuentran en la parte más externa de cada hemisferio, constituyendo las partes más laterales del cerebelo (**Fig. 2**).

El cerebelo está relativamente aislado del resto del encéfalo y la entrada y salida de información se produce únicamente a través de los pedúnculos cerebelosos inferiores y superiores, respectivamente (Schmidt y Bodznick, 1987; Voogd y Glickstein, 1998; Glickstein et al., 2009).

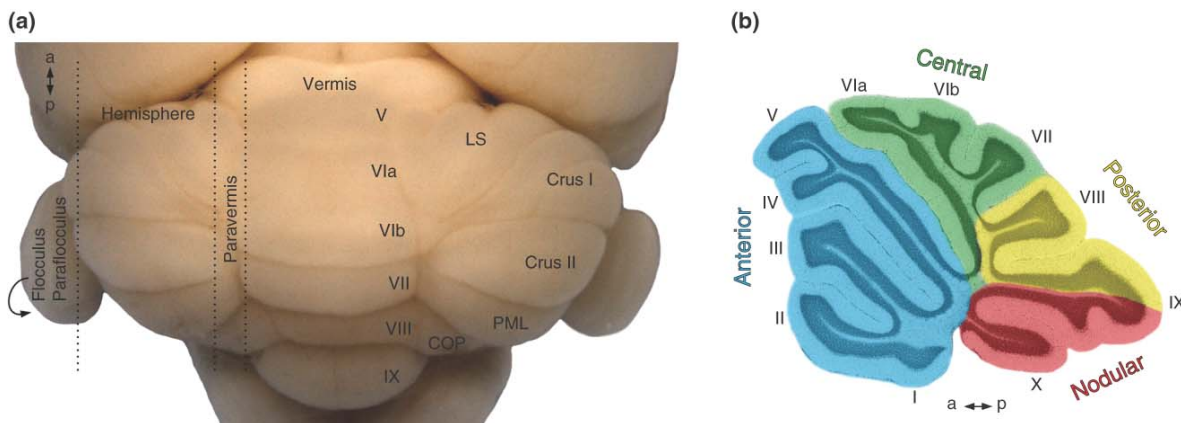


Figura 2: Vista macroscópica del cerebelo. a) Vista externa de un cerebelo adulto de ratón, en el que se pueden diferenciar sus partes: vermis, hemisferios, flóculos y paraflóculos. Asimismo, en la región central del vermis se observan las circunvoluciones que dan lugar a los diferentes lóbulos. Los cuatro primeros lóbulos, así como el décimo, no son visibles en esta imagen debido a su ubicación. b) Corte sagital de un cerebelo adulto en el que se pueden diferenciar cada uno de los lóbulos. Modificado de White y Sillitoe, 2013.

Estructura de la corteza cerebelosa

La corteza cerebelosa está formada por una estructura trilaminar que se mantiene a lo largo de todo el eje sagital del cerebelo. Sin embargo, debido a las diferencias morfológicas existentes entre los hemisferios y el vermis, únicamente en este último se pueden diferenciar correctamente todos los lóbulos del cerebelo en un mismo plano. En cada una de las tres capas vamos a encontrar diferentes tipos neuronales cuyas principales características y funciones describiremos brevemente. Además, por debajo de la corteza cerebelosa, en la sustancia blanca, podemos encontrar los núcleos cerebelosos profundos (NCP). Estos son esenciales en la transmisión de informa-

Introducción

ción, ya que constituyen el único punto de relevo de las células de Purkinje en el envío de información fuera del cerebelo (Triarhou et al., 1987; Fink et al., 2006; Uusisaari y Knöpfel, 2011).

La estructura de la corteza cerebelosa se organiza en torno a las células de Purkinje, cuyos somas se localizan en la capa de las células de Purkinje. Su árbol dendrítico se prolonga a lo largo de toda la capa molecular, cuyo crecimiento durante el desarrollo está determinado por el propio crecimiento del árbol dendrítico de las células de Purkinje. Por su parte, los axones de las células de Purkinje se extienden desde la base de su soma atravesando la capa granular y la sustancia blanca hasta llegar a los núcleos cerebelosos profundos.

De este modo, podemos clasificar estos tipos neuronales en función de la ubicación de sus cuerpos celulares en la corteza cerebelosa, de más externa a más interna sería:

- *Capa molecular*
 - Células en cesto
 - Células estrelladas
- *Capa de las células de Purkinje*
 - Células de Purkinje
- *Capa de los granos*
 - Granos
 - Células de Golgi

Desde la parte más interna a la más externa, podemos encontrar las **granos**, que reciben información de las fibras musgosas y se encuentran en la capa granular; las **células de Golgi**, que se encuentran pegadas a la capa de las células de Purkinje y extienden sus proyecciones a lo largo de las tres capas del cerebelo; las **células de Purkinje**, que reciben información principalmente de las fibras trepadoras y de los granos, aunque conectan con todos los tipos neuronales del cerebelo, y se localizan en la capa de las células de Purkinje; y las **células estrelladas** y **en cesto** que se encuentran en la capa molecular y modulan la actividad de las células de Purkinje (**Fig. 3**).

ESTRUCTURA DEL CEREBELO

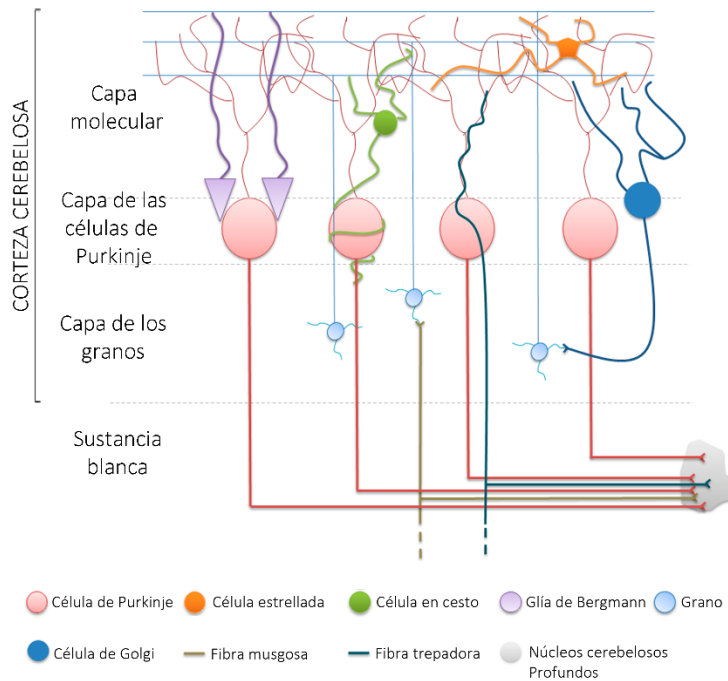


Figura 3: Esquema representativo de la estructura de la corteza cerebelosa, donde podemos diferenciar las tres capas que lo componen, así como sus principales tipos neuronales. La estructura del cerebelo viene definida en gran medida por la disposición de las células de Purkinje, las cuales determinarán la posición, el tamaño y la densidad neuronal de las capas molecular y granular. Además, puede observarse cómo todas las sinapsis del cerebelo giran en torno a la propia actividad de las células de Purkinje.

Células en cesto

Son neuronas multipolares que se encuentran en la parte más interna de la capa molecular. Contactan tanto con la parte más proximal del árbol dendrítico de las células de Purkinje (sinapsis axo-dendrítica) como con el soma y la sección inicial del axón de las mismas (sinapsis axo-somática y axo-axónica; **Fig. 4**), constituyendo la “formación en *Pinceaux*” (Buttermore et al., 2012; Blot y Barbour, 2014).

Las células en cesto, al igual que las células de Purkinje, son neuronas inhibitorias cuyo principal sistema de neurotransmisión es el GABAérgico. Esta señalización está modulada por la liberación de endocannabinoides por parte de las células de Purkinje, especialmente en la “formación de *Pinceaux*”, donde existe una densidad alta de receptores endocannabinoides como veremos en mayor detalle más adelante (Pouzat y Hestrin, 1997; Kawamura et al., 2006; Suárez et al., 2008).

Células estrelladas

Son interneuronas multipolares que contactan principalmente con las células de Purkinje, al igual que las células en cesto. Sin embargo, a diferencia de las anteriores, las células estrelladas se encuentran en la parte media-superior de la capa molecular. Además, llevan a cabo únicamente sinapsis axo-dendríticas con las células de Purkinje (**Fig. 4**; Yamanaka et al., 2004).

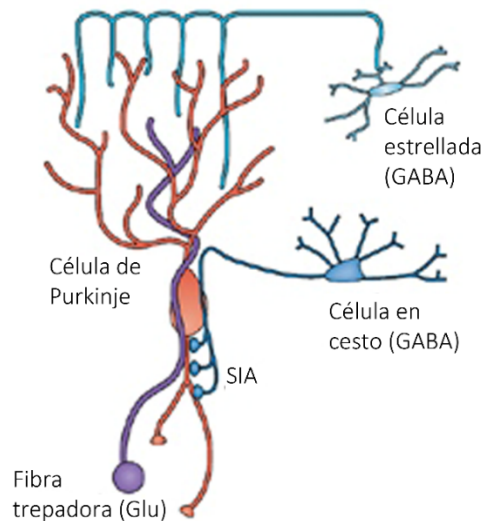


Figura 4: Esquema de las conexiones sinápticas recibidas por una célula de Purkinje. Puede observarse cómo las células estrelladas y las células en cesto envían sinapsis inhibitorias (GABA) a las células de Purkinje. Sin embargo, las sinapsis de ambos tipos celulares se producen en puntos diferentes de las células de Purkinje. De este modo, las células estrelladas forman sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje, mientras que las células en cesto contactan con el soma y el segmento inicial del axón. Este contacto sináptico entre las células en cesto y las PC forman la denominada “formación de *Pinceaux*”. SIA: Segmento inicial del axón; Glu: Glutamato. Modificado de Huang et al., 2007.

Células de Purkinje

Constituyen el principal tipo neuronal del cerebelo, alrededor del que se organiza toda la estructura de la corteza cerebelosa. Son células con un gran tamaño y sus cuerpos neuronales –de alrededor de $200 \mu\text{m}^2$ en el ratón adulto- se ubican en una monocapa denominada capa de las células de Purkinje. Tienen una arborización dendrítica de enorme extensión –aproximadamente $100 \mu\text{m}$ de largo y 30 de ancho en el ratón adulto- que se despliega a lo largo de toda la capa molecular (McKay y Turner, 2005; Kim et al., 2011; Nedelescu y Abdelhack, 2013). Esta arborización dendrítica recibe conexiones de las fibras paralelas, así como de las interneuronas de la capa molecular, es decir, las células en cesto y estrelladas. No obstante, las células en cesto también contactan con el comienzo del axón y el soma de las células de Purkinje, dando lugar a la “formación en *Pinceaux*” (Suárez et al., 2008; Buttermore et al., 2012). Además, las células de Purkinje reciben proyecciones excitatorias directamente del exterior del cerebelo a través de las fibras trepadoras, que se originan en el núcleo olivar inferior (ver más adelante).

Por su parte, el axón de las células de Purkinje representa la única vía de salida de la corteza cerebelosa. Éste cruza la capa de los granos hasta llegar a los NCP, con un ratio célula de Purkinje:neurona nuclear de 40:1, los cuales representan la única salida de información del cerebelo (Person y Raman, 2011).

Las células de Purkinje son células inhibitorias cuyo principal sistema de neurotransmisión es el GABA. En los últimos años se ha demostrado que las células de Purkinje expresan diacilglicerol lipasa α (DAGL α) y β (DAGL β), y *n*-acil-fosfatidiletanolamida fosfolipasa D (NAPE-PLD), principales enzimas involucradas en la biosíntesis de cannabinoides. Se sabe que los endocannabinoides ac-

Introducción

túan como mensajeros retrógrados modulando la liberación de los neurotransmisores que van a recibir las células de Purkinje (Kawamura et al., 2006; Safo et al., 2006; Suárez et al., 2008; Castillo et al., 2012). La liberación de endocannabinoides es esencial en la generación de LTP en estas neuronas, por lo que esta modulación es muy importante para la plasticidad de los circuitos cerebelosos (Safo et al., 2006; van Beugen et al., 2006; Carey et al., 2011).

Células de Golgi

Se encuentran en la parte más externa de la capa de los granos y su función principal es modular la conectividad entre las fibras musgosas con dichos granos. Este conjunto de sinapsis entre las fibras musgosas-granos-células de Golgi forma una estructura denominada *glomérulo*, que está rodeado de células gliales. De este modo, las células de Golgi regulan la actividad de los granos. Su principal neurotransmisor es el ácido gamma-aminobutírico (GABA), generando mayormente sinapsis inhibitorias.

Granos

Los granos constituyen la población neuronal principal del cerebelo y por consiguiente de la capa granular. Se distribuyen por toda esta capa y reciben información del exterior del cerebelo a través de las fibras musgosas, que tienen varios orígenes: el puente tronco-encefálico (*tracto ponto-cerebeloso*), los núcleos vestibulares (*tracto vestibulo-cerebeloso*), la médula espinal (*tracto espino-cerebeloso*) y la formación reticular (*tracto retículo-cerebeloso*). El tamaño de sus somas es muy pequeño, alrededor de $15 \mu\text{m}^2$. Sin embargo, los axones cruzan toda la corteza cerebelosa hasta llegar a la parte más externa de la capa molecular, donde se bifurcan y forman las fibras paralelas, que pueden llegar a medir entre 1 y 2 mm en el ratón adulto (Soha et al., 1997). Las fibras paralelas contactan con todos los tipos neuronales del cerebelo. Sin embargo, aunque una sola fibra paralela contacta únicamente con 3-5 células de Purkinje, cada célula de Purkinje recibe cerca de 200.000 sinapsis provenientes de fibras paralelas (Hashimoto y Kano, 2005; Cesa y Strata, 2009; Sotelo y Dusart, 2009).

Su naturaleza neuroquímica es principalmente excitatoria, siendo su principal neurotransmisor el glutamato (Stone, 1979; Hibi y Shimizu, 2012). No obstante, su actividad sináptica con las células de Purkinje está regulada por la liberación de endocannabinoides por parte de estas últimas, los cuales modulan la liberación de otros neurotransmisores (Safo et al., 2006; Carey et al., 2011).

Conectividad externa de la corteza cerebelosa

Tal y como se ha indicado anteriormente, el cerebelo se encuentra relativamente aislado del resto del SNC. De este modo, toda entrada y salida de información se llevará a cabo a través de los pedúnculos cerebelosos.

Aferencias

Las aferencias del cerebelo provienen principalmente de 3 tractos: tracto espino-cerebeloso, tracto cerebro-cerebeloso y tracto vestibulo-cerebeloso:

- *Aferencias vestibulo-cerebelosas:* Se inician en el sistema vestibular del oído interno y llegan al cerebelo tanto de forma directa (primarias) como de forma indirecta desde los núcleos vestibulares (secundarias). En ambos casos entran al cerebelo desde el pedúnculo cerebeloso inferior y terminan en el lóbulo flóculo-nodular y zonas adyacentes al vermis (Kotchabhakdi y Walberg, 1978; Brodal y Brodal, 1985; Barmack, 2003; Meng et al., 2014).
- *Aferencias espino-cerebelosas:* En este caso también podemos diferenciar un tracto espino-cerebeloso dorsal de otro ventral. Los cuerpos celulares se localizan a diferentes alturas de la médula espinal y mantienen una organización somatotópica, por lo que hay una segregación de la información recibida de cada parte del cuerpo. El tracto espino-cerebeloso dorsal lo podemos dividir en dos grupos diferenciados: uno que lleva información proveniente de los husos musculares, órganos tendinosos y mecanorreceptores cutáneos de bajo umbral; y otro con información acerca del nivel de actividad de grupos específicos de interneuronas de la espina dorsal (Oscarsson, 1969; Walmsley y Nicol, 1990; Tolbert y Knight, 2003). Por su parte, el tracto espino-cerebeloso ventral, al contrario que el dorsal, entra al cerebelo por el pedúnculo superior.
- *Aferencias cortico-cerebelosas:* La corteza cerebral envía sus proyecciones a los núcleos del puente a través del tracto córtico-pontino, desde donde se envían proyecciones al cerebelo mediante el tracto ponto-cerebeloso. Estas proyecciones llegan principalmente a los hemisferios cerebelosos. La principal tarea de los núcleos del puente es, por lo tanto, procesar información de la corteza cerebral y remitirla a la corteza cerebelosa. Es de suponer que el cerebelo recibe información sobre los movimientos que se están organizando y la información enviada desde la corteza motora. Además, los núcleos del puente reciben información proveniente del tálamo, el cual recibe, selecciona y envía a centros de procesamiento superior la información procesada (Sherman y Guillery, 1998; Sherman, 2005). Así, diversos autores consideran el circuito que se establece entre la corteza prefrontal, el cerebelo y el tálamo como la base neuro-

Introducción

anatómica que relaciona cerebelo y cognición (Rakhmanina, 1976; Tolbert, 1989; Ramnani, 2006; Andreasen y Pierson, 2008; Picard et al., 2008).

Las numerosas fibras aferentes de la corteza cerebelosa pueden dividirse en dos categorías, **fibras musgosas y trepadoras**, que difieren en la forma en que llegan a la corteza cerebelosa. Ambos tipos tienen una acción sináptica excitatoria, muy probablemente mediada por glutamato (Barmack y Yakhnitsa, 2003; Zhang y Linden, 2006). Las fibras trepadoras vienen de la oliva inferior, mientras que las fibras aferentes del resto de núcleos son fibras musgosas (como las vestibulo-cerebelosas, el espino-cerebeloso, y las fibras ponto-cerebelosas; Atkins y Apps, 1997; Pijpers et al., 2006).

Cada una de las fibras musgosas se ramifica extensamente y entra en contacto con un gran número de granos (Voogd et al., 2003), cada uno de los cuales, a su vez, contacta con muchas células de Purkinje. Así, cada fibra musgosa influye en muchas células de Purkinje, pero el efecto excitatorio en cada una es débil (Shinoda et al., 2000).

Las fibras trepadoras ascienden hasta la capa molecular, donde se dividen en varias ramificaciones, cada una de las cuales “trepas” por las dendritas de una célula de Purkinje, formando numerosas sinapsis. Además, cada célula de Purkinje recibe sinapsis de una única fibra trepadora. De este modo, debido a los numerosos contactos sinápticos que se establecen, la despolarización de una fibra trepadora desencadena una ráfaga de potenciales post-sinápticos en diferentes puntos de una célula de Purkinje (Ito, 2006; Ohtsuki et al., 2009; Piochon et al., 2010).

De este modo, las células de Purkinje reciben aferencias de las fibras musgosas y las trepadoras, cada una con diferentes características. Además, las señalizaciones dentro del cerebelo están influidas por numerosas interneuronas de carácter inhibitorio. Éstas son inervadas también por impulsos aferentes y sirven para aumentar la precisión de la señalización (Barmack y Yakhnitsa, 2008; Chu et al., 2012).

Eferencias

La corteza cerebelosa tiene la misma estructura en todo el cerebelo y carece de fibras de asociación que conecten las diferentes regiones (Ito, 2002b, 2006). Además, las células de Purkinje son las únicas que envían sus axones fuera de la corteza cerebelosa, constituyendo por lo tanto el único canal eferente. Éstas contienen GABA, por lo que inhiben a las neuronas con las cuales hacen sinapsis (De Zeeuw y Berrebi, 1995; Voogd et al., 1996; Husson et al., 2014).

La gran mayoría de los axones de las células de Purkinje terminan en los NCP (de hecho se denominan *fibras córtico-nucleares*; Jansen y Brodal, 1940; Haines y Koletar, 1979). Las neuronas

Introducción

de estos núcleos envían la información a los diversos destinos sinápticos del cerebelo. Los núcleos cerebelosos se encuentran encima del cuarto ventrículo, en la sustancia blanca, y se denominan:

- *Núcleo fastigio*
- *Núcleo dentado*
- *Núcleo interpuesto*, formado por:
 - Núcleo globoso
 - Núcleo emboliforme

Las conexiones córtico-nucleares están organizadas topográficamente, de forma que las fibras posteriores y anteriores de la corteza cerebelosa terminan en las zonas posteriores y anteriores de los núcleos respectivamente. Por otro lado, cada uno de los núcleos envía sus proyecciones a regiones encefálicas separadas y específicas (Haines y Koletar, 1979; Umetani et al., 1986; Voogd y Ruigrok, 2004).

El número de células de Purkinje es ampliamente mayor que el de neuronas en los núcleos cerebelosos. Por ello, se produce una convergencia de información en estos últimos del orden de 30 a 1 (Voogd et al., 1996). Las células de estos núcleos tienen actividad espontánea y dado que las células de Purkinje son de naturaleza inhibitoria (GABAérgica), dicha actividad espontánea es un requisito previo para que la información de la corteza cerebelosa se transmita (un aumento en la actividad de las células de Purkinje disminuye la tasa de disparo de las células nucleares; Garin y Escher, 2001; Studler et al., 2002). En este sentido, se considera que las células de los núcleos cerebelosos profundos tienen propiedades de marcapasos (Ovsepian et al., 2013). Además, hay que tener en cuenta que algunas de las proyecciones que terminan en la corteza cerebelosa (como las proyecciones espino-cerebelosas y olivo-cerebelosas) envían colaterales (excitatorias) a los núcleos cerebelosos, las cuales son excitatorias (Shinoda et al., 2000; Voogd et al., 2003).

Cualquier cambio en las células de Purkinje produce un cambio inmediato en la actividad de las células nucleares. Así, las proyecciones desde los núcleos cerebelosos reflejan con una alta precisión temporal cualquier pequeño cambio que llegue a la corteza cerebelosa (De Zeeuw et al., 2011; Witter et al., 2013). Además, los hemisferios cerebelosos influyen en la misma mitad del cuerpo, es decir sus proyecciones son ipsolaterales (Haines y Koletar, 1979; Small et al., 2002).

Funciones del cerebelo

La principal función del cerebelo se relaciona con la respuesta motora. En este sentido, el cerebelo sería el principal centro de coordinación del movimiento, mantenimiento de la postura y del aprendizaje motor (Ito, 2002b, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007; Galliano et al., 2013). Como ya

Introducción

hemos visto, las aferencias recibidas por el cerebelo provienen principalmente del sistema vestibular (esencial para el mantenimiento de la postura), husos neuromusculares, órganos tendinosos, mecanorreceptores e interneuronas de la médula espinal (que informan al cerebelo de la situación en la que se encuentra el cuerpo) y de la corteza cerebral (para coordinar los movimientos en base a la situación del propio cuerpo). Es por ello que la principal función del cerebelo -y hasta hace poco considerada como la única- es la coordinación y aprendizaje de movimientos (Bell, 2002; Ito, 2002a; Boyden et al., 2004; Bell et al., 2008; Hibi y Shimizu, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas han ido surgiendo cada vez más datos que hacen dudar de la exclusividad de esta función. La primera evidencia sobre la posible implicación del cerebelo en funciones no motoras vino de la mano de la electrofisiología. De este modo, se observó que la activación del núcleo fastigio activa a su vez neuronas del hipocampo, y viceversa (Newman y Reza, 1979). Posteriormente se ha observado que diferentes patologías no asociadas a déficits motores tienen también afectaciones en la función cerebelosa. Por ejemplo, diferentes estudios de neuroimagen de pacientes con autismo han demostrado que éstos tienen alteraciones tanto morfológicas como funcionales del cerebelo. Entre otros aspectos, estos déficits en la función cerebelosa se han relacionado con trastornos de la comunicación y de la interacción social (Fatemi et al., 2002; Schmahmann, 2004; Tavano et al., 2007; Ito, 2008). También se ha observado en estudios postmórtem que personas diagnosticadas de autismo tienen una densidad de células de Purkinje menor que la normal (Palmen et al., 2004; Whitney et al., 2008; Yip et al., 2008; White y Sillitoe, 2013). Asimismo, en pacientes con esquizofrenia se han observado alteraciones de la actividad cerebelosa al realizar diferentes tareas cognitivas mediante pruebas de neuroimagen (Levitt et al., 1999; Andreasen y Pierson, 2008; Picard et al., 2008).

Con la intención de dilucidar la implicación del cerebelo en las tareas cognitivas, se han llevado a cabo en los últimos años diferentes estudios con modelos animales. Estos modelos animales son tremendamente variados, al igual que lo que sucede con los realizados en humanos. Sin embargo, dado que en gran medida las diferentes tareas cognitivas usadas con pacientes o con animales de experimentación tienen un componente motor, es difícil discernir la influencia que tiene el cerebelo en la actividad cognitiva en sí misma de la que influye en la articulación motora. No obstante, cabe destacar el estudio de (Galliano et al., 2013) en el que se alteran contactos sinápticos puntuales de las células de Purkinje de ratones mediante modificaciones genéticas: al eliminar funcionalmente sinapsis específicas por separado no observaron en ningún caso cambios significativos en tareas cognitivas.

Algunas alteraciones cognitivas relacionadas con el cerebelo se sabe que tienen su base en procesos celulares muy determinados. Por ejemplo, se ha demostrado la existencia de alteracio-

nes de los microtúbulos de las neuronas cerebelosas tanto en modelos animales como humanos con enfermedades psiquiátricas. Efectivamente, se ha observado que la eliminación del complejo proteico TSC1/TSC2, implicado en el transporte microtubular (Jiang y Yeung, 2006), produce alteraciones cognitivas asociadas al autismo con una importante afectación cerebelosa (Tsai et al., 2012). Del mismo modo, la eliminación de la proteína asociada a los microtúbulos 6 (MAP6 o STOP³) en ratones produce alteraciones asociadas a la esquizofrenia (Andrieux et al., 2002; Volle et al., 2013; Daoust et al., 2014), así como alteraciones en el cerebelo (Eastwood et al., 2007). Por otro lado, se ha observado en tejido postmórtem de pacientes con esquizofrenia alteraciones en proteínas asociadas a los microtúbulos (SNAP-25), en este caso relacionadas con la actividad sináptica (Mukaetova-Ladinska et al., 2002).

Como veremos más adelante con mayor precisión, se ha descrito en los últimos años que los microtúbulos pueden ser modificados por la propia actividad de las neuronas (Rakic et al., 1996; Manent et al., 2005). Y más precisamente, el sistema endocannabinoide se ha relacionado con el crecimiento axonal y la estabilidad de los microtúbulos (Bento-Abreu et al., 2007).

Otras funciones del cerebelo

Como acabamos de indicar, han ido surgiendo numerosos datos que cuestionan la idea de una función exclusivamente motora del cerebelo. Los primeros indicios surgen en la década de los '60 con el descubrimiento del tracto cerebro-cerebeloso (Evarts y Thach, 1969; Kemp y Powell, 1971). Posteriormente, se observó que la actividad electrofisiológica del cerebelo evocaba potenciales de acción en las neuronas hipocampales, lo que sucedía también en sentido contrario (Newman y Reza, 1979). Ya en la década de los '80 y los '90, la aparición de las técnicas de neuroimagen supuso un gran avance en la comprensión de la función de diferentes estructuras en tareas cognitivo/afectivas. Empleando estas técnicas, diferentes estudios clínicos han demostrado que en sujetos normales hay una activación cerebelosa durante la realización de ese tipo de tareas (ver **Fig. 5**; Petersen et al., 1988; Kim et al., 1994; Weis et al., 2004). Al mismo tiempo, la mejora en las técnicas de trazado ha permitido demostrar la conexión del cerebelo con la corteza prefrontal (Kelly y Strick, 2003). Precisamente esta estructura se ha relacionado con la integración sensorial y la planificación de comportamientos complejos (Siddiqui et al., 2008). Por otro lado, diferentes trastornos psiquiátricos se han relacionado con alteraciones cerebelosas, como la esquizofrenia, los trastornos de tipo autista y el síndrome de Niemann-Pick (Armstrong, 2001; Joseph et al., 2002; Walkley y Suzuki, 2004; Bauman y Kemper, 2005; Andreasen y Pierson, 2008).

³ Del inglés *Stable Tubule-Only Polypeptide*

Introducción

Estos estudios han demostrado que la actividad cerebelosa de sujetos diagnosticados con dichas enfermedades está alterada al realizar tareas cognitivo/afectivas. Es más, una de las alteraciones descrita más ampliamente en sujetos con trastornos de tipo autista es la disminución de la densidad de células de Purkinje del cerebelo (Bauman y Kemper, 2005). Todos estos datos han llevado a diversos autores a considerar el cerebelo como una estructura esencial en la integración y procesamiento de información cognitivo/afectiva. Así, en 1998 los Dres. Schmahmann y Sherman propusieron que el cerebelo tendría un papel esencial en la coordinación de respuestas de tipo cognitivo y afectivo, acuñando el término “síndrome cognitivo-afectivo cerebeloso” para aquellas patologías en las que las alteraciones cerebelosas fueran la causa de defectos cognitivo/afectivos (Schmahmann y Sherman, 1998; Schmahmann, 2001).

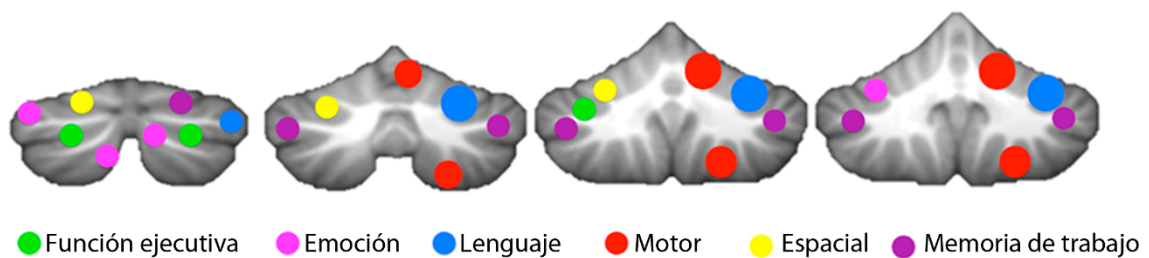


Figura 5: Cortes coronales del cerebelo en los que se puede observar la distribución topográfica de la actividad cerebelosa durante la realización de diferentes tareas cognitivo/afectivas, de acuerdo con técnicas de neuroimagen funcional. Modificado de Bernard y Mittal, 2014.

Sin embargo, los estudios con modelos animales no han conseguido determinar concretamente la relación entre el cerebelo y los procesos cognitivos. Aunque diferentes estudios animales han determinado la conectividad del cerebelo con estructuras relacionadas con la función cognitiva (Newman y Reza, 1979; Kelly y Strick, 2003), muy pocos han conseguido dilucidar una relación puramente funcional entre el cerebelo y la cognición. Una de las principales limitaciones encontradas en este tipo de estudios ha sido la dificultad a la hora de aislar las alteraciones cerebelosas de las ocurridas en otras estructuras (Lalonde y Strazielle, 2003; Sacchetti et al., 2004). No obstante, las nuevas técnicas de ingeniería genética han abierto un nuevo camino en el estudio de la función cerebelosa. Así, se ha visto que alteraciones genéticas concretas de las células de Purkinje del cerebelo inducen su muerte y un comportamiento de tipo autista en ratones (Tsai et al., 2012). Por otra parte, las alteraciones específicas en conexiones sinápticas recibidas por las células de Purkinje no parecen alterar el comportamiento no motor (Galliano et al., 2013). Por tanto, parece que para alterar el comportamiento cognitivo serían necesarias alteraciones diferentes a aquéllas que afectan exclusivamente a la entrada de información en las células de Purkinje.

Además, tanto los estudios clínicos como preclínicos realizados al respecto se han llevado a cabo exclusivamente una vez que las alteraciones cerebelosas han tenido lugar (Martin et al., 2003; Porrás-García et al., 2005; Tsai et al., 2012), lo que dificulta entender la posible relación entre alteraciones cerebelosas y trastornos cognitivo/afectivos. Es más, la comprensión de cómo el progreso de dichas alteraciones afecta de manera gradual a la función cognitiva permitiría entender la relación entre los diferentes elementos del cerebelo con diferentes tareas de tipo no motor. Por ello, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral ha sido analizar este progreso en un modelo animal de degeneración cerebelosa selectiva, que describiremos en detalle más adelante.

Desarrollo de la corteza cerebelosa

El desarrollo del cerebelo del ratón es bastante temprano, una vez diferenciado el metencéfalo. Es en ese momento cuando se inician los primeros pasos para la formación de los hemisferios cerebelosos y el vermis (Sotelo, 2004; Hibi y Shimizu, 2012; White y Sillitoe, 2013). Aunque los primeros precursores neuronales comienzan a formarse durante el periodo embrionario, en algunos casos este proceso se mantiene de forma postnatal, tal y como veremos más adelante (Sotelo, 2004; White y Sillitoe, 2013). De este modo, las primeras neuronas en formarse corresponden a las de los NCP, las cuales provienen de los labios rómbicos y de la zona ventricular. Esta diferencia en el origen de las neuronas de los NCP va a determinar posteriormente el tipo de migración, tangencial o radial, respectivamente. Posteriormente comienzan a formarse las células de Purkinje, los granos y finalmente las interneuronas de la capa molecular (células estrelladas y en cesto). Al mismo tiempo que se van formando los diferentes tipos neuronales, se produce la llegada de las fibras musgosas y trepadoras (Sillitoe y Joyner, 2007; Sudarov y Joyner, 2007; Kaneko et al., 2011; Fujishima et al., 2012). El proceso de migración de las neuronas del cerebelo se produce principalmente de forma postnatal. De este modo, no es hasta alrededor de los 20 días postnatales (P20) cuando el cerebelo alcanza ya prácticamente su conformación adulta (ver **Fig. 6**; White y Sillitoe, 2013).

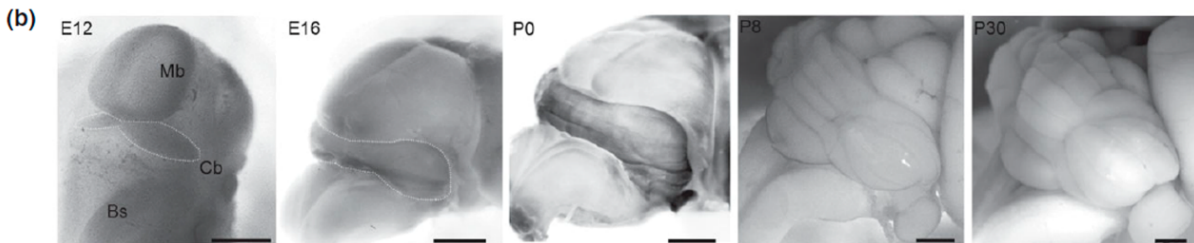
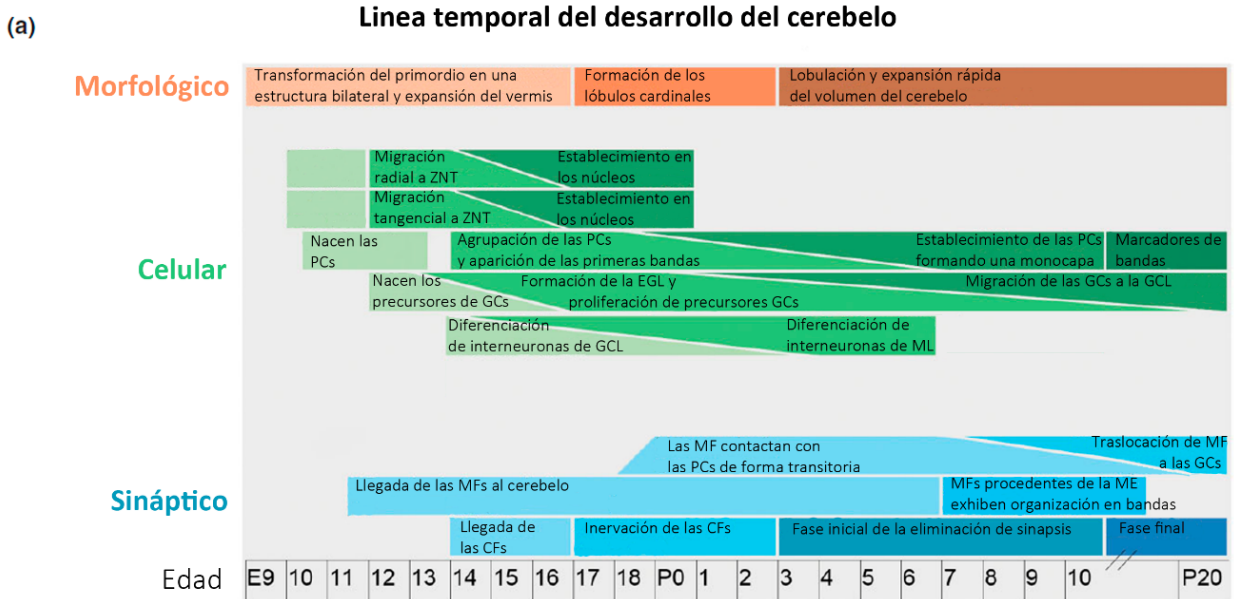


Figura 6: Línea temporal del desarrollo del cerebelo. a) Esquema indicativo de los principales eventos morfológicos, celulares y sinápticos en el desarrollo del cerebelo. b) Desarrollo externo del cerebelo desde estadios embrionarios hasta su completa formación en el ratón adulto. Nótese la formación progresiva de lóbulos y circunvoluciones. CFs: Fibras trepadoras; EGL: Capa granular externa; GCs: Granos; MF: Fibras musgosas; ML: Capa molecular; PCs: Células de Purkinje; ZNT: Zona nuclear transitoria. Modificado de White y Sillitoe, 2013.

Desarrollo macroscópico

El desarrollo de la corteza cerebelosa comienza de forma prenatal, iniciándose con la delimitación de la estructura macroscópica, es decir los dos hemisferios y el vermis. Esta división comienza a partir de los 9 días de desarrollo embrionario (E9), extendiéndose hasta E17, momento en el que comienzan a establecerse los lóbulos cardinales a partir de las fisuras primarias (Sudarov y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013). Este proceso termina a los pocos días del nacimiento. A partir de este momento se inicia la formación de los diferentes lóbulos del cerebelo. Éstos se forman a partir de los lóbulos cardinales, concretamente a raíz de la formación de fisuras que dividirán dichos lóbulos (Sudarov y Joyner, 2007). Todo ello desencadena un crecimiento rápido del cerebelo.

Desarrollo neuronal y sináptico

Poco después de comenzar la delimitación anatómica del cerebelo, en torno a E10, empiezan a formarse los primeros precursores neuronales en el rombómero 1, que posteriormente darán lugar a los diferentes tipos neuronales del cerebelo (White y Sillitoe, 2013). Las primeras neuronas en formarse son las pertenecientes a los NCP, y posteriormente comienza la formación de las células de Purkinje, alrededor de E12. Una vez formadas, las células de Purkinje comienzan el proceso de migración con el objetivo de ubicarse en lo que posteriormente será la capa de las células de Purkinje, que se forma completamente como una mono-capa alrededor de P7. La migración de las células de Purkinje es de tipo radial, y es guiada por la glía de Bergmann, que determinará la posición final de estas neuronas (Morales y Hatten, 2006). A esta misma edad las interneuronas de la capa molecular terminan de diferenciarse y comienza la migración de los granos, cuyos precursores se localizan en la capa granular externa, una lámina ubicada por encima de la capa molecular (White y Sillitoe, 2013). De este modo, gran parte del desarrollo del cerebelo se produce de forma postnatal.

Durante las dos primeras semanas de desarrollo postnatal el cerebelo adquiere su forma adulta, formándose las tres capas de la corteza cerebelosa (Sotelo, 2004; Sudarov y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013). Todo este proceso está perfectamente sincronizado ya que al tiempo que las células de Purkinje desarrollan y extienden su árbol dendrítico a lo largo de la capa molecular, la capa granular externa va disminuyendo su espesor hasta desaparecer alrededor de P15 (Sotelo, 2004; Sudarov y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013). Esto implica que la migración de los granos desde la capa granular externa hasta la capa de los granos está íntimamente relacionada con el propio desarrollo de las células de Purkinje, tal y como puede observarse en la **Fig. 7**.

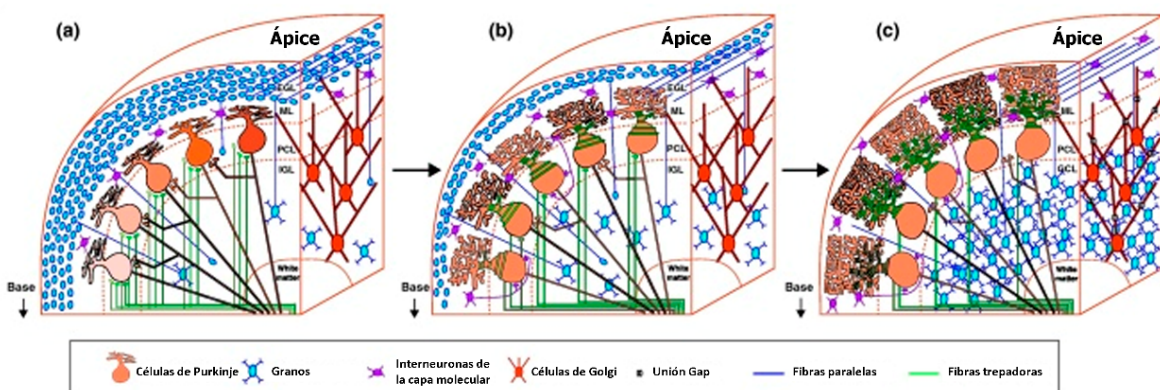


Figura 7: Representación del desarrollo de la corteza cerebelosa: a) primera semana post-natal; b) segunda semana post-natal; c) adulta. Puede observarse cómo a medida que se desarrolla la arborización dendrítica de las células de Purkinje la capa molecular crece al unísono, mientras que la capa granular externa va desapareciendo. Asimismo, los precursores de los granos van migrando desde la capa granular externa. Modificado de Van Welie et al., 2011.

Introducción

A partir de P21, una vez que todas las neuronas del cerebelo se han formado y posicionado en la corteza cerebelosa, comienza la fase final de la sinaptogénesis. Durante este periodo, que finaliza alrededor de P40, se produce una remodelación de las sinapsis del cerebelo. Este proceso conlleva no sólo la formación de nuevos contactos neuronales, sino también, y en mayor medida, la eliminación de otras sinapsis (Kohsaka et al., 1988; Hamori et al., 1997; White y Sillitoe, 2013). En este sentido, las células de Purkinje inicialmente son invadidas por varias fibras trepadoras, pero durante el desarrollo algunas de las sinapsis van perdiendo fuerza lo que lleva a la desaparición de dichos contactos sinápticos (Hashimoto y Kano, 2005; Kaneko et al., 2011; Fujishima et al., 2012). Finalmente, casi todas las fibras trepadoras que contactaban con una célula de Purkinje desaparecen, quedando únicamente un contacto sináptico entre una única fibra trepadora con una célula de Purkinje (Kaneko et al., 2011; Fujishima et al., 2012). Todo esto implica no sólo la remodelación de las sinapsis, sino que en el caso de las células de Purkinje, también se produce una remodelación de su árbol dendrítico (McKay y Turner, 2005; Kaneko et al., 2011).

EL RATÓN MUTANTE PCD

Los modelos animales constituyen una herramienta esencial para el estudio de diferentes enfermedades humanas, tales como la neurodegeneración, así como para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas. Los avances producidos en Biomedicina en el último siglo han permitido generar modelos cada vez más específicos de prácticamente todas las enfermedades humanas, ya sea induciendo dichas enfermedades farmacológicamente o a través de modificaciones genéticas. No obstante, los modelos inducidos suelen estar dirigidos a la comprensión de un aspecto específico de dichas enfermedades, como la función de una proteína concreta, una enzima, un gen, etc. Por esta razón, los modelos no inducidos, es decir, aquellos modelos animales que surgen de manera espontánea y natural, y mimetizando alguna enfermedad, son esenciales para una comprensión global de todas estas patologías.

El ratón mutante PCD (*Purkinje Cell Degeneration*), es un modelo animal de neurodegeneración cerebelosa que apareció de forma espontánea en los años 70 (Mullen et al., 1976). Aunque la mutación *pcd* afecta a diferentes tipos neuronales del SNC, es la degeneración de las células de Purkinje del cerebelo la que causa un fenotipo más llamativo, caracterizado por una ataxia muy severa (Mullen et al., 1976; Wang y Morgan, 2007). Es por ello que el ratón mutante PCD destaca como un excelente modelo para el estudio de procesos neurodegenerativos y de ataxia cerebelosa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la degeneración cerebelosa comienza a edades muy tempranas, cuando el cerebelo está finalizando su desarrollo, y que se produce de manera aisla-

da, es decir, sin afectación conocida de otras estructuras al mismo tiempo (Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2011a). Por tanto, el ratón PCD destaca también como un excelente modelo para el estudio de trastornos del desarrollo en el cerebelo.

Mutación *pcd*

La mutación *pcd* surgió de manera espontánea en la estirpe C57BR/cdj del ratón (*Mus musculus* L. 1758; Mullen et al., 1976; Wang y Morgan, 2007). Esta mutación se localiza en el cromosoma 13 del ratón y se define como autosómica recesiva, afectando al gen *Nna1*⁴/*Agtpbp1*⁵ (Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002). Este gen codifica la proteína NNA1/CCP1⁶ (proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía/carboxipeptidasa citosólica 1), que se ha asociado con procesos de diferenciación y regeneración axonal (Harris et al., 2000), y su localización es tanto citoplasmática como nuclear (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002). El gen *Nna1/Agtpbp1* se describió inicialmente como un gen cuya expresión se induce por la axotomía de motoneuronas y de ahí su nombre. Además, dado que el pico de expresión del gen *Nna1* se produce al tiempo que se ponen en marcha los mecanismos de regeneración y reinervación axonal de las motoneuronas, se ha hipotetizado que su función podría estar relacionada con procesos de regeneración axonal (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002).

Los mecanismos de acción de la proteína sintetizada por el gen *Nna1* eran hasta hace poco desconocidos. Recientemente se ha demostrado la implicación de la proteína sintetizada a partir del gen *Nna1*, la proteína CCP1, en las modificaciones postraduccionales de los microtúbulos, concretamente en la des-poliglutamilación de la α -tubulina (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007; Rogowski et al., 2010). De este modo, parece ser que el proceso neurodegenerativo derivado de la mutación *pcd* está estrechamente relacionado con alteraciones en los microtúbulos, concretamente con un exceso de poliglutamilación. Durante el proceso de maduración neuronal se producen cambios estructurales en los microtúbulos (Faivre et al., 1985; Sakakibara et al., 2013). En este sentido, los microtúbulos tienden a ser más dinámicos y menos estables a lo largo del desarrollo neuronal, lo cual puede conferir a las neuronas una mayor plasticidad. Por el contrario, los microtúbulos tienden a ser más estables en neuronas maduras. De este modo, dado que la muerte de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD se produce al final del desarrollo de las mismas, es posible que la falta de des-poliglutamilación de los microtúbulos afecte a la dinámica de los mismos, y por tanto a su estabilidad.

⁴ Del inglés *Nervous system nuclear protein induced by axotomy 1*

⁵ Del inglés *ATP/GTP Binding Protein 1*

⁶ Del inglés *Cytosolic carboxypeptidase 1*

Introducción

Hasta el momento se han identificado al menos 11 tipos de mutaciones *pcd* (Tabla 1). La mutación original (*pcd^{1j}*) es la que muestra un fenotipo más severo (Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007). Salvo en la mutación *pcd^{5j}*, el ARN mensajero (ARNm) se encuentra alterado. Además, la mutación *pcd^{1j}* no presenta diferencias en la secuencia codificante del gen *Nna1*, por lo que se piensa que ésta puede estar afectando a una secuencia reguladora del gen (Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007).

La mutación *pcd* está localizada en el cromosoma 13 del ratón (Mullen et al., 1976), concretamente entre los microsatélites D13Mit157 y D13Mit167, correspondiente a un segmento genómico de $0,61 \pm 0,33$ megabases (Fernández-González et al., 2002).

Nombre alelo	Origen	Fenotipos y cambios morfológicos	Mutación genética en <i>nna1</i>
Agtpbp1^{pcd-1j}	Espontáneo	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje y los granos del cerebelo, degeneración de neuronas talámicas, degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo, degeneración de los fotorreceptores, infertilidad masculina (degeneración de los espermatozoides), fertilidad femenina parcial. ARNm y niveles de proteína muy bajos.	Región reguladora
Agtpbp1^{pcd-2j}	Espontáneo	Presunto alelo hipomórfico, con ataxia de inicio más lento y algunos casos de infertilidad masculina. Bajos niveles de ARNm y proteína.	Inserción de exones entre el 14 y el 15
Agtpbp1^{pcd-3j}	Espontáneo	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje y granos del cerebelo, degeneración de neuronas talámicas, degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo, degeneración de los fotorreceptores, infertilidad masculina (degeneración de los espermatozoides), fertilidad femenina parcial. ARNm de menor tamaño y sin proteína detectable.	Delección de los exones 7, 8 y 9
Agtpbp1^{pcd-4j}	Inducido químicamente	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo.	Desconocido
Agtpbp1^{pcd-5j}	Espontáneo	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, degeneración de los fotorreceptores, infertilidad masculina. Niveles normales de ARNm, pero niveles reducidos de la proteína debido a la inestabilidad de la misma.	Inserción de un codón de ácido aspártico en el exón 18
Agtpbp1^{pcd-6j}	Inducido químicamente	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo, degeneración de la raíz ventral de la médula espinal, degeneración de la retina; fibras musculares pequeñas, infertilidad masculina, degeneración de los espermatozoides, atrofia testicular.	Desconocido
Agtpbp1^{pcd-7j}	Espontáneo	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, audición anormal.	Desconocido
Agtpbp1^{pcd-8j}	Espontáneo	Ataxia, tamaño corporal reducido, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, morfología retiniana anómala, degeneración retiniana, infertilidad masculina, fertilidad femenina parcial y degeneración de los espermatozoides.	Desconocido
Agtpbp1^{pcd-JWG}	Transgénicos (interrupción génica al azar)	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo, degeneración de los fotorreceptores de la retina, en algunos casos infertilidad masculina, fertilidad femenina parcial y degeneración de los espermatozoides.	Desconocido
Agtpbp1^{pcd-bttr}	Inducido químicamente	Ataxia, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, degeneración de los fotorreceptores de la retina, infertilidad masculina y degeneración de los espermatozoides. ARNm anómalo y proteína trunca.	Cambio de base que provoca un salto del exón 11
Agtpbp1^{sid}	Espontáneo	Ataxia, tamaño corporal reducido, degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, infertilidad masculina, fertilidad femenina parcial y degeneración de los espermatozoides.	Producción de un codón de parada en el exón 8

Tabla 1: Resumen del origen, efectos y tipos de mutación de los alelos conocidos para la mutación *pcd*.

Efecto de la mutación *pcd*

La mutación *pcd* afecta principalmente a aquellas poblaciones neuronales que expresan la proteína NNA1/CCP1 (Fernández-González et al., 2002), especialmente las células de Purkinje (Mullen et al., 1976; Baltanás et al., 2011a), las células mitrales del bulbo olfativo (Mullen et al., 1976; Greer y Shepherd, 1982; Valero et al., 2006) y algunas neuronas de ciertos núcleos talámicos (O’Gorman y Sidman, 1985).

Aunque en todos estos casos la muerte neuronal se debe a la mutación del gen *Nna1*, el proceso de degeneración varía enormemente entre los diferentes tipos neuronales afectados. Así, mientras que el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje comienza muy temprano (P18) y es muy rápido (a P40 ya no hay células de Purkinje; Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2011a), no ocurre lo mismo con las células mitrales, cuya degeneración comienza a P60 y se prolonga hasta P100, quedando algún remanente de estas neuronas (Greer y Shepherd, 1982; O’Gorman y Sidman, 1985; Valero et al., 2006). Una de las hipótesis para la rápida muerte neuronal que afecta a las células de Purkinje en comparación con las células mitrales es la activación glial diferente que se produce en el cerebelo en relación al bulbo olfativo. En este sentido, se ha demostrado en nuestro laboratorio que existe una reacción glial mayor y una mayor liberación de mediadores pro-inflamatorios en el cerebelo que en el bulbo olfativo del ratón mutante PCD (Baltanás et al., 2013). Hay que tener en cuenta que la activación glial que se produce tras una lesión en el SNC, a pesar de ser esencial para su recuperación, también puede dificultarla si la reacción de la glía es exacerbada (Hansson y Rönnbäck, 2003). La actividad glial, principalmente de la microglía, durante los procesos neuroinflamatorios permite la eliminación de las neuronas muertas. Además, junto con la astrogliá, forma la denominada cicatriz glial, que evita que el daño se expanda a otras zonas del SNC (Hansson y Rönnbäck, 2003). Sin embargo, la propia formación de la cicatriz glial impide también que las neuronas que sobreviven a una lesión puedan volver a formar nuevos contactos sinápticos, ya que sus proyecciones no pueden sobrepasar dicha cicatriz (Hansson y Rönnbäck, 2003). Además, se ha observado que una reacción glial exacerbada puede aumentar también el proceso de muerte neuronal que se produce tras una lesión (Giaume et al., 2007).

También se ha observado la muerte de algunos granos en el cerebelo del ratón PCD, aunque ésta sería secundaria y podría deberse a la falta de inervación sináptica derivada de la muerte de las células de Purkinje (Chang y Ghetti, 1993; Triarhou, 1998; Wang y Morgan, 2007).

Tal y como ya se ha indicado, el proceso degenerativo del ratón mutante PCD se ve reflejado en el propio fenotipo del animal, siendo el efecto más llamativo y visible la ataxia severa que sufre

Introducción

(Mullen et al., 1976; Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2011a). Ésta se debe a la muerte de las células de Purkinje, ya que como comentamos en el capítulo anterior, la función principal del cerebelo es la coordinación de movimientos. No obstante, también se han observado alteraciones de otros comportamientos tales como la detección y discriminación olfativas (Díaz et al., 2014) o el reflejo de sobresalto (Parham et al., 2000), que derivan de la muerte de las células mitrales del bulbo olfativo y de las neuronas en rueda de carro del núcleo coclear dorsal, respectivamente.

El ratón mutante PCD como modelo de trastornos del desarrollo y alteraciones microtubulares

Tal y como veremos con mayor profundidad en el siguiente apartado, las modificaciones postraduccionales de los microtúbulos están íntimamente ligadas al correcto desarrollo neuronal (Andrieux et al., 2002; Kollins et al., 2009; Breuss y Keays, 2014). Estas modificaciones se expresan de forma diferencial en función del estado de desarrollo de las neuronas (Poulain y Sobel, 2010; Sakakibara et al., 2013). El ratón mutante PCD tiene una afectación de los procesos de despoliglutamilación de los microtúbulos (Rogowski et al., 2010), lo que hace que se presente como un buen modelo para el estudio del efecto de estas alteraciones en el desarrollo. En este sentido, ya que el proceso de muerte de las células de Purkinje sucede temporalmente al mismo tiempo que el proceso de remodelación sináptica, cabe esperar una relación entre ambos fenómenos, así como una alteración en la morfogénesis de las propias células de Purkinje.

LOS MICROTÚBULOS

Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto, compuesto, además, por filamentos intermedios y microfilamentos. Todo este conjunto de elementos que forma el citoesqueleto actúa como soporte para el mantenimiento de la propia estructura neuronal. Por su parte, los microtúbulos han adquirido una relevancia especial por su relación con los procesos de transporte neuronal, así como por su dinámica compleja, como veremos mejor más adelante.

Los microtúbulos son estructuras tubulares que se forman a partir de la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la α - y la β -tubulina (**Fig. 8a**). Estos dímeros de tubulina se pueden encontrar tanto solubles en el citoplasma como polimerizados formando los propios microtúbulos. Los microtúbulos son estructuras polarizadas, es decir, con un extremo positivo (+) y otro negativo (-). Además, su estructura es extremadamente dinámica, experimentando periodos de polimerización (en los cuales dímeros de la α - y β -tubulina del citoplasma se ensamblan) y despolimerización (desensamblaje de dímeros de tubulina), ambos en el extremo positivo (+). Esta coexistencia de procesos de polimerización y despolimerización en el extremo (+) de los microtú-

Introducción

bulos constituye la denominada *inestabilidad dinámica* (**Fig. 8b**) (Poulain y Sobel, 2010; Sakakibara et al., 2013). Durante esta inestabilidad dinámica, los periodos de crecimiento de los microtúbulos (polimerización) pueden cambiar a decrecimientos rápidos (despolimerización) de los mismos, proceso denominado como *catástrofe* (Gardner et al., 2013). Asimismo, esta catástrofe puede pasar de nuevo a un periodo de crecimiento, proceso denominado como *recuperación* (Akhmanova y Steinmetz, 2008; Conde y Cáceres, 2009; Gardner et al., 2013).

Aunque inicialmente el proceso de catástrofe se consideraba como un evento de un único paso y aleatorio, hoy en día está ampliamente aceptado que es un proceso que requiere múltiples eventos. De este modo, los procesos de polimerización/despolimerización están regulados por otros elementos, tales como proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs⁷), proteínas de ruptura de los microtúbulos (espastina y katanina) y proteínas motoras (kinesinas y dineínas; Akhmanova y Steinmetz, 2008; Conde y Cáceres, 2009; Gardner et al., 2013).

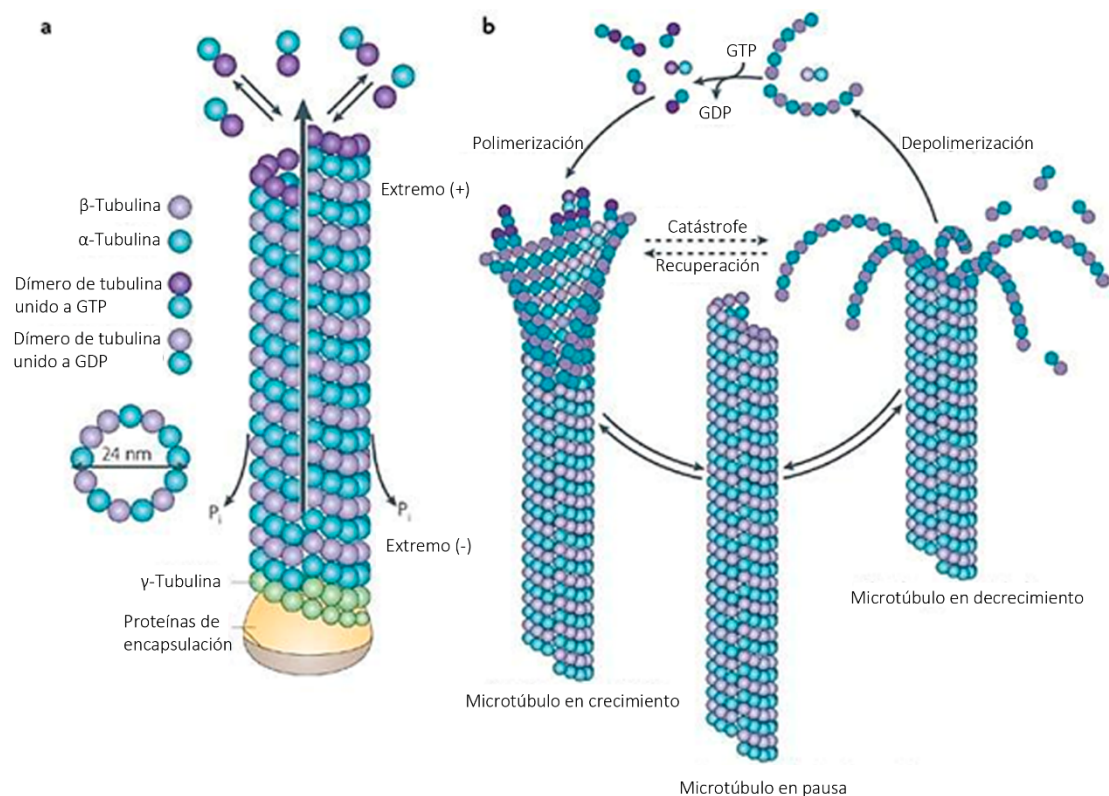


Figura 8: Esquema que representa la estructura de los microtúbulos (a) y su dinámica (b). Modificado de Conde y Cáceres, 2009.

⁷ Del inglés *Microtubules Associated Proteins*

Introducción

Hay que tener en cuenta que la unión de estas proteínas a los microtúbulos puede depender de las propias modificaciones postraduccionales de los mismos, siendo las más importantes: acetilación, poliglicinación, poliglutamilación y tirosinación (**Fig. 9**; Westermann y Weber, 2003; Janke y Kneussel, 2010; Wloga y Gaertig, 2010). Se ha sugerido que estas modificaciones pueden alterar la unión y la función de las diferentes proteínas asociadas a los mismos (Janke y Kneussel, 2010).

En condiciones basales, estas modificaciones resultan en una mayor diversidad de los microtúbulos, tanto estructural como funcional. Las modificaciones postraduccionales afectan principalmente al dominio carboxi-terminal (C-terminal) de α - y β -tubulina (**Fig. 9a**) y consisten en la adición o eliminación de residuos de distinta naturaleza a las tubulinas de los microtúbulos, en la mayor parte de los casos de forma reversible (ej.: tirosinación/destirosinación; Westermann y Weber, 2003):

- *Acetilación*: La acetilación de la α -tubulina se produce en el residuo Lys-40 de la α -tubulina, siendo la única modificación postraduccional que no se produce en el extremo C-terminal (ver **Fig. 8**). El proceso de acetilación ocurre una vez que los dímeros solubles de α - y β -tubulina se han unido a los microtúbulos (Webster y Borisy, 1989; Westermann y Weber, 2003). Además, los microtúbulos acetilados se consideran más estables que aquéllos no acetilados (Piperno et al., 1987; Asthana et al., 2013).
- *(Poli)glicinación*: A diferencia de lo que sucede con la acetilación, la poliglicinación se produce en el extremo C-terminal, y consiste en la adición de una cadena de glicina. Puede ocurrir tanto antes como después de que los dímeros de α - y β -tubulina se hayan unido a los microtúbulos, aunque la poliglicinación del *pool* de tubulina citoplasmática es bastante discreta (Westermann y Weber, 2003; Walsh et al., 2005).
- *(Poli)glutamilación*: Consiste en la unión de una cadena de poliglutamato al extremo C-terminal. Aunque no se trata de una modificación muy frecuente, se puede encontrar especialmente en los axones de neuronas. En este sentido, recientemente se ha descubierto que la falta de una de las enzimas que llevan a cabo la poliglutamilación de los microtúbulos, la CCP1, es responsable del proceso neurodegenerativo del ratón mutante PCD (Westermann y Weber, 2003; Rogowski et al., 2010).
- *Tirosinación*: La tirosinación es una de las modificaciones postraduccionales de los microtúbulos estudiada con más detalle. Consiste en la unión de un residuo de tirosina al extremo terminal de la α -tubulina, pero no de la β -tubulina. Algunos estudios han relacionado los microtúbulos más estables y longevos con microtúbulos destirosinados, aunque

Introducción

la destirosinación *per se* no confiere estabilidad a los mismos (Khawaja et al., 1988; Peris et al., 2009). Una vez destirosinada, las tubulina puede transformarse en $\Delta 2$ -tubulina tras la eliminación del penúltimo residuo de glutamato de la α -tubulina; este proceso es irreversible. La destirosinación de la tubulina se produce preferentemente tras la polimerización de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina a los microtúbulos, e influye en la unión de MAPs. Asimismo, se ha observado que la inyección de líneas celulares deficientes en la expresión de TTL⁸ (enzima encargada de la adición de tirosina a la α -tubulina) origina tumores en ratones (Westermann y Weber, 2003).

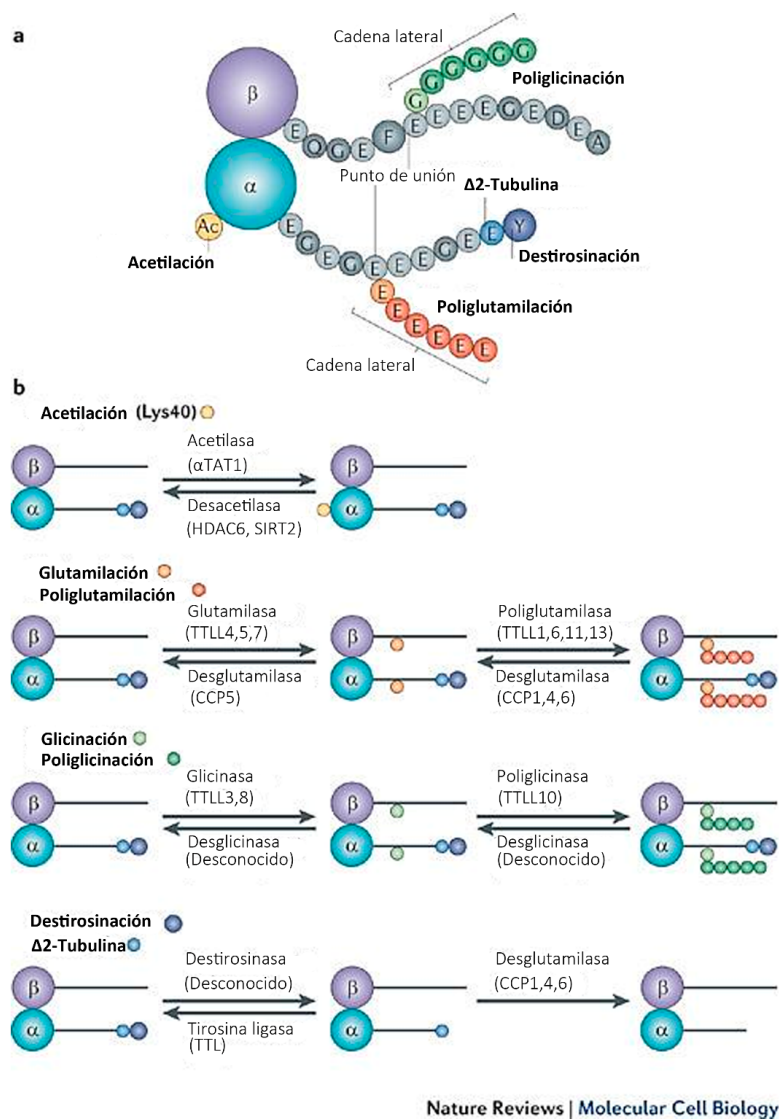


Figura 9: Representación de las principales modificaciones postraduccionales de los microtúbulos. a) Representación general de las modificaciones en las proteínas de α - y β -tubulina. b) Representación de los procesos de adición y eliminación de residuos en la α - y β -tubulina, así como de las enzimas implicadas en ambos procesos. Modificado de Janke y Chloë Bulinski, 2011.

⁸ Del inglés *Tubulin Tyrosine Ligase*

Introducción

Todas estas modificaciones en la estructura de los microtúbulos afectan a la propia funcionalidad de los mismos, y por consiguiente a la funcionalidad celular (Peris et al., 2009; Janke y Kneussel, 2010; Janke y Chloë Bulinski, 2011). En lo referente a la unión de las MAPs o las proteínas motoras a los microtúbulos, no es del todo conocido cómo pueden influir las diferentes modificaciones postraduccionales. Aun así, recientemente se ha demostrado que la motilidad de la kinesina-1 se ve incrementada con la poliglutamilación de la β -tubulina, y que por el contrario, la kinesina-2 requiere la destirosinación de la α -tubulina. Por el contrario, estas mismas alteraciones de los microtúbulos no parecen afectar a la motilidad de las dineínas (Sirajuddin et al., 2014). Del mismo modo, se ha observado que el aumento en la acetilación, la destirosinación y la poliglutamilación disminuye la selectividad de la kinesina-1, y en el caso de las neuronas se produce la formación de múltiples axones (Hammond et al., 2010). También se ha observado un incremento en la selectividad de la unión de dineínas en microtúbulos acetilados (Janke y Kneussel, 2010).

Microtúbulos y neuronas

Como elementos fundamentales del citoesqueleto de las células, los microtúbulos son esenciales en la morfogénesis de las mismas. En las neuronas el proceso de morfogénesis y desarrollo se inicia con la polarización de las mismas, es decir, inicialmente con la diferenciación del axón y posteriormente de las dendritas (Arimura y Kaibuchi, 2007). Asimismo, la polaridad neuronal va a determinar la distribución de los microtúbulos en relación a los extremos (+) y (-). En este sentido, los axones y las dendritas secundarias tienen una distribución unipolar de los microtúbulos, mientras que las dendritas primarias tienen una distribución mixta de los mismos (Burton y Paige, 1981; Baas et al., 1988; Hirokawa y Takemura, 2005; Hirokawa et al., 2010). Esto significa que el extremo (+) de los microtúbulos se localiza en la parte más distal de los axones y las dendritas secundarias, mientras que en las dendritas primarias el extremo (+) o (-) se localiza indistintamente en su parte más proximal o distal al soma.

La distribución de los microtúbulos en base tanto a su propia polaridad como a la polaridad de las neuronas es esencial para el funcionamiento correcto de las mismas, ya que determina la direccionalidad del transporte neuronal a lo largo de los microtúbulos. Dicho transporte puede ser de dos tipos: *anterógrado*, del extremo (-) al (+), y *retrógrado*, del extremo (+) al (-). Estos dos tipos de transporte se llevan a cabo por dos familias de proteínas diferentes: las kinesinas llevarían a cabo el transporte anterógrado, y las dineínas el transporte retrógrado (Hirokawa y Takemura, 2005). Sin embargo, tal y como se ha indicado anteriormente, la actividad de estas proteínas motoras puede verse alterada por las diferentes modificaciones postraduccionales de los microtúbulos (Sirajuddin et al., 2014). De este modo, los microtúbulos no solamente permiten el

desarrollo neuronal y su morfogénesis, sino que son esenciales para la propia supervivencia y funcionalidad de las neuronas. Durante el desarrollo, los microtúbulos alteran su estructura mediante las diferentes modificaciones postraduccionales, lo que se ve reflejado, por ejemplo, en el desarrollo de las células de Purkinje del cerebelo (Favre et al., 1985; Inagaki et al., 2001; Fukata et al., 2002; Witte y Bradke, 2008; Kollins et al., 2009; Li et al., 2010; Rogowski et al., 2010). Como se desarrollará en el capítulo siguiente, estas neuronas presentan un gran tamaño y morfología característica, con un árbol dendrítico que llega a ocupar un área de aproximadamente $5.000 \mu\text{m}^2$ en el ratón (Nedelescu y Abdelhack, 2013) y $14.000 \mu\text{m}^2$ en la rata (McKay y Turner, 2005) cuando son adultos. Esto permite que las células de Purkinje lleven a cabo cientos de miles de sinapsis con todos los tipos neuronales del cerebelo, para lo cual se necesita la formación de espinas dendríticas (Calabrese et al., 2006; Niesmann et al., 2011; Fortin et al., 2012). En este sentido, se calcula que una sola célula de Purkinje puede tener alrededor de 160.000 espinas dendríticas en la rata (Napper y Harvey, 1988). Todo este complejo entramado dendrítico y sináptico requiere la remodelación del citoesqueleto para poder formarse (ver **Fig.10**; Hering y Sheng, 2001; Nicholson-Dykstra et al., 2005; Kapitein et al., 2010).

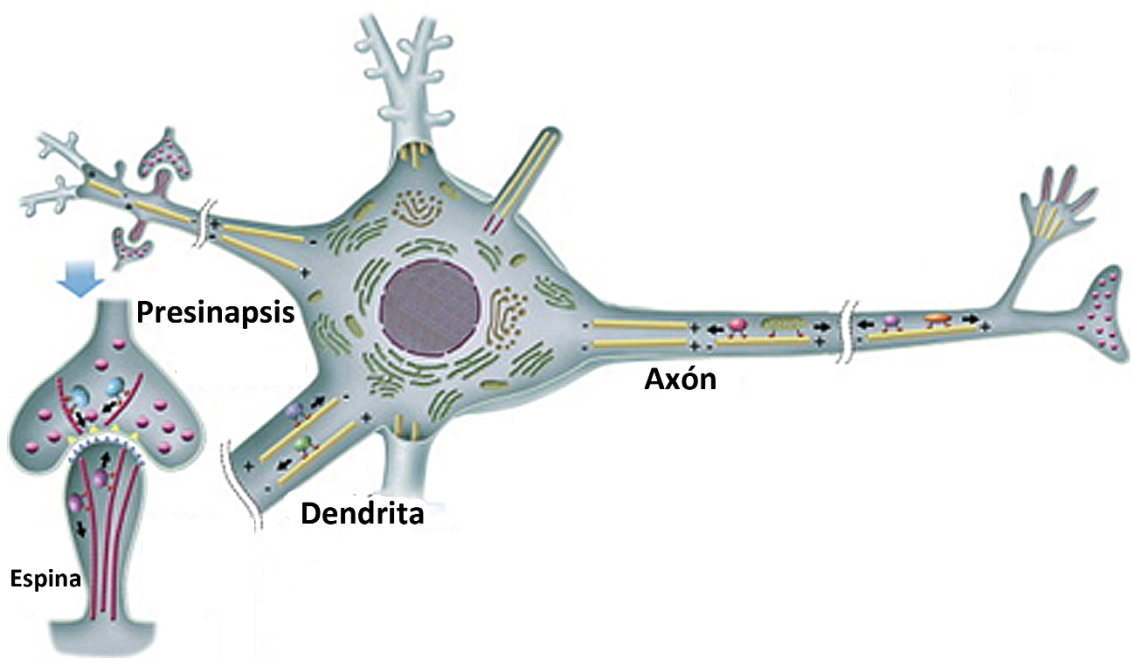


Figura 10: Esquema que representa cómo la polarización de los microtúbulos difiere en función de su localización interna en la neurona. De este modo, en los axones el extremo (+) se localiza en la parte distal, mientras que el extremo (-) se orienta hacia el soma. Por su parte, en las dendritas no existe una distribución tan definida, pudiéndose encontrar microtúbulos orientados en ambos sentidos. Modificado de Hirokawa et al., 2010.

Finalmente, las modificaciones que sufren los microtúbulos, así como su estabilidad y funciones, pueden verse afectadas por ciertas moléculas exógenas. Dichas moléculas adquieren especial relevancia en aquellos trastornos que precisamente afectan a la función del citoesqueleto.

LA N-OLEILETANOLAMINA COMO FÁRMACO NEUROPROTECTOR

Además de los ligandos (AEA y 2-AG) y receptores clásicos (CB1 y CB2), el sistema endocannabinoide está íntimamente relacionado con otros ligandos y receptores lipídicos. Como comentamos en capítulos anteriores, esto ha llevado a muchos autores a replantearse la concepción existente hasta el momento del sistema endocannabinoide, acotado hasta ahora a los receptores CB1, CB2 y sus ligandos (Sun y Bennett, 2007; De Petrocellis y Di Marzo, 2010). Entre todos ellos, la oleiletanolamida (OEA) y sus receptores diana, los receptores para proliferadores de peroxisomas subtipo α (PPAR α), son de especial interés para la presente Tesis Doctoral, tal y como veremos a continuación.

N-oleiletanolamina

La OEA es un ácido graso endógeno perteneciente a la familia de las NAEs, al igual que la AEA (ver más atrás). Funciona como un mediador lipídico sintetizado a demanda, en respuesta a diferentes estímulos, a partir de fosfolípidos de membrana (concretamente la *N*-oleil-fosfatidiletanolamida; Liu et al., 2006; Piomelli et al., 2007; Piomelli y Sasso, 2014). Esta relación en el proceso de biosíntesis con la AEA, así como el hecho de que ambas moléculas activen los receptores PPAR α (Göttlicher et al., 1992; Fu et al., 2003; Thabuis et al., 2008), ha hecho que se considere la OEA y estos receptores como elementos del sistema endocannabinoide (en la **Fig. 11** se puede ver un esquema de la síntesis y degradación de la OEA; Fu et al., 2003; Suardíaz et al., 2007; Thabuis et al., 2008).

Inicialmente el estudio de la OEA se enfocó al análisis de sus efectos anorexígenos (Guzmán et al., 2004; Lo Verme et al., 2005; Capasso y Izzo, 2008; Sarro-Ramírez et al., 2013). Sin embargo, recientemente se ha observado que su administración ejerce un efecto neuroprotector a través de la activación de los receptores PPAR α en modelos animales de Parkinson inducido farmacológicamente (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014). Además hay que tener en cuenta que la OEA puede ser sintetizada endógenamente en el SNC por neuronas y células gliales (Walter et al., 2002).

También se ha observado que la activación de los receptores PPAR α reduce la respuesta neuroinflamatoria (Lee et al., 2005; Bright et al., 2008; Maroof et al., 2013). En este sentido, la propia administración de agonistas de los receptores PPAR α produce un aumento en la expresión de los mismos (Fan et al., 2014). Por otro lado, se sabe que la OEA, a través de la activación de los receptores PPAR α , aumenta la expresión de MAP-2 y GAP43 (Bento-Abreu et al., 2007), dos proteínas asociadas a los microtúbulos relacionadas con la estabilidad de los mismos (Gamblin et al.,

1996; Al-Bassam et al., 2002) y el crecimiento neurítico (Neve et al., 1998; Leu et al., 2010), respectivamente.

De este modo, aunque la OEA puede unirse a diferentes tipos de receptores, es su actividad a través de los receptores PPAR α la que mayor relevancia tiene como agente neuroprotector y estabilizador de los microtúbulos.

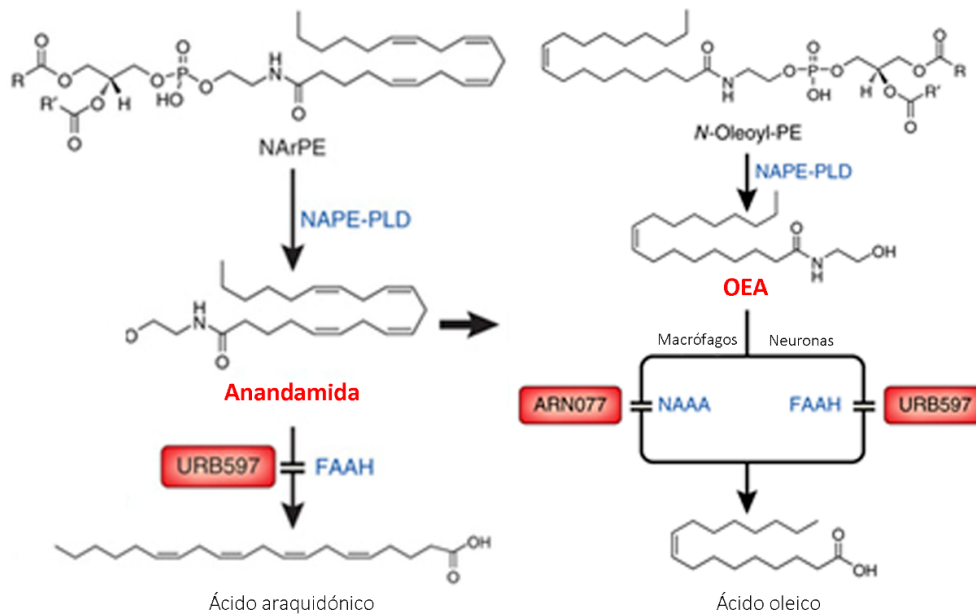


Figura 11: Esquema que muestra la síntesis y degradación de la AEA y la OEA. Obsérvese como en la síntesis y degradación de ambas moléculas intervienen las mismas enzimas: *N*-acil-fosfatidiletanolamina fosfolípasa D (NAPE-PLD) y la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Sin embargo, en macrófagos la OEA puede ser degradada por la amidasa ácida de la *N*-acil-etanolamina (NAAA). URB597: inhibidor selectivo de la FAAH; ARN077: inhibidor selectivo de la NAAA. Modificado de Piomelli y Sasso, 2014.

Receptores PPAR α

Los receptores PPAR α pertenecen a la familia de receptores nucleares y actúan como factores de transcripción. Se han relacionado habitualmente con la regulación de la homeostasis energética (Tyagi et al., 2011). Fueron clonados por primera vez 1990 como receptores de hormonas esteroideas (Issemann I, 1990), siendo sus ligandos naturales ciertas moléculas de carácter lipídico, concretamente de la familia de los eicosanoides (Yu et al., 1995; Kliewer et al., 1997). Una vez que el ligando se une a los receptores PPAR α , éstos forman un heterodímero con los receptores X

Introducción

de ácido retinoico (RXR), el cual se une a la secuencia PPRE⁹ presente en los genes diana (Juge-Aubry et al., 1997; Kliewer et al., 1999; Brown y Plutzky, 2007; Tyagi et al., 2011).

A pesar de la importancia de sus ligandos como agentes anorexígenos debido a la actividad de los receptores PPAR α como reguladores de la homeostasis energética, su actividad en SNC no se ha comenzado a estudiar hasta hace relativamente poco. Como se ha indicado anteriormente, parte del interés suscitado por estos receptores se debe principalmente a su relación con el sistema endocannabinoide y su efecto en procesos neuroinflamatorios (Heneka y Landreth, 2007; O'Sullivan, 2007; Abbott, 2009). Debido a esto, aún se desconoce la función de estos receptores en el SNC, tanto en condiciones basales como patológicas, así como los genes regulados por su actividad. Además, aunque se sabe que dichos receptores se expresan en el cerebelo de la rata (Cullingford et al., 1998; Moreno et al., 2004), no hay datos hasta el momento de su expresión en el cerebelo del ratón. Es por ello que uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es llevar a cabo una caracterización de la expresión de los receptores PPAR α en el cerebelo, tanto en condiciones basales como de muerte neuronal.

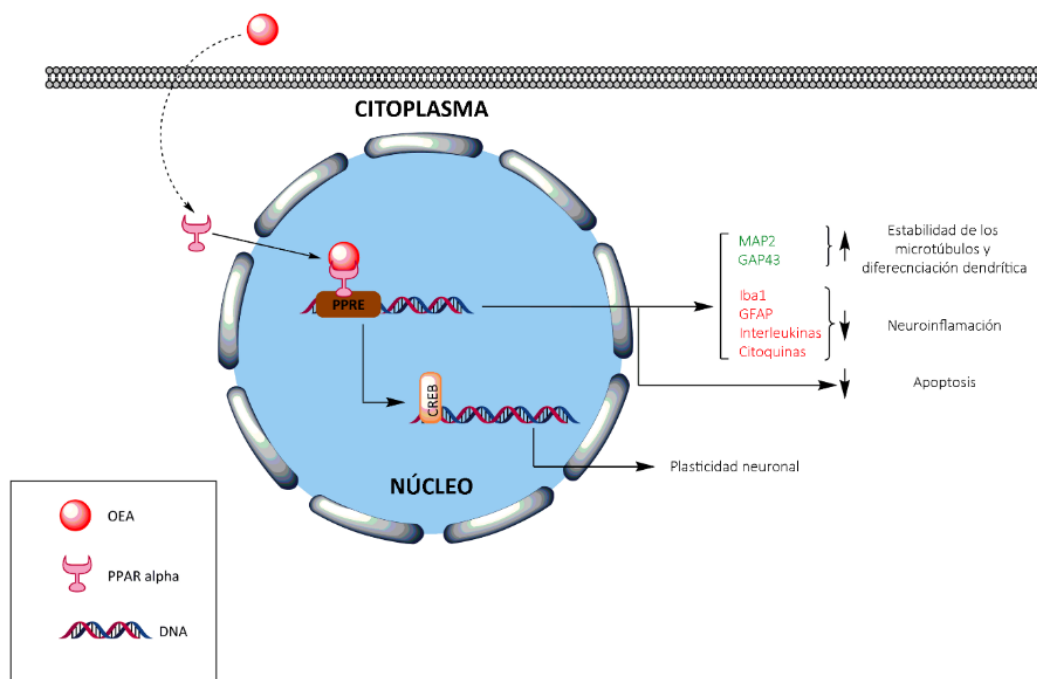


Figura 12: Esquema que describe la activación de los receptores PPAR α por la OEA y los principales efectos descritos hasta el momento en el SNC. Dada la naturaleza del proceso degenerativo de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD, se espera que la actividad de la OEA ayude a paliar la muerte de las células de Purkinje vía los receptores PPAR α .

⁹ Del inglés *Peroxisom Proliferator Response Element*

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Justificación y objetivos

A lo largo de los años se ha establecido que las diferentes patologías neurodegenerativas difieren enormemente en su etiología, aunque todas ellas comparten unos mismos principios: la pérdida de diferentes poblaciones neuronales dentro de un contexto de neuroinflamación, bien sea primario o derivado de la propia muerte celular. En esta línea, se ha demostrado que el sistema endocannabinoide está relacionado con la modulación de procesos de muerte neuronal y neuroinflamación. Es más, recientemente se han relacionado nuevos ligandos lipídicos endógenos y sus receptores con una disminución de ambos procesos, destacando principalmente la OEA y sus receptores diana, los receptores PPAR α . Sin embargo, poco se sabe acerca de la función y expresión de elementos pertenecientes a este sistema a lo largo del desarrollo normal y patológico del cerebelo.

En este sentido, el ratón mutante PCD se posiciona como un modelo de gran utilidad para entender la relación entre el sistema endocannabinoide y los procesos neurodegenerativos. La mutación genética que sufre este modelo afecta a los microtúbulos, y esta afectación puede ser la base de la muerte de ciertas neuronas. Además, debido al propio desarrollo del proceso neurodegenerativo del cerebelo en el ratón PCD, podemos estudiar cómo este deterioro progresivo puede afectar de manera paulatina al comportamiento motor y cognitivo/afectivo.

La **hipótesis general** de la presente Tesis Doctoral es que “La mutación *pcd* produce alteraciones estructurales en las células de Purkinje que afectan al comportamiento del ratón PCD, y el sistema endocannabinoide desempeña un papel importante en el desarrollo cerebeloso y en la muerte de las células de Purkinje en este modelo”.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es estudiar el impacto que ejercen las posibles alteraciones estructurales de las células de Purkinje en el comportamiento del ratón mutante PCD, así como la influencia del sistema endocannabinoide en el desarrollo y muerte neuronal de las células de Purkinje a través de la administración exógena de OEA.

Justificación y objetivos

De este modo, los **objetivos concretos** de la presente Tesis Doctoral son:

- I. Estudiar los cambios plásticos neuronales que suceden durante el desarrollo postnatal del ratón mutante PCD.
 - Ia. Estudiar el efecto de la mutación *pcd* en la dinámica y la estructura de los microtúbulos.
 - Ib. Analizar la expresión del sistema endocannabinoide a lo largo del desarrollo postnatal del cerebelo del ratón PCD.
 - Ic. Estudiar el impacto que tiene el progreso de las alteraciones cerebelosas en el comportamiento de los animales mutantes PCD.
- II. Estudiar el efecto de un agonista del sistema endocannabinoide, la OEA, en la plasticidad cerebelosa del ratón PCD.
 - IIa. Analizar el efecto de la OEA en la estructura y la dinámica de los microtúbulos.
 - IIb. Estudiar el efecto de la OEA en la degeneración cerebelosa de los animales PCD.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se usó como modelo animal el ratón (*Mus musculus* L. 1758), obtenido del cruce de las estirpes C57BL/6J y DBA/2J. De este modo, la estirpe usada fue la híbrida C57/DBA.

Todos los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca a una temperatura y humedad constantes, y con ciclos de noche/día de 12 horas. Todos los animales se alimentaron *ad libitum*.

Los protocolos de mantenimiento y experimentación se hicieron en base a la normativa vigente, tanto europea (2010/63/UE) como española (RD53/2013, Ley 32/2007) y con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Cría y genotipado de animales

Dado que los ratones mutantes PCD no son fértiles, se usaron animales heterocigotos (+/*pcd*) para la cría, que son fenotípicamente indistinguibles de los ratones silvestres. La identificación de los animales se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR¹⁰). El alelo *pcd*^{1J} se encuentra en la región promotora del gen y no se puede detectar directamente con esta técnica. Por eso, se cruzaron machos de la estirpe C57BL/6J con hembras de la estirpe DBA/2J. Todo ello permitió asociar el alelo *pcd*^{1J} al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, quedando el alelo silvestre asociado al fondo genético de la estirpe DBA/2J. Ello permitió analizar dos microsatélites cercanos al gen *Nna1*, el *D13Mit250* y el *D13Mit283*. Estos dos microsatélites difieren entre sí en el número de pares de bases (pb) en función de la estirpe. Además, están suficientemente cercanos a la región portadora de la mutación *pcd*^{1J} como para asegurar su transmisión ligada con una alta probabilidad. Ya que ambos microsatélites difieren en su peso molecular en función de la estirpe, podemos conocer el *background* genético de los animales recién nacidos tal y como explicaremos a continuación.

Extracción de ADN

Para poder llevar a cabo la técnica de PCR es necesario extraer ADN de los animales a genotipar. Para ello, debido a la temprana edad de uso de algunos de los animales (P7) la extrac-

¹⁰ Del inglés *Polymerase Chain Reaction*

Material y métodos

ción de ADN se hizo a partir de una muestra de cola tomada antes de P5, tras el correspondiente marcado e identificación de todos los animales.

Una vez tomadas las muestras de tejido, éstas se homogeneizaron durante toda la noche manteniéndolas en un tampón compuesto por proteinasa K (6 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) diluida en un tampón de lisis que contiene 0,2% (p/v) de dodecil sulfato sódico (SDS), ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) 5 mM a pH 8,0, NaCl 0,2 M y tampón Tris 0,1 M a pH 8,0 en agua ELIX durante toda la noche a 55°C. Al día siguiente del lisado se centrifugaron las colas a 13.200 rpm durante 2 min, desechándose el sobrenadante. El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol igual al del tampón, centrifugando las muestras de nuevo (10 min) a 13.200 rpm. Finalmente, el pellet de ADN se lavó con etanol 70% (v/v) a 4°C, se centrifugó de nuevo durante 10 min, se dejó secar y se resuspendió en H₂O ELIX.

Reacción en cadena de la polimerasa

Mediante la técnica PCR podemos amplificar el número de copias de la secuencia de ADN que nos interesa. En este caso, tal y como se ha indicado más arriba, las secuencias amplificadas corresponden a dos microsatélites asociados al gen *Nna1*. El tampón para llevar a cabo la PCR fue: tampón comercial de la Taq polimerasa (5X, Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), desoxinucleótidos trifosfato (0,2 mM, Promega), Taq polimerasa (0,013 U/μl, Promega), dimetilsulfóxido (DMSO; 5%), MgCl₂ (1,5 mM), cebadores (5 μM), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) y H₂O ELIX. en la tabla X se pueden ver las secuencias de los cebadores usados para la amplificación de los microsatélites.

D13Mit250	Secuencia	D13Mit283	Secuencia
Cebador-1	5'-ACACTCATTCCATGCACGA-3'	Cebador-1	5'-GGAAGCAGTCTCCTGCCTC-3'
Cebador-2	5'-AGGTCCTCAAATCTCACAAGTAGG-3'	Cebador-2	5'-GAGAGGTGGCACATGAGGTT-3'

La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Primus, MWG- Biotech, Vernon Hills, Illinois, EE. UU.) con los ciclos de temperatura que se detallan a continuación.

D13Mit250			D13Mit283	
Temperatura	Tiempo		Temperatura	Tiempo
94°C	5 min		94°C	5 min
94°C	1 min	} 40 ciclos	94°C	1 min
54°C	1 min		53°C	1 min
72°C	1.5 min		72°C	1.5 min
72°C	10 min		72°C	10 min
4°C	infinito		4°C	infinito

Electroforesis

Una vez amplificadas las secuencias de los microsatélites mediante PCR, ambas secuencias se separaron en un gel de agarosa (MS-8, Pronadisa, Madrid, España) al 3% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA, mediante electroforesis. Al gel se le añadió 0,1µl de RedSafe© (Sigma Aldrich) por ml de gel para la visualización de las bandas del ADN amplificado a través de una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, BioRad Laboratories, Barcelona, España). La separación de las secuencias de los microsatélites es posible gracias a que tienen diferentes pesos moleculares. Los animales heterocigotos (+/*pcd*) se diferenciaron por la formación de dos bandas en el gel (130 y 116 pb para el D13Mit250, o bien 114 y 136 pb para el D13Mit283), mientras que en los animales homocigotos se formaba una única banda de mayor grosor, 116 pb para el D13Mit250, o de 136 pb para el D13Mit283 en los animales silvestres (+/+), y 130 pb para el D13Mit250 o de 114 pb para el D13Mit283 en los mutantes PCD (*pcd/pcd*).

ANÁLISIS COMPORTAMENTAL

Con el objetivo de comprender el posible impacto de la neurodegeneración de las células de Purkinje del cerebelo en el ratón mutante PCD en la coordinación motora y en procesos cognitivos como la memoria, la preferencia social o la exploración, se realizaron diferentes pruebas comportamentales a lo largo del desarrollo postnatal (a P15, P17, P22 y P30). Todas las pruebas comportamentales, que se describirán detalladamente a continuación, se llevaron a cabo a lo largo de la mañana y en el mismo orden en el que se describen. Estas pruebas comportamentales, salvo la prueba de rota-rod, se realizaron únicamente a animales silvestres o mutantes sin ningún tipo de administración farmacológica.

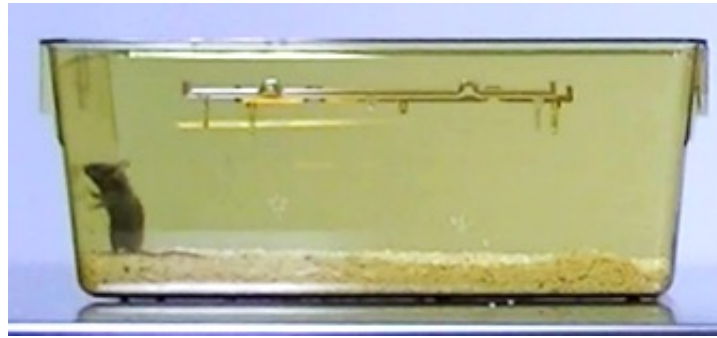
Teniendo en cuenta los tres tipos de administraciones llevadas a cabo –continua de P7 a P21, aguda a P14 y aguda a P16–, resultó complicado realizar todas las pruebas comportamentales. Esto se debe a que en las primeras etapas de análisis –P15– no todos los grupos habían sido tratados con OEA, por lo que se podrían hallar sesgos debido al diferente tratamiento. Además, el tratamiento continuo obligaría a tener en cuenta los posibles efectos de la OEA a corto plazo en dichas pruebas comportamentales. Sin embargo, estudios previos han demostrado que las dosis empleadas en la presente Tesis Doctoral no afectan a la ejecución de la prueba de rota-rod (González-Aparicio y Moratalla, 2014), lo que nos asegura que los resultados se deberán solamente a un efecto paliativo de la OEA en el proceso degenerativo del ratón PCD.

Rota-rod

El test de rota-rod se empleó para estudiar la coordinación motora del ratón mutante PCD a lo largo del desarrollo postnatal. El test se llevó a cabo a una aceleración de 0,6 rpm/s, de 4 a 40 rpm, en 10 min. Cada día se llevaron a cabo 7 sesiones, con 20 min de espera entre cada una. Tanto al inicio como al final de cada sesión se lavó el aparato con etanol 96% para evitar la posible influencia de olores. A diferencia del resto de pruebas comportamentales, la prueba de rota-rod se realizó a todos los animales por igual, tanto para el estudio del desarrollo del cerebelo del ratón PCD, como para el estudio del efecto del tratamiento con OEA.

Test de comportamiento en jaula

El test de comportamiento en jaula se realizó con el objetivo de analizar el comportamiento general de los ratones en una situación con bajo nivel de estrés. De esta manera podemos estudiar cómo las alteraciones en el desarrollo del cerebelo del ratón PCD afectan a su comportamiento general. Éste se llevó a cabo en jaulas estandarizadas de mantenimiento, para lo cual se asignó una a cada animal para todos los días de experimentación. La jaula asignada fue usada únicamente por dicho animal hasta el final del periodo experimental, evitando de esta manera la posible influencia de olores de otros ratones. Los animales se emplazaron en la caja durante 10 min antes del comienzo del análisis para que se habituaran al entorno. Posteriormente se grabó y analizó el comportamiento de los animales durante 10 min (**Fig. 13**). Los parámetros analizados en la prueba de comportamiento en jaula fueron: 1) limpiezas, debido a que son comportamientos estereotípicos de los ratones relacionados con la actividad cerebelosa. Precisamente, los trastornos de tipo autista y la esquizofrenia se caracterizan por la realización de comportamientos compulsivos o estereotipados (Garner et al., 2003); 2) exploraciones, como indicador de la capacidad de los ratones para interactuar y examinar su entorno. Las alteraciones en la capacidad de interacción con el entorno son características de diferentes trastornos psiquiátricos (O'Neill y Happe, 2000; Schneider et al., 2006; Walsh et al., 2012); 3) movimiento general, como un indicador de la capacidad de movilidad de los animales, lo que nos permite tener una mejor comprensión de la posible influencia de las alteraciones motoras en la realización de las pruebas comportamentales. Estos parámetros se escogieron en base a estudios previos sobre modelos animales de trastornos psiquiátricos (McFarlane et al., 2008; Silverman et al., 2010; Tsai et al., 2012; Földy et al., 2013; Wöhr y Scattoni, 2013).



Limpiezas



Exploraciones



Movimiento

Figura 13: Imagen de una animal durante el test de comportamiento en jaula. Puede observarse al ratón llevando a cabo una exploración del entorno. Además, la base de la jaula está cubierta con viruta para facilitar el movimiento de los animales y disminuir su estrés. Abajo están representados los comportamientos a analizar en la prueba de comportamiento en jaula.

Test de reconocimiento de objetos (NOR)

El test de reconocimiento de objetos (NOR¹¹) se empleó con el objetivo de estudiar la memoria de reconocimiento. Esto nos permite analizar cómo el desarrollo de las alteraciones cerebelosas puede afectar a la memoria de reconocimiento de los ratones.

El test de reconocimiento de objetos se llevó a cabo en la misma jaula en la que se realizó la prueba de comportamiento en jaula, evitando así el estrés derivado de los cambios de entorno. El primer día de análisis (P15), se pusieron dos objetos idénticos (A-A) en dos esquinas opuestas de la jaula, permitiendo que los animales se familiarizaran con ellos. Los días siguientes se mantuvo uno de los objetos usados el primer día (A), y otro se cambió por uno nuevo. Los objetos nuevos se cambiaron cada día de experimentación (B a P17, C a P22 y D a P30. Ver **Fig. 14**), midiéndose el porcentaje de tiempo que pasaron los animales explorando los objetos nuevos con respecto al objeto familiar. Este test se basa precisamente en la predisposición de los ratones a explorar objetos nuevos. Así, los ratones de forma normal tienden a pasar más tiempo explorando los objetos novedosos que los objetos ya conocidos (Ennaceur y Delacour, 1988; Antunes y Biala, 2012). Una vez finalizado el test NOR, se dejó a los animales en reposo antes de comenzar con el test de preferencia social.

¹¹ Del inglés *Novel Object Recognition*

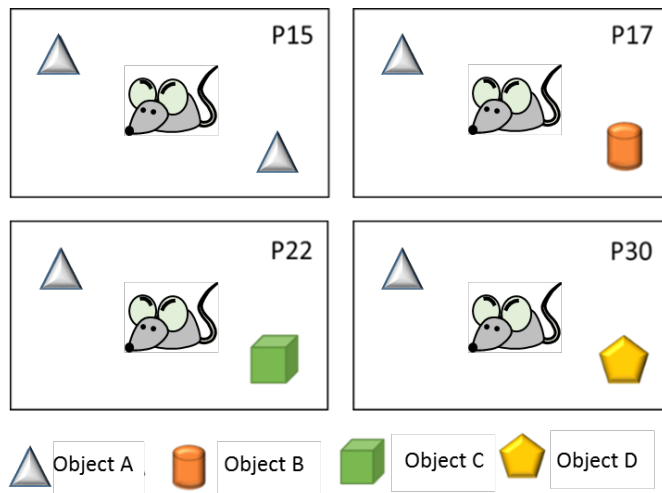


Figura 14: Representación de la prueba NOR a lo largo de los días analizados. Puede observarse cómo el objeto A se mantiene a lo largo de los días en la misma posición. Aunque la posición del objeto complementario (objetos B, C y D) se mantiene también, éste es diferente a lo largo de los diferentes días de análisis.

Test de preferencia social

Uno de los comportamientos más ampliamente relacionados con el cerebelo es la preferencia social. Esta prueba nos permite averiguar cómo las diferentes alteraciones que se van produciendo a lo largo del desarrollo del cerebelo del ratón mutante PCD afectan a su comportamiento social. El test de preferencia social se llevó a cabo en una caja de Plexiglas® (50 x 29 cm) dividida en 3 compartimentos de igual tamaño (16,67 x 29 cm). Durante la primera parte del test se deja a los animales en el compartimento central para que exploren el entorno durante 10 min. Una vez finalizado el periodo de adaptación, se vuelve a colocar al animal en el centro, pero esta vez con un animal estímulo en uno de los compartimentos laterales y un objeto en el otro (**Fig. 15**). Tanto el animal estímulo como el objeto se pusieron dentro de un recipiente fenestrado con el objetivo de permitir la interacción del animal a testar con cualquiera de los estímulos. De este modo, se midió el porcentaje de tiempo que pasaron los animales en el compartimento en el que se ubicaba el animal estímulo con respecto al compartimento en el que se encontraba el objeto (Moy et al., 2004). Los ratones, como animales sociales, tenderán a pasar más tiempo en el compartimento en el que se encuentra el animal estímulo que en el del objeto. Sin embargo, las alteraciones en el comportamiento social de los animales disminuyen el porcentaje de tiempo en el compartimento con el animal estímulo.

Material y métodos

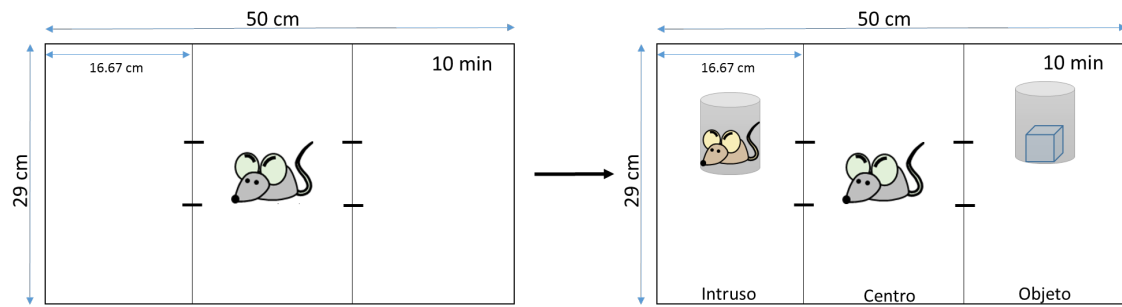


Figura 15: Representación de la prueba de preferencia social. Cada día se pone a los animales en el centro del aparato para que lo explore. Posteriormente se pone en el mismo aparato un animal y un objeto para analizar la preferencia de los animales.

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Para estudiar el efecto de la OEA (Calbiochem, San Diego, EE.UU.) en el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje del ratón mutante PCD, el fármaco se diluyó en etanol absoluto y posteriormente se rebajó al 10% con H₂O ELIX para su administración por vía intraperitoneal, como se ha descrito previamente (Galán-Rodríguez et al., 2009). La preparación de la OEA para su administración se hizo en fresco, evitando de esta forma la degradación de la misma. Las dosis empleadas fueron de 1, 5 y 10 mg/kg en administraciones de 10 µl/g (p.a.).

Asimismo, se llevaron a cabo 3 tratamientos diferentes basados en el desarrollo de la neurodegeneración de las células de Purkinje del cerebelo en el ratón mutante PCD (ver esquema en **Fig. 16**): 1) administración aguda a P14, previamente al comienzo del proceso pre-neurodegenerativo; 2) administración aguda a P16, durante el proceso pre-neurodegenerativo y previa al comienzo de la neurodegeneración; 3) administración diaria desde P7 hasta P21.

De este modo, teniendo en cuenta las diferentes dosis empleadas así como las pautas de administración, finalmente se obtuvieron 12 grupos de tratamiento con OEA en animales silvestres y otros 12 en ratones mutantes PCD. Tras el tratamiento los animales se mantuvieron estabulados en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca hasta su sacrificio a P30, edad a la que se analizó el cerebelo.

Todos los animales tratados con OEA realizaron la prueba de rota-rod a P15, P17, P22 y P30 tal y como se ha indicado en el apartado anterior, con el objetivo de estudiar el efecto de la administración de OEA en el comportamiento motor.

Material y métodos

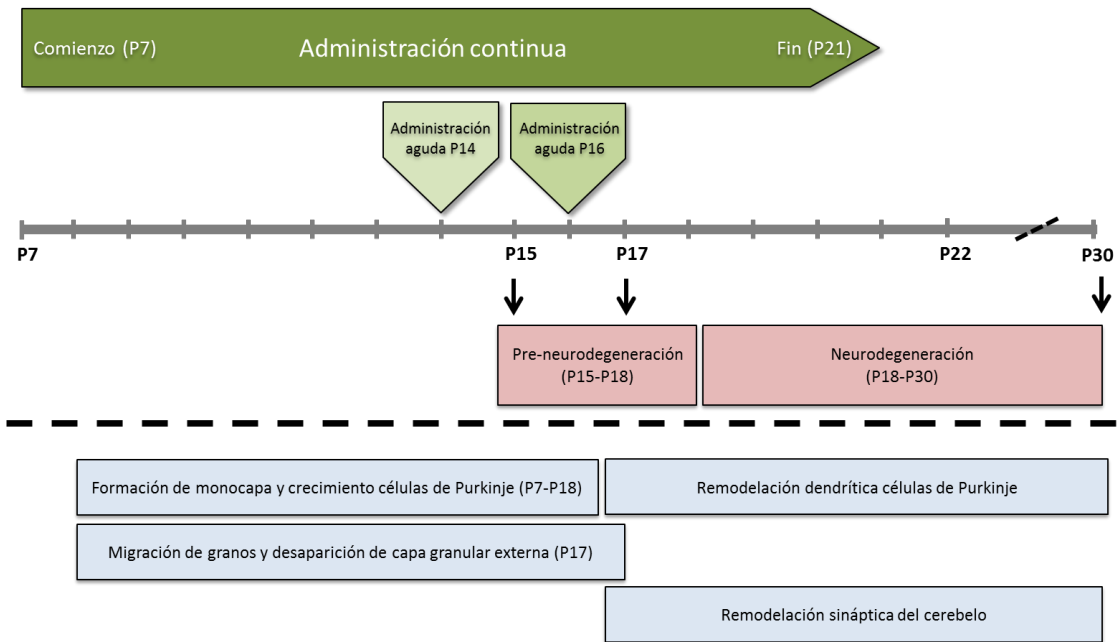


Figura 16: Línea temporal indicando los tres tipos de tratamiento realizados (*verde*) y su relación con los procesos pre-neurodegenerativo y neurodegenerativo del ratón mutante PCD (*rojo*), así como el desarrollo normal del cerebelo (*azul*).

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Las edades para la obtención del tejido dependieron de los experimentos realizados. Así, para el estudio del desarrollo del cerebelo se usaron animales con edades de P7, P15, P17, P22 y P30, tanto silvestres como mutantes PCD. Del mismo modo, los animales usados para el análisis comportamental -sin tratamiento alguno-, así como los animales tratados con OEA se sacrificaron a P30.

Sacrificio y disección

Todos los animales se anestesiaron con hidrato de cloral 5% (p/v) a una dosis de 10µl/g; el efecto de la anestesia se comprobó por la ausencia del reflejo plantar o del reflejo palpebral según la edad. Los animales utilizados a P7 se sacrificaron por decapitación, tras la cual se extrajo el cerebro y se fijó por inmersión en Somogyi sin glutaraldehído (paraformaldehído al 4%, p/v, y 15% de ácido pícrico saturado en tampón fosfato 0,1 a pH 7,3) durante 72 horas.

El tejido del resto de animales se fijó mediante perfusión a través de la aorta ascendente con una bomba peristáltica con un flujo de 8 ml/min. Inicialmente se lavó el árbol vascular con solución salina 0,9% (p/v) durante 1 minuto tras la inyección de 15 µl de heparina sódica. Posteriormente se continuó con la solución fijadora de Somogyi (sin glutaraldehído) durante 15 min. Tras la extracción del encéfalo, el tejido se postfijó durante 2 horas mediante inmersión

en la misma solución fijadora. Transcurrido ese tiempo los bloques se lavaron con tampón fosfato 3 veces y se dejaron en agitación a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se cambió el tampón fosfato por una solución de sacarosa al 30% (p/v) en tampón fosfato para crioproteger el tejido. Finalmente, los bloques se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Seccionamiento del tejido

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es el estudio del cerebelo, por lo que sólo se seccionó dicha estructura, y se almacenó el resto del tejido a -80 °C. Los cerebelos de los animales se seccionaron en cortes parasagitales en un microtomo de deslizamiento acoplado a una unidad de congelación (Leica, Nussloch, Alemania), a un grosor de 30 µm. Las secciones se recolectaron en flotación en tampón fosfato 0,1 M y se distribuyeron en placas de cultivo de 24 pocillos de manera seriada. Posteriormente se lavaron las secciones 3 x 10 min en tampón fosfato y se conservaron a -20 °C en una mezcla congeladora compuesta por 30% de glicerol (v/v) y 30% (v/v) de polietilenglicol en tampón fosfato.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para el estudio histológico del cerebelo se emplearon animales silvestres y mutantes PCD de diferentes edades, en función del análisis realizado. De este modo, podemos dividir los experimentos desarrollados durante la presente Tesis Doctoral en dos partes: 1) estudio del desarrollo post-natal y degeneración temprana del cerebelo del ratón mutante PCD y 2) estudio del efecto de la administración de OEA en la degeneración del cerebelo del ratón mutante PCD. Para el estudio del desarrollo del cerebelo, las edades se determinaron en base a dos aspectos: 1) el desarrollo morfológico de las células de Purkinje del cerebelo y 2) el desarrollo del proceso neurodegenerativo del cerebelo en el ratón mutante PCD (ver **Fig. 16**). En consecuencia, para esta primera parte, el tejido se obtuvo y se analizó a P7, P15, P17, P22 y P30. Respecto a la segunda parte del estudio (análisis del efecto de la administración de OEA), el tejido se analizó únicamente a P30, lo que permitió observar el efecto de la OEA a medio plazo. Este análisis a P30 se llevó a cabo en los distintos tipos de administración de OEA.

En cualquier caso, el tejido se analizó mediante diferentes técnicas histológicas que describiremos a continuación.

Inmunofluorescencia indirecta

La detección de las diferentes proteínas se llevó a cabo en secciones de 30 μm de grosor, obtenidas como se ha indicado anteriormente. Para ello se usó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Esta técnica consiste en la detección de la proteína de interés (antígeno) mediante el uso de anticuerpos primarios específicos contra dicha proteína. Posteriormente se emplearon anticuerpos secundarios unidos a un fluorocromo, que se unen a su vez a los anticuerpos primarios. La luz emitida por el fluorocromo asociado al anticuerpo secundario, tras su excitación específica mediante un microscopio de fluorescencia, nos permitió localizar la proteína diana. La existencia de diferentes fluorocromos, así como de filtros específicos para microscopio, nos permite detectar varias proteínas al mismo tiempo, pudiendo analizar su expresión de manera simultánea.

Para la detección de los antígenos se incubaron las secciones en Triton X-100 al 0,1%, un suero al 10% para evitar uniones inespecíficas y los anticuerpos primarios a la concentración adecuada para cada uno. Posteriormente todo esto fue diluido en tampón fosfato salino pH 7,3. Con el objetivo de conseguir un marcaje adecuado, las secciones se incubaron en esta mezcla durante 72 horas a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados y sus concentraciones se enumeran en la **Tabla 2**. Pasado el periodo de incubación de los anticuerpos primarios, las secciones se lavaron 3 x 10 min en tampón fosfato salino. Posteriormente se llevó a cabo la detección de los anticuerpos primarios mediante la incubación del tejido con anticuerpos secundarios asociados a diferentes fluorocromos, escogidos en función de cada tipo de análisis. Para ello se diluyeron los anticuerpos secundarios correspondientes en tampón fosfato salino a una dilución de 1:500. Cuando se usaron anticuerpos para los receptores PPAR α , éstos se revelaron usando anticuerpos secundarios biotinados (1:300) revelados *a posteriori* con estreptavidina (1:500) durante 1h; ello permite amplificar más la señal fluorescente y observar mejor el antígeno de interés. Al finalizar la incubación con estreptavidina se añadió DAPI (1:30.000) durante 15 min y posteriormente se lavó el tejido 3 x 10 min en tampón fosfato salino.

Anticuerpo primario	Animal huésped	Casa comercial	Concentración
Anti-Calbindina D-28k	Ratón	Swant	1:2.000
Anti-CB1	Cobaya	Frontiers science	1:1.000
Anti-CB2	Burro	SCBT	1:500
Anti-S100	Ratón	Millipore	1:1.000
Anti-Iba1	Pollo	Abcam	1:1.000
Anti-PPAR α	Conejo	Thermo Scientific	1:100

Tabla 2: Relación de los anticuerpos utilizados y sus concentraciones de uso.

TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labelling)

La técnica TUNEL se empleó para la detección de células en apoptosis. El procesamiento y seccionamiento de las secciones usadas fue el mismo que se ha descrito anteriormente. Las secciones se lavaron 3 x 10 min en tampón fosfato y a continuación se fijó de nuevo el tejido con una solución etanol:ácido acético (2:1, v/v) a -20 °C durante 5 min, para lavarse a continuación 3 x 10 min en tampón fosfato salino. Posteriormente las secciones se permeabilizaron con 0,2% Triton X-100 (v/v) y 0,1% de citrato sódico (v/v) en tampón fosfato 0,1 M durante 15 min. A continuación las secciones se incubaron en tampón TUNEL (30 mM Tris pH 7,2, 140 mM cacodilato de sodio, 1 mM cloruro de cobalto, 0,3% Triton X-100). Finalmente, se añadió a las secciones transferasa terminal (2 µl/ml; Roche) y dUTP-biotinado (1 µl/ml; Roche) y se incubaron durante 1 hora y 30 min a 37 °C. Al finalizar el tiempo de espera, la reacción se paró con tampón citrato salino (2 x 10 min) y posteriormente se lavaron las secciones con tampón fosfato salino (3 x 10 min).

La técnica TUNEL se combinó con la inmunofluorescencia con objeto de identificar correctamente las neuronas en apoptosis. Así, una vez finalizada la técnica TUNEL, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes. Pasadas 72 h de incubación se reveló la técnica TUNEL con estreptavidina Cy2, y los anticuerpos primarios con el anticuerpo secundario correspondiente.

CULTIVOS CELULARES

Con el objetivo de poder estudiar el efecto de la mutación *pcd* en la dinámica y estructura de los microtúbulos, se llevaron a cabo cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF¹²). Tal y como describiremos a continuación, los fibroblastos fueron transfectados con el objetivo de visualizar los microtúbulos para su posterior análisis.

Cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de ratón

La obtención de MEF se llevó a cabo con animales en estado embrionario de E14.5, tanto de animales silvestres como mutantes PCD. Para ello se sacrificó a una hembra gestante con CO₂ y se transfirieron los embriones a placas Petri con tampón fosfato salino estéril en hielo. Una vez que se eliminó el saco amniótico, se diseccionó el encéfalo de los animales, y se introdujo en *flasks* de cultivo con 15 ml de medio con tripsina para llevar a cabo la disociación quí-

¹² Del inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*

Material y métodos

mica. Posteriormente se llevó a cabo la disociación mecánica, aspirando repetidamente el tejido con pipetas Pasteur. Para finalizar el proceso, se incubó el disociado resultante durante 5 min a 37°C. La suspensión resultante se transfirió a un tubo estéril con 25 ml de medio precalentado, el cual se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 25 ml de medio fresco. Una vez obtenidos los MEF, estos se alicuotaron y se almacenaron a -80°C en una solución compuesta por medio de cultivo y DMSO hasta su uso.

Transfección de MEF

Los MEF son una herramienta muy útil para estudiar la dinámica de los microtúbulos no sólo por su facilidad de cultivo, sino por su tamaño y forma: grandes y prácticamente planos. A diferencia de las neuronas, los microtúbulos de los MEFs son más dinámicos y fáciles de distinguir individualmente ya que no forman haces similares a los observados en las prolongaciones neuronales. Con el objetivo de visualizar y analizar la dinámica de los microtúbulos en animales procedentes de ambos genotipos, se transfectaron fibroblastos silvestres y PCD con α -tubulina-mCherry y EB3¹³-GFP. La α -tubulina nos permitió marcar los microtúbulos de los MEF, y la proteína EB3 el segmento final (polo positivo) de los mismos.

Para poder llevar a cabo la transfección, se esperó a que los fibroblastos tuvieran una confluencia *in vitro* de aproximadamente el 80%. Una vez alcanzada, se lavaron los frascos en los que se encontraban los MEF en cultivo con tampón fosfato salino para incubarlos posteriormente durante 3 min a 37 °C en tripsina al 1%. Una vez los MEF se encontraron en flotación, se calculó un número suficiente de células para poder llevar a cabo la transfección ($\sim 1 \times 10^6$). Ésta se realizó mediante el nucleofector Amaxa Nucleofector (Amaxa Biosystems, Colonia, Alemania). Tal y como se ha indicado anteriormente, los plásmidos usados fueron α -tubulina-mCherry (9 μ g) y EB3-GFP (1 μ g) junto con lipofectamina plus (Invitrogen). Una vez finalizada la transfección, se distribuyeron los MEF en 4 placas Petri, cada una con uno de los tratamientos indicados a continuación. Los MEF se dejaron reposar durante 24 horas y posteriormente se comenzó con la adquisición de datos mediante *time-lapse*.

Tratamiento farmacológico con OEA en cultivo

Para entender el efecto de la administración de OEA en la dinámica y estructura de los microtúbulos, se trataron los cultivos de MEF con esta sustancia. Para ello, se diluyó la OEA en dimetil-sulfóxido (DMSO) y se almacenó en alícuotas de uso único a -80 °C. Con el objetivo de evitar posibles interacciones de la administración de OEA con la transfección, ésta se adminis-

¹³ Del inglés *End Binding protein 3*

tró tras el proceso de transfección. La OEA se administró con concentraciones de 0,1 0,5 y 1,0 μM . Estas dosis se basan en estudios anteriores acerca del efecto de la OEA en cultivos neuronales (Bento-Abreu et al., 2007; Galán-Rodríguez et al., 2009).

Adquisición y análisis de los microtúbulos en MEF mediante *time-lapse*

La adquisición de videos *time-lapse* se llevó a cabo 48 horas después de la transfección de los plásmidos. Durante todos los días de experimentación los cultivos se mantuvieron en placas Petri en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Durante la grabación de los videos, los MEF se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura y CO₂. La captura de imágenes se realizó cada 3 s mediante un objetivo de inmersión 100x en un microscopio (Axiovert 200M; Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Oberkochen, Alemania) controlado por el software MetaMorph (Universal Imaging Corp, Nueva York, EE.UU.).

Los videos se analizaron mediante el software ImageJ (NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para analizar la velocidad de crecimiento de los microtúbulos se usaron las imágenes adquiridas con el marcaje de EB3-GFP. Posteriormente se realizó la máxima proyección de las imágenes, obteniendo la trayectoria y movimiento del extremo (+) -o “cometa”- de los MEF (**Fig. 17**). Una vez obtenidas las trayectorias, se analizaron mediante el software ImageJ (NIH). Mediante un *plugin* específico desarrollado en el laboratorio de “*Physiopathologie du Cytosquelette*” de la Universidad Joseph Fourier (Grenoble, Francia), se realizó el *kymograph* del movimiento de los microtúbulos (representación gráfica de la posición espacial a lo largo del tiempo), es decir, una proyección espacio/tiempo de los cometas. Una vez obtenido el *kymograph*, se analizó la velocidad de cada uno de los cometas individuales (**Fig. 17**). Dado que la EB3, al igual que el resto de proteínas asociadas al extremo (+) de los microtúbulos, se expresa únicamente durante los periodos de crecimiento de los microtúbulos, sólo se analizó la tasa de crecimiento mediante este método.

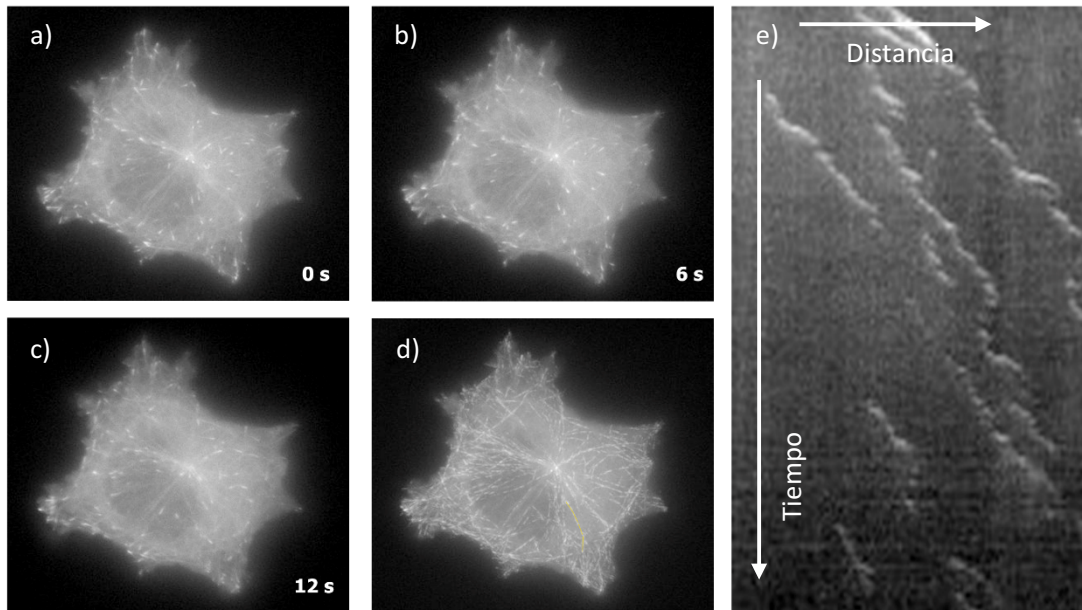


Figura 17: Representación de un MEF transfectado con EB3-GFP. a-c) Puede observarse el marcaje de EB3 en el extremo (+) de los microtúbulos a lo largo de 12 segundos de *time-lapse*. d) Máxima proyección del *time-lapse*, donde puede verse la trayectoria del extremo (+) de los microtúbulos a lo largo de 5 min de video. En amarillo se encuentra marcada la trayectoria de análisis por medio de *kymograph*. e) *Kymograph* representando el movimiento del extremo (+) de los microtúbulos que pasan a lo largo de la trayectoria marcada en la figura anterior.

El análisis de la dinámica de los microtúbulos se llevó a cabo de manera automática mediante el software plusTipTracker, desarrollado en por el laboratorio del Dr. Danuser para Matlab® (Matov et al., 2010; Applegate et al., 2011). El primer paso fue la puesta a punto del programa para la detección correcta de los “cometas” y su seguimiento posterior (**Fig. 18**). Para ello se siguieron los pasos indicados por los propios desarrolladores. De este modo, se analizaron los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento, velocidad de decrecimiento, tiempo medio de crecimiento, tiempo medio de decrecimiento, frecuencia de catástrofes y porcentaje de tiempo en crecimiento, en decrecimiento y en pausa. Además, se analizó la clasificación de los microtúbulos encontrada en función de su velocidad (mayor o menor de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$) y el tiempo de vida (mayor o menor de 10 s). De este modo, se obtuvieron 4 categorías de clasificación de los microtúbulos: 1) lentos y cortos, 2) rápidos y cortos, 3) lentos y largos y 4) rápidos y largos.

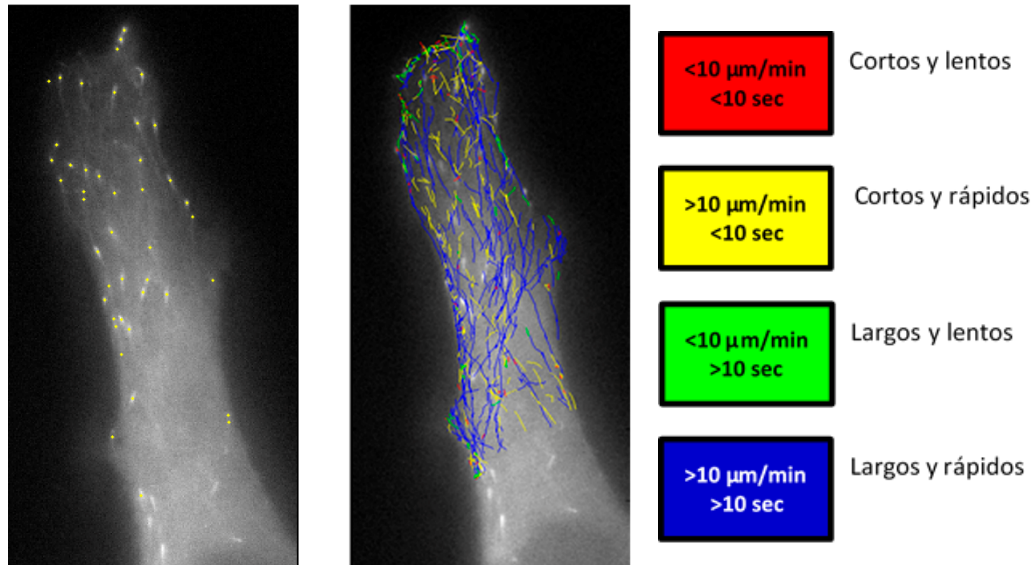


Figura 18: Imagen del software plusTipTracker representando la detección de los cometas y su seguimiento posterior. Los diferentes colores en el seguimiento representan microtúbulos clasificados en función de su velocidad y su vida media.

Análisis de la curvatura de los microtúbulos

Para llevar a cabo el análisis de la curvatura primero se llevó a cabo la interpolación por *spline* cúbico de los microtúbulos y las trayectorias de los mismos. Para el análisis de la curvatura de los microtúbulos se usaron imágenes de MEF transfectados con α -Tubulina m-cherry. Con el objetivo de evitar posibles alteraciones se usó siempre la primera imagen de los videos *time-lapse*. Para el análisis de la curvatura de los microtúbulos en movimiento, es decir la curvatura de las trayectorias, se realizó la máxima proyección de las imágenes obtenidas para EB3-GFP. Una vez obtenidas las funciones se analizó la curvatura mediante la fórmula de la curvatura (Goetz, 1970):

$$k = \frac{x'y'' - y'x''}{(x'^2 + y'^2)^{3/2}}$$

siendo,

$$x' = \frac{dx}{dt}, \quad x'' = \frac{d^2x}{dt^2}, \quad y' = \frac{dy}{dt}, \quad y'' = \frac{d^2y}{dt^2},$$

es decir, las derivadas primera (x', y') y segunda (x'', y'') en cada punto t de la función.

Tanto la interpolación como el análisis de la curvatura se llevaron a cabo con un programa escrito para Mathematica en colaboración con el Departamento de Física de la Materia Con-

Material y métodos

densada de la Universidad de Zaragoza (en la **Fig. 19** puede verse un ejemplo del análisis de la curvatura de un microtúbulo).

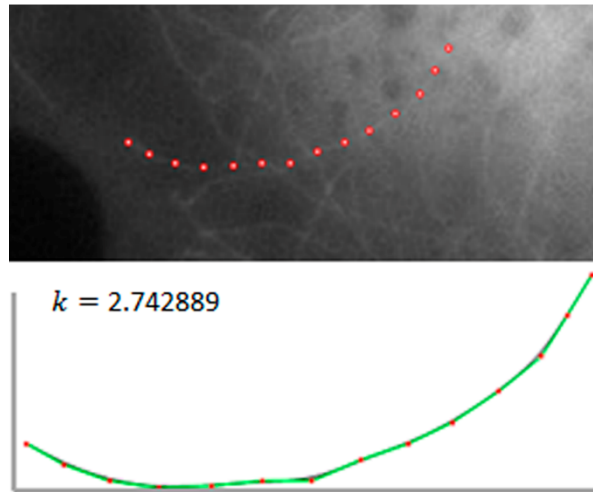


Figura 19: Ejemplo de interpolación de un microtúbulo y el valor de su curvatura.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El primer paso que se llevó a cabo previo al análisis estadístico fue examinar el ajuste de los datos a los supuestos paramétricos. Dado que los datos se ajustaron a los supuestos paramétricos se empleó la t de Student para estudiar las posibles diferencias entre animales silvestres y mutantes PCD a lo largo del desarrollo. Esta técnica de análisis se usó para examinar las posibles diferencias tanto en el desarrollo del cerebelo como comportamentales entre ambos genotipos.

Para el estudio del efecto de la OEA, tanto en animales *in vivo* como en la dinámica de los microtúbulos en MEF, se empleó el análisis de la varianza (ANOVA). Esto nos permitió entender como los tratamientos empleados afectan a los parámetros estudiados. Asimismo, el análisis de la prueba de rota-rod en los animales administrados se llevó a cabo de la misma forma.

RESULTADOS

ANÁLISIS *IN VITRO* DE LA DINÁMICA Y ESTRUCTURA DE LOS MICROTÚBULOS

Desde la aparición del ratón mutante PCD en la década de los 70, diversos autores han tratado de identificar la función de la proteína NNA1/CCP1 (Fernández-González et al., 2002; Rodríguez de la Vega et al., 2007; Wang y Morgan, 2007; Chakrabarti et al., 2008; Berezniuk et al., 2010). En los últimos años ha habido grandes avances al respecto: recientemente se ha demostrado que la enzima CCP1 es esencial en procesos de des-poliglutamilación de los microtúbulos (Rogowski et al., 2010). Por tanto, todo apunta a que el ratón mutante PCD tiene un exceso de poliglutamilación de los microtúbulos, lo que daría lugar finalmente a la degeneración del cerebelo en estos animales. Sin embargo, aún no se sabe el efecto concreto de la poliglutamilación en la dinámica y la estructura de los microtúbulos.

Por otro lado, como ya hemos indicado, se ha demostrado que la OEA aumenta la expresión de proteínas asociadas a los microtúbulos a través de la activación de los receptores PPAR α (Bento-Abreu et al., 2007). En este caso también se desconoce el efecto que puede tener su administración en la dinámica y estructura de los microtúbulos.

Efecto de la mutación PCD en la dinámica y estructura de los microtúbulos

El análisis de la dinámica mostró que los microtúbulos de fibroblastos KO para la enzima CCP1 (de ahora en adelante fibroblastos “PCD”) tienen una mayor velocidad de polimerización que los fibroblastos de animales silvestres ($p < 0,05$; **Fig. 20**). Asimismo, se observó un aumento en la frecuencia de catástrofes en los microtúbulos PCD en relación a los microtúbulos silvestres ($p < 0,05$; **Fig. 20**). El resto de parámetros analizados no mostró diferencias significativas (**Fig. 20**). De este modo, parece ser que la falta de la enzima CCP1, es decir la alteración de la des-poliglutamilación, aumenta en cierto modo la inestabilidad de los microtúbulos.

Otro de los aspectos esenciales para poder entender el efecto de la mutación *pcd* en los microtúbulos es el estudio de su estructura. Los resultados obtenidos al respecto revelaron que la falta de enzima CCP1 aumentó la curvatura tanto de los propios microtúbulos ($p < 0,05$) como de la trayectoria que siguen en su crecimiento ($p < 0,01$; **Fig. 20**). De este modo, la poliglutamilación no sólo modificaría la dinámica de los microtúbulos sino también la estructura física de los mismos, haciendo que éstos sean más curvados.

Resultados

Por tanto, teniendo en cuenta que a edades tempranas no hay alteraciones conocidas en el cerebelo del ratón PCD, este aumento en la inestabilidad y la curvatura de los microtúbulos se relacionaría con procesos normales de desarrollo. Sin embargo, una vez finalizado el desarrollo estas alteraciones se relacionarían con procesos neurodegenerativos.

Efecto del tratamiento con OEA en la dinámica y estructura de los microtúbulos

En relación con la administración de OEA, se observó un aumento en ambos genotipos tanto en la velocidad de crecimiento (microtúbulos silvestres, $p < 0,05$; microtúbulos PCD, $p < 0,05$; **Fig. 21**) como de decrecimiento (microtúbulos silvestres, $p < 0,05$; microtúbulos PCD, $p < 0,05$; **Fig. 21**). Sin embargo, mientras que en los fibroblastos silvestres la concentración necesaria para producir este aumento fue de $0,5 \mu\text{M}$, los fibroblastos PCD necesitaron una concentración de $1 \mu\text{M}$ para ejercer el mismo efecto. Asimismo, la administración de OEA provocó un aumento en la longitud media de crecimiento (silvestres, $p < 0,05$; PCD, $p < 0,05$) y decrecimiento (silvestres, $p < 0,05$; PCD, $p < 0,05$) de los microtúbulos en ambos genotipos. En este caso también se observaron diferencias en la dosis efectiva entre los microtúbulos de fibroblastos silvestres ($0,5 \mu\text{M}$) y PCD ($1 \mu\text{M}$). Por último, la administración de OEA a una concentración de $0,5 \mu\text{M}$ también aumentó el porcentaje de tiempo en pausa de los microtúbulos y disminuyó su porcentaje de tiempo en crecimiento en fibroblastos silvestres (ver **Tabla 3**). Sin embargo, en el caso de los microtúbulos KO para la CCP1 no se observó ningún efecto derivado de la administración de OEA para estos dos parámetros.

Por tanto, aunque la OEA parece tener un efecto análogo en los microtúbulos silvestres y en los KO para la CCP1, la dosis necesaria fue mayor en los microtúbulos mutantes (**Tabla 3**). Como discutiremos en mayor profundidad más adelante, este aumento en la dosis efectiva de OEA en microtúbulos KO para la CCP1 podría deberse a la necesidad de un mayor número de proteínas asociadas a ellos para ejercer el mismo efecto que en microtúbulos silvestres.

Resultados

	WT				PCD			
	Control	OEA 0.1	OEA 0.5	OEA 1.0	Control	OEA 0.1	OEA 0.5	OEA 1.0
Velocidad crecimiento	10.62 ± 0.34	15.30 ± 1.56 *	16.55 ± 1.26 *	13.67 ± 0.92	14.20 ± 1.69 #	13.46 ± 0.81	15.95 ± 1.38	21.73 ± 2.64 *
Velocidad decrecimiento	16.24 ± 1.67	23.46 ± 4.28	29.61 ± 2.34 *	23.30 ± 1.69	21.90 ± 2.51	14.41 ± 4.95	26.77 ± 2.73	38.34 ± 4.78 *
Longitud media crecimiento	2.66 ± 0.10	3.15 ± 0.19	3.81 ± 0.26 *	3.29 ± 0.24	2.72 ± 0.14	2.68 ± 0.10	2.72 ± 0.12	3.58 ± 0.33 *
Longitud media decrecimiento	1.73 ± 0.18	2.18 ± 0.37	3.15 ± 0.31 *	2.76 ± 0.26 *	1.81 ± 0.15	1.15 ± 0.37	2.03 ± 0.14	3.19 ± 0.57 *
Frecuencia de catástrofes	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.02 #	0.07 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02
%Crecimiento	92.05 ± 0.65	89.21 ± 1.10	88.47 ± 0.75 *	89.01 ± 1.18	91.20 ± 1.25	90.79 ± 1.31	90.81 ± 0.57	88.21 ± 1.02
%Decrecimiento	7.67 ± 0.63	10.46 ± 1.04	11.05 ± 0.08	10.64 ± 1.11	8.59 ± 1.19	9.13 ± 1.28	8.96 ± 0.50	11.41 ± 0.95
%Pausa	0.28 ± 0.07	0.33 ± 0.09	0.48 ± 0.68 *	0.35 ± 0.09	0.22 ± 0.10	0.08 ± 0.03	0.23 ± 0.11	0.37 ± 0.10

Tabla 3: Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de la dinámica de los microtúbulos, tanto en animales silvestres como PCD, de forma basal y tras la administración de OEA a distintas concentraciones. # Diferencias entre genotipos; * Diferencias por tratamiento.

Por su parte, la OEA no afectó a la curvatura de los microtúbulos silvestres a ninguna de las concentraciones empleadas (**Figs. 22 y 23**). Por el contrario, en los microtúbulos de fibroblastos KO para la CCP1 se observó una disminución de la curvatura con todas las concentraciones empleadas (0,1 μM , $p < 0,05$; 0,5 μM , $p < 0,05$; 1,0 μM , $p < 0,05$; **Figs. 22 y 23**). No obstante, la administración de OEA no afectó a la curvatura de la trayectoria de los microtúbulos en ningún genotipo.

De este modo, la OEA también parece afectar a la propia estructura de los microtúbulos en animales KO para la CCP1, asemejándola a la de los microtúbulos silvestres.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL CEREBELO DEL RATÓN PCD

A lo largo de los años el proceso degenerativo de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD ha sido caracterizado por diversos autores (Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2011a, 2011b). Esto ha llevado a establecer dos periodos claramente diferenciados: 1) un proceso pre-neurodegenerativo, de P15 a P18, donde únicamente se han descrito alteraciones nucleares y citológicas de las células de Purkinje, y 2) un proceso neurodegenerativo, de P18 a P45, en el que se produce la muerte de estas neuronas (Baltanás et al., 2011b). Además, estudios previos han demostrado la existencia de procesos de muerte celular tanto de granos como de pequeñas poblaciones de oligodendrocitos en el cerebelo del ratón PCD (Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2013). Sin embargo, estos estudios se han llevado a cabo a edades que podemos considerar tardías, una vez finalizada la muerte de las células de Purkinje. De este modo, como objetivo de la presente Tesis

Resultados

Doctoral nos hemos propuesto analizar el efecto de la mutación *pcd* en el desarrollo morfológico de las células de Purkinje -por su importancia en la función cerebelosa-, y analizar la posible muerte de otras poblaciones neuronales del cerebelo a lo largo del proceso de desarrollo y la degeneración de dichas células de Purkinje.

Desarrollo morfológico de las células de Purkinje

Dada la importancia de las células de Purkinje en el procesamiento de información en el cerebelo, uno de los objetivos planteados fue el estudio de su desarrollo morfológico. Además, esto nos permitiría una mejor comprensión del proceso de muerte de las células de Purkinje en el ratón PCD. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de alteraciones morfológicas a partir de P15 en el grosor (P15, $p < 0,01$; P17, $p < 0,01$; P30, $p < 0,01$) y la longitud (P17, $p < 0,01$; P22, $p < 0,05$; P30, $p < 0,01$) de la dendrita primaria de las células de Purkinje de los animales mutantes (**Fig. 24**). Estas diferencias fueron exacerbándose con el tiempo, de manera que a partir de P22 se detectaron también cambios en la longitud del árbol dendrítico (P22, $p < 0,05$; P30, $p < 0,05$) y del tamaño del soma (P22, $p < 0,05$; P30, $p < 0,01$; **Fig. 24**) de estas neuronas. De este modo, las alteraciones morfológicas suceden de manera progresiva, iniciándose en la dendrita primaria durante la pre-neurodegeneración para expandirse posteriormente al árbol dendrítico completo y al soma de las células de Purkinje.

Proceso de muerte neuronal

Con el objetivo de caracterizar el progreso de la muerte de las diferentes poblaciones celulares en el cerebelo del ratón PCD se llevó a cabo la técnica de TUNEL. Los resultados obtenidos mostraron un aumento del número de células apoptóticas en las tres capas del cerebelo del ratón PCD en comparación con los animales silvestres a P22 (capa molecular, $p < 0,05$; capa de las células de Purkinje, $p < 0,01$; capa de los granos, $p < 0,01$) y a P30 (capa molecular, $p < 0,05$; capa de las células de Purkinje, $p < 0,01$; capa de los granos, $p < 0,01$; **Fig. 25**); es decir, en la fase degenerativa. En la etapa pre-neurodegenerativa no se detectaron diferencias entre los dos genotipos. Con la intención de identificar la naturaleza de las células en apoptosis se combinó la técnica de TUNEL con la de inmunofluorescencia para NeuN y parvalbúmina. También se emplearon marcadores para Iba1 y GFAP para comprobar una posible naturaleza glial. No todas las células apoptóticas expresaron un segundo marcador, observándose únicamente co-localización de células positivas para TUNEL con marcadores neuronales y en ningún caso con los marcadores gliales utilizados. Aunque no se puede descartar la muerte de otros tipos celulares, así como la pérdida de inmunorreactividad para algunos marcadores, parece que la

muerte neuronal en el cerebelo del PCD es mayor y más prematura de lo que se pensaba (ver Discusión).

Expresión del sistema endocannabinoide

En los últimos años el sistema endocannabinoide ha ido adquiriendo una relevancia cada vez mayor en procesos de desarrollo y de muerte neuronal (Fride, 2008; Basavarajappa et al., 2009; Fowler et al., 2010; Rossi et al., 2010). Por eso, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar su expresión en el ratón PCD a lo largo del desarrollo postnatal del cerebelo. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión de los receptores CB1 a lo largo de este proceso no se vio afectada en el ratón mutante PCD. Así, ya a partir de P7 se observó una expresión de receptores CB1 bastante alta en la capa molecular del cerebelo, tanto en animales silvestres como PCD, que se mantuvo a todas las edades analizadas. A partir de P15 estos receptores comenzaron a expresarse también alrededor del soma y el segmento inicial del axón de las células de Purkinje, indicándonos el comienzo del desarrollo de la “formación de *Pinceaux*”, lo que concuerda con estudios anteriores (**Fig. 26**; Buttermore et al., 2012). Una vez completamente formada -a P20-, la “formación de *Pinceaux*” se mantiene en dicha posición, y curiosamente en el ratón mutante PCD se observó que la estructura inmunorreactiva para CB1 se mantuvo tras la muerte de las células de Purkinje (**Fig. 26**). Sin embargo, no podemos saber si se debe a que la “formación de *Pinceaux*” tiene una alta estabilidad o a que se ha perdido el marcaje para las células de Purkinje y están en las últimas etapas de muerte celular, como discutiremos con mayor profundidad más adelante.

Con respecto a los receptores CB2, los datos obtenidos indicaron que su expresión es muy débil durante las primeras semanas de desarrollo postnatal, tanto en animales silvestres como PCD. Así, su expresión comenzó a ser detectable sólo a partir de P17 en la capa molecular, en ambos genotipos (**Fig. 27**). Con respecto al ratón mutante PCD, se observó un claro aumento en la expresión de estos receptores durante el proceso neurodegenerativo, lo que nos indica una alta relación entre la expresión de receptores CB2 y el proceso de muerte neuronal. Teniendo en cuenta su patrón de expresión –fibras longitudinales en la capa molecular- se llevó a cabo una inmunofluorescencia doble con anticuerpos contra S-100 (que marca específicamente la glía de Bergmann en el cerebelo) y CB2. Los resultados mostraron la co-localización del marcaje de CB2 con fibras positivas para S-100, lo que permitió identificar a las fibras de la glía de Bergmann como la principal fuente de expresión de receptores CB2 en el cerebelo (**Fig. 27**).

Finalmente, se analizó la expresión de los receptores PPAR α a lo largo del desarrollo postnatal del cerebelo. En ambos genotipos se observó una alta expresión de receptores

Resultados

PPAR α en las tres capas de la corteza cerebelosa a lo largo de todo este desarrollo (**Fig. 26**). La cuantificación del porcentaje de células de Purkinje que expresan receptores PPAR α indicó un aumento significativo en los animales PCD a partir del comienzo del proceso pre-neurodegenerativo (P15, $p < 0,01$; P17, $p < 0,01$; P22, $p < 0,01$). Sin embargo, a P30 se produjo un descenso en dicho porcentaje en el ratón PCD, igualándose a los animales silvestres (**Fig. 26**). El aumento en la expresión de receptores PPAR α podría estar relacionado con cambios plásticos en las células de Purkinje para intentar frenar la muerte neuronal.

Una vez demostrada y caracterizada la expresión de los receptores PPAR α en las células de Purkinje del cerebelo, tanto en ratones silvestres como mutantes PCD, se comenzó con la administración de OEA, agonista endógeno de dichos receptores.

Efecto de la administración de OEA en la morfología de las células de Purkinje

Con el objetivo de estudiar el efecto de la OEA en el proceso de muerte neuronal del ratón PCD, se llevaron a cabo tres tratamientos diferentes: 1) administración aguda a P14, 2) administración aguda a P16 y 3) administración continua desde P7 hasta P21. Asimismo, para cada uno de estos tratamientos se usaron 3 dosis diferentes: 1, 5 y 10 mg/kg, además del tratamiento con solución salina a los sujetos controles.

Uno de los efectos hallados en el estudio del desarrollo del cerebelo es la alteración de la morfología de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD de manera previa a la muerte neuronal. Por ello, el efecto de la administración de OEA se valoró analizando dicha morfología. Los resultados generales obtenidos mostraron que la OEA es capaz de prevenir las alteraciones morfológicas observadas en el ratón PCD. Con respecto al tratamiento continuo de OEA -desde P7 hasta P21-, se observó que las dosis de 10 y 5 mg/kg tuvieron un efecto preventivo en todas las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje analizadas, salvo en el acortamiento del árbol dendrítico donde sólo se observó un efecto preventivo con dosis de 10 mg/kg (**Fig. 28**). Del mismo modo, el tratamiento agudo de OEA a P14 tuvo un efecto preventivo de dichas alteraciones a dosis de 10 y 5 mg/kg (**Fig. 28**). Finalmente, en relación al tratamiento agudo a P16, únicamente la dosis de 10 mg/kg tuvo un efecto preventivo en las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje, aunque la extensión del árbol dendrítico no se vio afectado. Además, independientemente del tipo de tratamiento, la dosis de 1 mg/kg no afectó a ninguno de los parámetros morfológicos analizados (**Fig. 28**; ver resumen en **Tabla 4**).

Resultados

	PCD	OEA P7-P21			OEA P14			OEA P16		
	Control	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Grosor dendrita primaria	1.97 ± 0.31	2.41 ± 0.10	3.06 ± 0.30	3.56 ± 0.32	2.38 ± 0.22	2.40 ± 0.10	3.53 ± 0.32	2.38 ± 0.12	2.77 ± 0.51	3.61 ± 0.32
Longitud dendrita primaria	21.12 ± 2.38	24.39 ± 2.66	29.50 ± 3.31	33.31 ± 2.37	23.39 ± 2.15	28.58 ± 1.54	35.31 ± 2.37	23.83 ± 1.37	25.84 ± 2.14	32.31 ± 2.37
Tamaño soma	71.80 ± 13.11	82.07 ± 31.40	107.56 ± .23	135.79 ± 9.85	93.96 ± .00	111.25 ± 22.90	144.83 ± 5.53	86.57 ± 3.43	87.89 ± 27.85	145.04 ± 13.58
Extensión arborización dendrítica	84.59 ± 10.74	87.80 ± 11.02	91.80 ± 9.33	105.05 ± 5.11	91.02 ± 12.88	99.54 ± 7.31	104.98 ± 5.04	90.27 ± 4.08	100.04 ± 4.02	96.50 ± 7.33

Tabla 4: Resumen de los resultados obtenidos en el análisis del efecto de la OEA en la morfología de las células de Purkinje del cerebelo en animales mutantes PCD.

De este modo, la OEA consiguió estabilizar parcialmente la morfología normal de las células de Purkinje en el ratón PCD. Además, este efecto se produjo principalmente cuando la OEA se administró antes del comienzo de los cambios morfológicos, es decir con los tratamientos continuo y agudo a P14, actuando de forma preventiva.

Efecto de la administración de OEA en el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje del ratón PCD

En relación al tratamiento continuo -desde P7 hasta P21-, los resultados obtenidos mostraron que la administración de OEA tuvo un efecto paliativo únicamente cuando fue administrada a una dosis de 5 mg/kg ($p < 0,01$), es decir, con la dosis intermedia. Con respecto al tratamiento agudo a P14, se observó una mayor supervivencia de células de Purkinje sólo con la administración de OEA a una dosis de 10 mg/kg ($p < 0,05$). Sin embargo, el tratamiento agudo a P16 no tuvo ningún efecto en el proceso neurodegenerativo a ninguna de las dosis empleadas (Fig. 29). De este modo, parece ser que la OEA únicamente tiene un efecto neuroprotector cuando es administrada de manera previa al comienzo del proceso pre-neurodegenerativo, es decir que tendría un efecto preventivo, pero no paliativo de la muerte neuronal.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en relación a la administración de OEA en la degeneración cerebelosa del ratón PCD, parece que ésta mejoraría de forma generalizada las alteraciones morfológicas subyacentes, siendo más limitado su efecto en la muerte neuronal.

Efecto de la administración de OEA en la expresión de receptores endocannabinoides

Como se ha explicado anteriormente, el sistema endocannabinoide se ha relacionado ampliamente con procesos de desarrollo y muerte neuronal. Sin embargo, se desconoce el efecto que puede tener la administración de OEA en la expresión de los receptores endocannabinoides en el cerebelo durante procesos patológicos. En nuestro estudio, se observó que la OEA aumentó la expresión de receptores PPAR α a dosis de 5 y 10 mg/kg con los tres tipos de

Resultados

tratamiento utilizados y en ambos genotipos (**Fig. 30**), lo que concuerda con estudios previos (Zhou et al., 2012). Tal y como hemos indicado anteriormente, el aumento en la expresión de receptores PPAR α podría estar relacionado con cambios plásticos internos en las células de Purkinje. Por tanto, la neuroprotección observada podría estar mediada en parte por este aumento en la expresión de dichos receptores

Con respecto a los receptores CB1, no se observaron diferencias en su expresión derivadas de la administración de OEA en ningún grupo. Además, la OEA tampoco afectó a la propia "formación de *Pinceaux*", la cual se mantuvo intacta en todo el cerebelo a pesar de la muerte de las células de Purkinje, tal y como se observó durante el desarrollo postnatal (**Fig. 30**). Del mismo modo, la administración de OEA tampoco pareció alterar de forma cualitativa la expresión de receptores CB2. Si tal y como hemos indicado la expresión de los receptores CB2 puede ser un indicador neuroinflamatorio, la OEA no parece alterarlo.

ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DEL RATÓN MUTANTE PCD

Uno de los aspectos más controvertidos de las últimas décadas es la posible implicación del cerebelo en procesos cognitivos. Numerosos estudios han intentado resolver esta cuestión mediante diferentes modelos animales. Sin embargo, la falta de estudios a lo largo de un proceso degenerativo completo ha dificultado, a nuestro entender, comprender cómo el progreso de las alteraciones cerebelosas afecta también de manera progresiva a las funciones cognitivas. Teniendo en cuenta que durante el proceso degenerativo del cerebelo del ratón mutante PCD no existen alteraciones conocidas en otras estructuras del SNC, éste se vislumbró como un excelente modelo para abordar dicha cuestión. Además, la existencia de dos procesos diferenciados durante el desarrollo del cerebelo -pre-neurodegeneración y degeneración-, permitió saber cómo el desarrollo de estas alteraciones se relaciona con posibles cambios cognitivos.

Análisis de la prueba de rota-rod

Los resultados obtenidos mediante la prueba de rota-rod indicaron que la coordinación motora del PCD se ve afectada únicamente durante el proceso neurodegenerativo (P22, $p < 0,05$; P30, $p < 0,05$; **Fig. 31**). De este modo, parece ser que las alteraciones morfológicas halladas en las células de Purkinje durante el proceso pre-neurodegenerativo no afectan a procesos de coordinación motora, siendo necesaria la muerte de las mismas.

Análisis de la prueba de comportamiento en jaula

Esta prueba se llevó a cabo con el objetivo de analizar el comportamiento general del ratón PCD durante el desarrollo postnatal. Los resultados obtenidos indicaron que los animales PCD tienen un menor número de exploraciones durante el desarrollo, en comparación con los animales silvestres a todas las edades analizadas (P15, $p < 0,05$; P17, $p < 0,05$; P30, $p < 0,05$; **Fig. 31**). De este modo, parece ser que la exploración orientada al entorno ya se vio influida por las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje del cerebelo -y posteriormente por su muerte-. Asimismo, durante el proceso de muerte neuronal se produjo una disminución en el tiempo dedicado a las limpiezas en los ratones mutantes PCD (P22, $p < 0,01$; P30, $p < 0,01$; **Fig. 31**). Sin embargo, no se hallaron diferencias en el tiempo en movimiento general entre ambos genotipos a ninguna de las edades estudiadas (**Fig. 31**). Esto es importante, ya que nos permite asegurar que las pruebas llevadas a cabo no se vieron influidas por el incipiente movimiento atáxico de los animales PCD.

Análisis de la memoria de reconocimiento

La prueba de reconocimiento de objetos nos permitió estudiar el efecto de las alteraciones cerebelosas en la capacidad de reconocimiento de los ratones PCD. Tal y como cabría esperar, los resultados obtenidos mostraron que los animales silvestres pasaron un mayor porcentaje de tiempo explorando los objetos nuevos que los familiares a todas las edades analizadas (P17, $p < 0,05$; P22, $p < 0,01$; P30, $p < 0,01$; **Fig. 32**). Asimismo, a P17 y a P22 los animales PCD también presentaron un mayor porcentaje de tiempo explorando los objetos nuevos que el familiar (P17, $p < 0,01$; P22, $p < 0,01$; **Fig. 32**), mostrando que no hay alteraciones en la memoria de reconocimiento debido a las alteraciones morfológicas previamente descritas así como a las primeras etapas de muerte neuronal. Sin embargo, a P30 -con la pérdida de prácticamente todas las células de Purkinje- los mutantes PCD pasaron el mismo porcentaje de tiempo explorando el nuevo objeto que el familiar ($p > 0,05$), mostrando un déficit en la memoria de reconocimiento a esta edad (**Fig. 32**). Con el objetivo de descartar posibles efectos derivados de la afectación motora a P30, se analizó el número de visitas realizadas a ambos objetos, así como el tiempo medio de exploración de cada objeto en cada visita. No se observaron diferencias en el número de visitas derivadas del genotipo, indicándonos que la ataxia de los ratones mutantes PCD tampoco influyó en la prueba (**Fig. 32**). Más aún, el análisis del tiempo medio de exploración por visita mostró que los animales PCD estuvieron explorando ambos objetos la misma cantidad de tiempo en cada visita, al contrario que los silvestres ($p < 0,05$; **Fig. 32**). Por tanto, parece que los déficits hallados no se deben a alteraciones motoras, sino a la capacidad de los ratones mutantes para reconocer los objetos familiares.

Análisis del test de preferencia social

Este test se empleó para analizar la posible afectación del comportamiento social en el ratón mutante PCD, ya que las alteraciones de este comportamiento son uno de los parámetros más citados como afectados cuando existen alteraciones del cerebelo (Schmahmann et al., 2007; Tavano et al., 2007; Tsai et al., 2012). Los resultados obtenidos demostraron que los animales mutantes PCD pasaron la misma cantidad de tiempo explorando el compartimento con el animal intruso que el compartimento con el objeto, a diferencia de lo que ocurre con los animales silvestres (P15, $p < 0,05$; P17, $p < 0,01$; P22, $p < 0,01$; P30, $p < 0,01$; **Fig. 33**). Estos datos demuestran una clara afectación en la preferencia social de los ratones mutantes PCD a todas las edades analizadas. De este modo, las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje parecen ser suficientes como para alterar el comportamiento social de los ratones.

Efecto de la administración de OEA en la coordinación motora del ratón mutante PCD

Tal y como hemos ido viendo, la administración de OEA parece prevenir las alteraciones histológicas observadas en el ratón mutante PCD. Por tanto, uno de los objetivos ha sido estudiar su efecto en el comportamiento motor de estos animales mediante la prueba de rota-rod. Los resultados obtenidos demostraron que la administración de OEA no mejoró la coordinación motora de los animales PCD, sin importar la dosis o el tratamiento utilizados (**Fig. 34**). Por tanto, el efecto estabilizador y neuroprotector de la OEA –observado tanto en el citoesqueleto como en la histología cerebelosa- no parece reflejarse en la coordinación motora del ratón PCD.

DISCUSIÓN

Discusión

A lo largo del apartado anterior se han ido describiendo los resultados obtenidos en base a las diferentes técnicas y pruebas realizadas. Sin embargo, para facilitar una comprensión global de todo ello, se discutirán a continuación en base a los principales objetivos planteados: 1) efecto de la mutación *pcd* en la dinámica y estructura de los microtúbulos y su relación con el desarrollo del ratón mutante PCD, y 2) el efecto de la administración de OEA en estos mismos parámetros.

A modo de resumen, podemos decir que la mutación *pcd* afecta a la estabilidad y la estructura de los microtúbulos, lo que parece no alterar el desarrollo del cerebelo del ratón PCD en las primeras semanas postnatales. Sin embargo, una vez que la corteza cerebelosa está prácticamente formada –P15- comienzan a observarse los primeros signos de alteración en la morfología de las células de Purkinje y la expresión de los receptores PPAR α . Esto se ve reflejado en el comportamiento no motor de los mutantes PCD. Además, el progreso de las alteraciones cerebelosas y la muerte neuronal posterior influyen en el progreso de las alteraciones comportamentales, en este caso motoras y no motoras. Por tanto, entender dicho progreso parece ser fundamental para poder comprender la influencia del cerebelo no sólo en el comportamiento motor sino también en tareas no motoras de tipo cognitivo/afectivo.

Para estudiar más profundamente la relación entre el desarrollo del proceso degenerativo del ratón PCD y el sistema endocannabinoide se trató a los animales con un agonista endocannabinoide, la OEA. Se ha demostrado que esta molécula disminuye la muerte neuronal en distintas estructuras del SNC, lo que concuerda con nuestros resultados. Como hemos visto, la OEA parece estabilizar la dinámica y estructura de los microtúbulos. Precisamente, esta estabilización previene las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje en los animales PCD y en último término reduce su muerte.

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE OEA EN LA MUTACIÓN PCD

En los últimos años diferentes trabajos han observado que la administración de agonistas de los receptores PPAR α disminuyen la muerte neuronal y la neuroinflamación en modelos farmacológicos de degeneración (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014). Como hemos demostrado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, estos receptores parecen ser relevantes en el progreso de las alteraciones cerebelosas del ratón mutante PCD. El aumento en su expresión al comienzo del proceso pre-neurodegenerativo parece revelar cambios plásticos internos a las células de Purkinje que pudieran frenar el proceso de muerte neu-

Discusión

ronal. Sin embargo, se desconocía la relación entre el sistema endocannabinoide y el desarrollo del cerebelo de los ratones, así como en procesos de degeneración cerebelosa.

Tal y como hemos visto, la mutación *pcd* afecta a la estabilidad y la estructura de los microtúbulos, lo que altera el desarrollo normal del cerebelo de los animales mutantes. Sin embargo, la administración de OEA modifica la dinámica de los microtúbulos, tanto de células procedentes de animales silvestres como de KO para la CCP1 (análogos a los mutantes PCD). En primera instancia hay que remarcar que el efecto de la OEA fue exactamente el mismo en microtúbulos de animales silvestres que mutantes, aunque la concentración necesaria en el caso de los microtúbulos de animales PCD fue del doble. Precisamente, se sabe que la OEA afecta a la expresión de proteínas asociadas a los microtúbulos a través de la activación de los receptores PPAR α (Bento-Abreu et al., 2007), por lo que cabría esperar que el efecto de la OEA en la dinámica de los microtúbulos se deba a la unión de proteínas asociadas a los mismos. De acuerdo con esta idea, proteínas asociadas a los microtúbulos como MAP2 ó GAP43 (Illenberger et al., 1996; Drewes et al., 1998; Al-Bassam et al., 2002; Chakravarthy et al., 2008; Mishra et al., 2008) influyen enormemente en dicha dinámica. Por su parte, los trabajos publicados hasta el momento indican que la poliglutamilación influiría en la capacidad de las proteínas asociadas a los microtúbulos para unirse a éstos. Concretamente, se ha demostrado que la falta de poliglutamilación altera la unión de proteínas como MAP2 ó MAP1, entre otras (Bonnet et al., 2001; Ikegami et al., 2007). De este modo, teniendo en cuenta que la unión de proteínas a los microtúbulos se ve influida tanto por la afinidad de estas como por su concentración, al disminuir su afinidad se requerirán mayores concentraciones para contrarrestar ésta alteración. En consecuencia, el aumento en la concentración de OEA necesaria para afectar a la dinámica de los microtúbulos de fibroblastos mutantes se debería precisamente a alteraciones en dicha afinidad. Así, este incremento en la concentración de OEA aumentaría la expresión y concentración de proteínas asociadas a los microtúbulos, normalizando su unión a los microtúbulos de animales mutantes para producir un efecto similar al caso de los silvestres. Por otro lado, la administración de OEA “endereza” la estructura de los microtúbulos de animales mutantes. Precisamente, se sabe que la proteína MAP2, cuya expresión aumenta por la administración de OEA (Bento-Abreu et al., 2007), endereza la estructura de los microtúbulos (Dye et al., 1993). De este modo, tanto el efecto de la OEA en la dinámica como en su estructura estarían mediados por la unión de proteínas asociadas a los microtúbulos.

Los efectos de la OEA en el análisis *in vitro* de los microtúbulos se traducen en los resultados obtenidos *in vivo*. Así, si bien no se consiguió una recuperación funcional patente en el comportamiento motor, la neuroprotección cerebelosa en el ratón PCD es evidente (ver más

adelante). Esta falta de efecto de la OEA en la función motora podría deberse a la prueba de rota-rod en sí misma. Hay que tener en cuenta que esta prueba únicamente permite diferenciar grandes alteraciones en la coordinación motora de los ratones (Buccafusco, 2001). Por tanto, se necesitarían pruebas más finas para tener una mejor comprensión del efecto de la OEA en la coordinación motora de los ratones mutantes PCD. Asimismo, se necesitaría diferentes tipos de pruebas con el objetivo de analizar diferentes parámetros motores (coordinación, marcha, destreza, etc.).

Efecto de la OEA en la expresión del sistema endocannabinoide

La administración de OEA incrementa la expresión de receptores PPAR α , lo que concuerda con estudios anteriores (Zhou et al., 2012). Además, tal y como hemos indicado anteriormente, este aumento podría estar relacionado en parte con la neuroprotección observada en los animales mutantes. Sin embargo, los receptores CB1 y CB2 no se ven afectados por esta administración. Como habíamos indicado anteriormente, la expresión de los receptores CB1 no se ve alterada en los animales mutantes a lo largo del desarrollo postnatal, indicando una alta estabilidad. Por tanto, no es extraño que la administración de OEA no cambie el patrón de expresión de los receptores CB1. En relación a los receptores CB2, aunque estudios previos han demostrado que la OEA disminuye la liberación de mediadores neuroinflamatorios (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio y Moratalla, 2014; González-Aparicio et al., 2014), parece que esto no afecta a la expresión de estos receptores. Sin embargo, tanto en relación a los receptores CB1 como a los CB2, sería necesario un análisis más exhaustivo para comprender mejor la posible influencia de la administración de OEA. Por tanto, la administración de OEA afecta de manera distinta a la expresión de los diferentes elementos del sistema endocannabinoide.

Efecto de la OEA en la morfología de las células de Purkinje

La estabilización de la estructura de los microtúbulos por parte de la OEA se traduce en mejoras en las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje observadas a lo largo del desarrollo del ratón PCD. Estudios previos han demostrado que la OEA afecta a la morfología de neuronas hipocámpales en cultivo a través de los receptores PPAR α , modificando la expresión de proteínas asociadas a los microtúbulos (Bento-Abreu et al., 2007). En nuestro caso hemos visto que este efecto de la OEA en la morfología neuronal ayuda a prevenir las alteraciones derivadas de la mutación *pcd* en las células de Purkinje. Además, este efecto preventivo se observa en todos los parámetros morfológicos estudiados. Teniendo en cuenta que los microtúbulos son la base de la morfología de las células, este efecto preventivo en las células de

Discusión

Purkinje podría estar relacionado precisamente con el efecto que tiene en la dinámica y estructura de los microtúbulos.

DESARROLLO DEL RATÓN MUTANTE PCD

Numerosos autores han tratado de entender la base del proceso neurodegenerativo del ratón mutante PCD a lo largo de los años (Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2011a; Díaz et al., 2012). A pesar de que se conoce desde hace tiempo que el gen afectado es el *Nna1*, relacionado con procesos de crecimiento axonal (Fernández-González et al., 2002), su función concreta permaneció desconocida hasta hace unos pocos años. En este sentido, se ha demostrado que este gen sintetiza la enzima CCP1 (Kalinina et al., 2007; Berezniuk et al., 2010), una carboxipeptidasa relacionada con la des-poliglutamilación de los microtúbulos (Rogowski et al., 2010). Esto implica que una base fundamental de las alteraciones en el ratón mutante PCD estaría precisamente en los defectos de dichos microtúbulos. Diversos autores han tratado de averiguar la función que tiene la poliglutamilación en la función de este componente del citoesqueleto. Así, se ha demostrado que la falta de poliglutamilación altera la unión de proteínas asociadas a los microtúbulos (Ikegami et al., 2007). Sin embargo, el efecto de esta poliglutamilación en la dinámica y estructura de los propios microtúbulos es aún desconocido.

La regulación de la poliglutamilación de los microtúbulos es esencial durante el desarrollo cerebeloso

Como muestran nuestros resultados, la poliglutamilación de los microtúbulos en fibroblastos de ratones KO para la CCP1 (PCD) hace que éstos tengan una dinámica más inestable, con una mayor velocidad de polimerización y frecuencia de catástrofes. Estudios previos han demostrado precisamente que en el cono axónico de las neuronas en crecimiento la dinámica de los microtúbulos es también más inestable, y su frecuencia de catástrofes se ve aumentada (Dent et al., 1999). Es decir, la dinámica de los microtúbulos PCD sería semejante a la de microtúbulos de neuronas en crecimiento. Por su parte, la estructura de los microtúbulos de animales mutantes es más curvada que la de los silvestres. En este sentido, se ha demostrado recientemente que la doblecortina es más afín a los microtúbulos de gran curvatura (Bechstedt et al., 2015). Hay que tener en cuenta que la asociación de esta proteína a los microtúbulos es esencial en procesos de migración y crecimiento neuronal, ambos relacionados con el desarrollo (Bechstedt y Brouhard, 2012; Fu et al., 2013). Por tanto, la poliglutamilación de los microtúbulos haría que éstos tuvieran también una estructura similar a la de microtúbulos de neuronas

en desarrollo. Es decir, la poliglutamilación favorecería el desarrollo neuronal, tanto por su efecto en la dinámica como en la propia estructura de los microtúbulos. De hecho, se ha demostrado que los animales KO para la CCP1 tienen niveles de poliglutamilación similares a los animales silvestres a edades tempranas (Rogowski et al., 2010), de ahí que el desarrollo cerebeloso inicial de los animales PCD sea similar al de los silvestres, al menos hasta P15. De acuerdo con esto, estudios previos han demostrado que a partir de P15 se produce un aumento en la expresión de la enzima CCP1 en el cerebelo de animales silvestres, que no tiene lugar en animales PCD (Baltanás et al., 2013), justo cuando finaliza el crecimiento de las células de Purkinje (White y Sillitoe, 2013). Por tanto, de acuerdo con la hipótesis planteada, al finalizar dicho crecimiento de las células de Purkinje (alrededor de P15) sería necesaria una disminución de la poliglutamilación, y por tanto una “reducción de su inestabilidad”. Es precisamente en este periodo cuando comienzan los primeros signos pre-neurodegenerativos en el ratón PCD, apoyando la idea de que la poliglutamilación impediría la estabilización de los microtúbulos necesaria en la maduración neuronal.

Efecto de la mutación *pcd* en las primeras semanas de desarrollo postnatal

El ratón mutante PCD nos ofrece la posibilidad de entender cómo las alteraciones microtubulares generan de manera progresiva alteraciones en la estructura del cerebelo. Como hemos visto, en la primera semana de desarrollo postnatal no observamos alteraciones histológicas en el cerebelo de los animales PCD. De este modo, parece que la inestabilidad observada en los microtúbulos de animales PCD no afectaría durante las primeras etapas de desarrollo postnatal. Esto concuerda precisamente con lo expuesto anteriormente, es decir, parece ser que la poliglutamilación de los microtúbulos sería necesaria durante las primeras etapas de desarrollo neuronal. Recordemos que es precisamente a P15 cuando se produce un rápido aumento en la expresión de la enzima NNA1/CCP1 en animales silvestres, dando así lugar a la des-poliglutamilación de los microtúbulos en animales silvestres (Baltanás et al., 2011a).

Estudios previos habían caracterizado el proceso degenerativo del ratón PCD en dos periodos: un primer periodo caracterizado por alteraciones nucleares en las células de Purkinje del cerebelo desde P15 hasta P18 (pre-neurodegeneración), y un segundo periodo en el que se produce la muerte de las células de Purkinje que va desde P18 hasta P45 (degeneración; Baltanás et al., 2011a).

Pre-neurodegeneración de las células de Purkinje

A lo largo del proceso pre-neurodegenerativo las células de Purkinje sufren alteraciones morfológicas en la dendrita principal. Recientemente se ha demostrado que cambios en la resistencia axial de las células de Purkinje, dependientes de la longitud y el grosor dendrítico, alteran su capacidad de integrar la información recibida (Bekkers, 2011). Del mismo modo, las corrientes internas de calcio se ven influidas por alteraciones morfológicas (Anwar et al., 2013). Por tanto, estas alteraciones morfológicas podrían estar originando defectos en la electrofisiología de las células de Purkinje, modificando así el funcionamiento del cerebelo, y por ende el comportamiento de los animales, sin que haya comenzado el proceso de muerte neuronal. Esto convierte a la morfología de las células de Purkinje en nuevo marcador pre-neurodegenerativo en el cerebelo (ver más adelante).

Durante este mismo periodo se produce un aumento en la expresión de receptores PPAR α en las células de Purkinje del ratón PCD. De acuerdo con estudios anteriores, la expresión de receptores PPAR α se relaciona con un enlentecimiento de la apoptosis (Genovese et al., 2005). Más aún, se ha demostrado que la activación de los receptores PPAR α disminuyen la muerte neuronal en modelos de degeneración (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014). Todo esto apoyaría la hipótesis de un aumento en su expresión debido a cambios plásticos internos a las células de Purkinje con objeto de frenar el proceso de muerte neuronal. Por otro lado, a estas mismas edades la expresión de los receptores CB1 se produce principalmente en la capa molecular del cerebelo en ambos genotipos. Asimismo, a partir de P15 los receptores CB1 marcan el comienzo del establecimiento de la “formación de *Pinceaux*”, tanto en animales silvestres como mutantes PCD, indicando una expresión normal de estos receptores sin cambios producidos por la mutación. Aunque la falta de más datos y de literatura previa no nos permite sacar conclusiones acerca de la situación de estos receptores en los animales PCD, el conjunto de alteraciones estructurales observadas en el cerebelo de estos animales nos lleva a pensar que este sistema de neurotransmisión se verá también afectado. Por su parte, los receptores CB2 comienzan a expresarse en el cerebelo a partir de P17 en ambos genotipos, por lo que tampoco parecen intervenir en este proceso, ya que no se hallaron diferencias durante el periodo pre-neurodegenerativo. Esto concuerda con datos anteriores en los que se ha relacionado extensamente la función de estos receptores con procesos de muerte neuronal y neuroinflamación, no con las etapas previas. (Howlett et al., 2002; Ashton y Glass, 2007; Benito et al., 2008)

Efecto de la pre-neurodegeneración en el comportamiento del ratón PCD

Las alteraciones en el cerebelo de los animales PCD durante el periodo pre-neurodegenerativo se ven reflejadas en su comportamiento, concretamente en déficits sociales y de exploración del entorno. Precisamente las alteraciones de estos dos parámetros han sido extensivamente relacionadas con defectos en el cerebelo (Pierce y Courchesne, 2001; Tsai et al., 2012; Sudarov, 2013). Sin embargo, nuestros datos demuestran por primera vez que las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje son suficientes como para modificar el comportamiento no motor, sin necesidad de pérdida neuronal. Esto, como ya hemos indicado, podría deberse al impacto que tienen estas alteraciones morfológicas en la fisiología de las células de Purkinje. Sin bien es cierto que la ablación puntual de contactos sinápticos recibidos por las células de Purkinje no afecta al comportamiento no motor (Galliano et al., 2013), en nuestro caso se vería afectada la capacidad de integración de la información de forma general. Es decir, teniendo en cuenta que las células de Purkinje suponen la única salida de información de la corteza cerebelosa, habría una alteración generalizada de la respuesta cerebelosa. Por tanto, aunque no se produce una muerte neuronal parece ser que son necesarias alteraciones más graves que la simple eliminación de contactos sinápticos puntuales en el cerebelo para alterar el comportamiento no motor.

Neurodegeneración de las células de Purkinje

Posteriormente, a partir de P18, comienza el proceso neurodegenerativo, durante el cual se produce una pérdida masiva de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD (Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2011a, 2011b, 2013). Además, se ha observado una disminución tanto en la densidad de granos como de neuronas de los núcleos cerebelosos profundos a edades más avanzadas, las cuales se consideran secundarias a la muerte de las células de Purkinje (Triarhou et al., 1987; Wang y Morgan, 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que la muerte de los granos ya comienza durante el propio proceso degenerativo de las células de Purkinje, y lo mismo ocurre con ciertas interneuronas de la capa molecular. Sin embargo, teniendo en cuenta que estudios anteriores han demostrado una disminución en la densidad neuronal del complejo olivar inferior –origen de las fibras trepadoras- a estas mismas edades (Wang y Morgan, 2007), resulta complicado con los datos actuales determinar si esta muerte es o no secundaria a la de las células de Purkinje. En cualquier caso, todos estos datos demuestran que la degeneración cerebelosa del ratón mutante PCD es mucho más grave de lo que se consideraba hasta el momento.

Discusión

Asimismo, durante este periodo degenerativo se mantiene la expresión de receptores PPAR α en las células de Purkinje de los animales mutantes superior al de los silvestres. Sin embargo, a P30 –cuando sólo quedan unas pocas células de Purkinje en el lóbulo X- se produce un fuerte descenso en su expresión. Como ya hemos indicado, el aumento de la expresión podría deberse a cambios internos en las células de Purkinje con el propósito de frenar el proceso neurodegenerativo. En relación al descenso observado a P30, hay que tener en cuenta que la abrupta disminución del número de células de Purkinje a esta edad podría estar alterando las mediciones del porcentaje. Por otro lado, al final del proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje ya no sería necesario este aumento, puesto que ya se ha producido una pérdida masiva. Por su parte, durante el proceso de muerte neuronal se observa un aumento en la expresión de receptores CB2 en la glía de Bergmann. Tanto los receptores CB2 como la glía de Bergmann se han relacionado principalmente con procesos inflamatorios (Suárez et al., 2005; Ashton y Glass, 2007; Benito et al., 2008; da Cruz-Höfling et al., 2009). Por tanto, este aumento en la expresión de CB2 sería reflejo del proceso neuroinflamatorio en el cerebelo del ratón mutante PCD. Curiosamente, la expresión de los receptores CB1 alrededor del soma y el segmento inicial del axón de las células de Purkinje no se ve afectada por la muerte de estas. Teniendo en cuenta la importancia de las células de Purkinje en el establecimiento de ésta formación sináptica, cabría esperar una retracción de todas las sinapsis tras su muerte. Por tanto, el mantenimiento de la “formación de *Pinceaux*” puede deberse a dos razones: que una vez formadas las sinapsis éstas sean suficientemente estables por sí mismas, o que realmente no se produzca la muerte de las células de Purkinje y sólo se pierda su inmunorreactividad para los marcadores habituales (Kawai et al., 1995; Hayashi et al., 2000; Ünal-Çevik et al., 2004) al menos en un primer término. La observación a microscopía electrónica de este tejido (datos preliminares, no mostrados) apuntan a la segunda explicación, o bien una combinación de ambas.

Efecto de la neurodegeneración en el comportamiento del ratón PCD

Como hemos visto, durante el periodo de muerte neuronal se produce un agravamiento de las alteraciones estructurales del cerebelo, así como las del sistema endocannabinoide. Esto se ve reflejado en las pruebas comportamentales, cuyas alteraciones se agravan a su vez de forma progresiva. De este modo, los cambios en el comportamiento social y en la exploración del entorno siguen manteniéndose durante esta etapa. Sin embargo, hay que destacar un aumento en la exploración de los animales mutantes PCD a P22, en pleno proceso de muerte neuronal, asemejando su comportamiento a los individuos silvestres. Como ya se ha explicado, a esta edad está finalizando la remodelación sináptica y estructural de las células de Purkinje

del cerebelo (Van Welie et al., 2011; White y Sillitoe, 2013), lo que afecta a su electrofisiología (Hockberger et al., 1989; McKay y Turner, 2005). Por tanto, esta remodelación podría reflejarse en un aumento de la capacidad exploratoria del entorno de los animales PCD de forma puntual. Por su parte, durante la fase degenerativa comienza a observarse una disminución en las limpiezas en los ratones mutantes. Los resultados obtenidos en trabajos anteriores en relación a la influencia del cerebelo en este comportamiento resultan contradictorios. Así, por un lado, estudios previos han sugerido que las alteraciones cerebelosas podrían causar un incremento en este comportamiento (Martin et al., 2010; Tsai et al., 2012). Sin embargo, otros estudios han hallado disminuciones en las limpiezas debido a alteraciones cerebelosas (Pierce y Courchesne, 2001; Donald et al., 2008; Lotta et al., 2014). Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en las distintas fases de pérdida neuronal, estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse por las diferencias en las alteraciones cerebelosas entre los distintos modelos empleados. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que durante la ejecución de las limpiezas se requiere la activación tanto de las células de Purkinje del cerebelo como de los granos (Hartmann y Bower, 2001). Sin embargo, estos mismos autores consideran que la información que procesan ambos tipos neuronales es diferente. Así, la activación de los granos sería responsable del procesamiento táctil y no tanto del movimiento, lo que influiría en la adquisición de información sensorial (Hartmann y Bower, 2001). Por tanto, la afectación de las limpiezas variará en función de si las alteraciones cerebelosas afectan a uno sólo de estos tipos neuronales o a ambos. En el caso de los animales mutantes PCD hemos visto que se produce una afectación neuronal generalizada, por lo que, tal y como hemos visto, las limpiezas también se verán alteradas de manera generalizada.

Por último, al final del proceso de muerte celular -P30-, cuando se ha producido la pérdida de prácticamente todas las células de Purkinje, hay alteraciones en la memoria de reconocimiento. Por tanto, esta pérdida neuronal en el cerebelo afectaría a la capacidad de reconocimiento de los animales. De acuerdo con esto, estudios clínicos de neuroimagen han demostrado que diferentes áreas del cerebelo se activan durante tareas relacionadas con la memoria y el reconocimiento (Weis et al., 2004; Durisko y Fiez, 2010). Sin embargo, se ha visto que esta activación es muy reducida, por lo que la influencia del cerebelo sería muy limitada (Weis et al., 2004). Esto concuerda con el hecho de que únicamente se observan alteraciones cuando se ha producido la muerte de la práctica totalidad de las células de Purkinje. Es decir, dada la limitada influencia del cerebelo en la memoria de reconocimiento, sería necesario un deterioro de gran magnitud para que dicho comportamiento se vea alterado, tal y como ocurre en los animales mutantes PCD, pero ya a P30.

Discusión

A modo de resumen, los defectos en la poliglutamilación de los microtúbulos en el ratón mutante PCD aumentan la inestabilidad de los microtúbulos al tiempo que alteran su estructura. Esto va a afectar a la fase final del desarrollo de las células de Purkinje, desencadenando el proceso neurodegenerativo del ratón PCD. Además, ciertos elementos del sistema endocannabinóide van a verse afectados, y sus alteraciones van a ir progresando al tiempo que los defectos en el cerebelo. Finalmente, este conjunto de alteraciones va a tener un impacto en el comportamiento de los animales mutantes, principalmente en el comportamiento social y la exploración del entorno. A medida que las alteraciones cerebelosas van progresando los defectos en el comportamiento se agravan, produciéndose a P30 una afectación generalizada del mismo.

Efecto de la OEA en el proceso neurodegenerativo del ratón PCD

A lo largo de los últimos años la función que más se ha destacado de la OEA en el SNC es su efecto neuroprotector en procesos degenerativos (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio y Moratalla, 2014). Hasta ahora, todos los estudios al respecto se han llevado a cabo en modelos de degeneración inducidos farmacológicamente a los cuales se les administraba la OEA previamente. Sin embargo, se desconoce por completo el efecto que podría tener la administración de esta sustancia en modelos de degeneración no inducidos, y tampoco se conoce su efecto en la muerte neuronal del cerebelo. En nuestro caso, los resultados obtenidos van más allá y demuestran que la OEA mejora la supervivencia de las células de Purkinje en el cerebelo del ratón PCD, es decir en un modelo no inducido. Más concretamente, el efecto neuroprotector se produce únicamente cuando se administra esta sustancia de manera previa al comienzo del proceso degenerativo, es decir, con las administraciones continua –desde P7 hasta P21- y aguda a P14. Es más, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral era caracterizar este efecto con diferentes tipos de administración y dosis. Así, la administración aguda a P14 de OEA requiere dosis más altas -10 mg/kg- que la administración continua -5 mg/kg- para ejercer un efecto neuroprotector. Hay que tener en cuenta que en la administración continua se realizan 15 inyecciones de OEA, mientras que en la aguda se realiza un único pinchazo. Por tanto en la administración continua se administra de forma global una mayor cantidad de OEA. De ahí que la dosis a la que se note un efecto sea la de 5 mg/Kg, que la dosis menor de 1 mg/Kg no sea suficiente y que la dosis mayor de 10 mg/Kg sea excesiva, observándose un efecto típico de U invertida, como se ha descrito previamente (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio y Moratalla, 2014). Por su parte, la administración aguda a P14, al tratarse de una sola inyección, requiere una dosis más elevada (10 mg/Kg) para ejercer un efecto. En este caso, aunque no podemos describir un efecto en U invertida como con la administración con-

Discusión

tinua, hay que tener en cuenta que el efecto neuroprotector se produce con la dosis más alta. Por tanto, serían necesarias dosis mayores para poder observar un efecto similar en la administración aguda a P14.

A modo de resumen podemos decir que la administración de un agonista endocannabinoide -la OEA- previene las alteraciones de los microtúbulos, las malformaciones neuronales y la muerte neuronal en el cerebelo de animales mutantes. Por tanto, el sistema endocannabinoide parece desempeñar un papel muy importante en el progreso de procesos de muerte neuronal, aunque no todos sus elementos parecen tener la misma relevancia.

CONCLUSIONES

Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral, así como los resultados obtenidos y su discusión posterior, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- I. El exceso de poliglutamilación en los microtúbulos afecta a su dinámica y a su estructura, probablemente por la unión de proteínas asociadas a los microtúbulos, haciéndolos más inestables.
- II. La dinámica de los microtúbulos influye en el desarrollo normal de las células de Purkinje y en el desarrollo morfológico y funcional del cerebelo.
- III. Las alteraciones cerebelosas en el PCD afectan de manera progresiva a la expresión de elementos del sistema endocannabinoide. Asimismo, ese conjunto de alteraciones modifica no sólo el comportamiento motor, sino también procesos cognitivos y afectivos.
- IV. La administración de OEA promueve la estabilidad de los microtúbulos, lo que se traduce en una recuperación de las alteraciones morfológicas y en una neuroprotección en el proceso degenerativo que tiene lugar en el cerebelo del mutante PCD.

ENGLISH SUMMARY

Neural plasticity in motor control centers: analysis of the endocannabinoid system in the cerebellum of the PCD mouse

-Summary of Doctoral Thesis-

RODRIGO MUÑOZ CASTAÑEDA

Salamanca, September 2015

INTRODUCTION

Historically, the cerebellum has been associated mainly with motor control (Ito, 2002; Glickstein et al., 2009). However, different authors have reported a relationship between cerebellar function and both cognitive and affective processes (Schmahmann y Sherman, 1998; Schmahmann et al., 2007; Tavano et al., 2007; Hoppenbrouwers et al., 2008; Strick et al., 2009; Tsai et al., 2012; Sudarov, 2013). Also, clinical evidence of cerebellar activation during non-motor tasks has been also demonstrated (Piven et al., 1992; Allen et al., 1997, 2004; Allen and Courchesne, 2003; Fatemi et al., 2012). Moreover, some psychiatric disorders such as autism, schizophrenia or Niemann-Pick disease have been linked to cerebellar impairments (Armstrong, 2001; Joseph et al., 2002; Walkley and Suzuki, 2004; Bauman and Kemper, 2005; Andreasen and Pierson, 2008). Despite the increasing weight of the evidence, the role of the cerebellum in cognitive and affective processes is not still widely accepted (Glickstein et al., 2009). In this sense, regardless of all data supporting this hypothesis it has been noticed that not all subjects diagnosed with those psychiatric disorders related to cerebellar impairment have been observed to exhibit cerebellar alterations (Daum and Ackermann, 1995; Timmann and Daum, 2010). Moreover, in animal models single-synapsis alterations of Purkinje cell (PCs) inputs have no effect on non-motor tasks (Galliano et al., 2013). By contrast, specific genetic alterations of PCs induce their degeneration and autism-like behaviour in mice (Tsai et al., 2012).

The endocannabinoid system has been shown to be essential for cerebellar function (Casu et al., 2005; Carey et al., 2011). Cannabinoid receptors types 1 (CB1) are known to be the most widely expressed G-protein-coupled receptor in this structure (Kawamura et al., 2006). In other brain areas, CB1 receptors are essential during neuronal migration and development (Fride, 2008), but their role in cerebellar development is still unknown. Furthermore, endocannabinoid receptors other than CB1 have been related to different functions. In this sense, CB2 and peroxisome proliferator-activated receptors type α (PPAR α) modulate neuronal death and neuroinflammatory responses (Genovese et al., 2005; Benito et al., 2008). Specifically, the endogenous PPAR α agonist oleoylethanolamide (OEA) prevents neuronal death and neuroinflammation in animal models of neurodegeneration (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014; González-Aparicio and Moratalla, 2014).

The cytoskeleton is the basis of cellular shape and is composed of microfilaments, intermediate filaments, and microtubules. Microtubules are essential for normal neuronal devel-

Summary

opment and function, changing their structure and dynamics during cell development and maturation. Nevertheless, the effect and function of these structural and dynamic changes of microtubules are still not well understood. Microtubular alterations have been reported to underlie different psychiatric diseases (Andrieux et al., 2002; Maussion et al., 2008; Brown et al., 2014). However, their possible relationship with cerebellar-related psychiatric disorders remain to be elucidated. In this sense, the *Ccp1/Nna1* gene has recently been demonstrated to encode an enzyme responsible for the de-polyglutamylolation of microtubules (Rogowski et al., 2010). In fact, the PCD (*Purkinje cell degeneration*) mouse bears a mutation in this gene that induces a postnatal and selective degeneration of the PCs of the cerebellum, among other neuronal populations (Fernández-González et al., 2002; Wang and Morgan, 2007; Chakrabarti et al., 2008; Baltanás et al., 2011a, 2011b). This cerebellar degeneration has been characterized previously and can be divided into two different stages: 1) a pre-neurodegenerative process, with cytological and nuclear alterations in PCs from postnatal day 15 (P15) to P18; and 2) a degenerative process, from P18 to P45, in which all PCs die (Baltanás et al., 2011a, 2011b). Interestingly, at P30 -when most PCs have been lost- no other structure is affected (Wang and Morgan, 2007). Thus, the PCD mutant mouse represents a very good model to study the influence of the progressive cerebellar defects in both motor and non-motor tasks based on microtubular defects. This approach would allow possible differences in PCD behaviour related to different cerebellar defects along cerebellar development to be understood.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

The **hypothesis** of the present Doctoral Thesis is that “The *pcd* mutation produces structural alterations in PCs that affect the behaviour of PCD mice, the endocannabinoid system playing an essential role in PC development and death in such mice”.

The **main objective** of this Doctoral Thesis is to study how the different stages of the cerebellar disorder in PCD mice affect cognitive and affective processes, placing special emphasis on the endocannabinoid system. Further, because microtubular alterations are the basis of the *pcd* mutation, another aim is to understand the effect of increased polyglutamylolation on microtubule dynamics and structure. Finally, in order to gain a better understanding of the relationship of these cerebellar alterations with the endocannabinoid system, we shall administer the PPAR α agonist OEA as a putative neuroprotective substance, and we shall analyse its effects on the development of the cerebellar disorder and microtubule dynamics.

Summary

Thus, the **specific objectives** of the present Doctoral Thesis are:

- I. To study the neuronal plastic changes during the postnatal development of the PCD mouse.
 - I.a To study the effect of the *pcd* mutation on microtubule dynamics and structure.
 - I.b To analyse the expression of the endocannabinoid system along postnatal cerebellar development of the PCD mouse.
 - I.c To study the impact of the progression of cerebellar alterations on PCD behaviour.
- II. To study the effect of the endocannabinoid agonist OEA on cerebellar plasticity in the PCD mouse.
 - II.a To analyse the effect of OEA on microtubule dynamics and structure.
 - II.b To investigate the effect of OEA on cerebellar degeneration in PCD mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Infant and juvenile mice from the C57/DBA strain were employed (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA), both wild type (WT) and PCD. The animals were housed under conditions of constant room temperature and humidity, with a light/dark period of 12/12 hours, and were fed *ad libitum* at the animal facilities of the University of Salamanca. The animals were divided according to their genotype (WT or PCD) and the age of study. For immunohistological analyses, the ages employed were: P7, P15, P17, P22 and P30 (10 groups, n=4 per group), while for behavioural analyses they were P15, P17, P22 and P30 (8 groups, n=8-9 per group).

All animals were housed, handled and sacrificed according to the guidelines established by European (2010/63/UE) and Spanish (RD53/2013, Law 32/2007) legislation. The Bioethics Committee of the University of Salamanca approved all procedures.

Mouse genotyping

Since PCD animals are not fertile, mice heterozygous for the PCD mutation (*+/*pcd**) were mated, and new-born mice were genotyped as described previously (Baltanás et al., 2011a). Briefly, DNA was extracted from a tail sample of the mouse, after which a PCR was carried out for two microsatellites of the *Nna1* gene (D13Mit250 and D13Mit283), which is defective in PCD mice. Since these microsatellites have different molecular weights for the mutant and wild

Summary

type alleles, they were separated by electrophoresis in 3% (w/v) agarose gel to identify the genotype of the animals.

Tissue extraction and preparation

The animals were anesthetized with a 5% w/v mixture of chloral hydrate in 0.9% NaCl (w/v). Tissue fixation was carried out with Somogyi's fixative without glutaraldehyde (5 ml/g body weight). Then, they were perfused intracardially with 0.9% NaCl before the infusion of Somogyi's fixative. After perfusion, brains were post-fixed for 2 hours in the same fixative. Then, tissue was washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, and immersed in 30% sucrose in PB (w/v) overnight. Cerebella were sectioned sagittally at 30 μ m thick on a freezing microtome (Leica Jung SM 2000, Nussloch, Germany) and washed in phosphate buffer, pH 7.3.

Immunofluorescence

For immunofluorescence, sections from the cerebellar vermis were employed. Free-floating sections were incubated with the primary antibodies at 4 °C for 72 h. The incubation medium was made up of 0.1% Triton X-100 (w/v), 10% serum (v/v), and the corresponding antibodies diluted in PBS. The antibodies employed were mouse anti-calbindin (Cb-300k 1:1.000; Swant, Switzerland), rabbit anti-PPAR α (1:100; Pierce antibodies, Rockford, IL USA), guinea pig anti-CB1 (1:1.000; Frontier Institute, Hokkaido, Japan), goat anti-CB2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX USA), and mouse anti-S100 (1:500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Appropriate secondary antibodies conjugated with Cy2, Cy3 or Cy5 (1:500; Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) were used to reveal the primary antibodies. Finally, sections were counter-stained with DAPI (1:30.000; Sigma Aldrich) to identify all the nuclei.

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Fluorescein dUTP

Nick-End Labelling (TUNEL) detection

To study apoptosis along cerebellar development and cerebellar degeneration the TUNEL technique was employed as previously described (Díaz et al., 2012; Baltanás et al., 2013). Briefly, after washing in PBS (3 x 10 min), tissue sections were incubated in a solution of 0.2% Triton X-100 (v/v) and 0.1% sodium-citrate (v/v). Then, sections were washed in PBS (5 x 10 min) and incubated with the TUNEL reaction buffer containing terminal transferase (800 U/ml; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and biotinylated dUTP (1 μ M; Roche Diagnostics). To determine that apoptotic cells were also neurons, the TUNEL technique was combined with immunohistochemistry against NeuN. After the procedures for the TUNEL technique, sections were incubated with NeuN antibody (1:8.000; Merck Millipore, Darmstadt, Germany) as de-

Summary

scribed above. Finally, both techniques (TUNEL and immunohistochemistry) were revealed by using Cy2-streptavidin and Cy3-secondary antibodies, respectively.

Quantification of the endocannabinoid receptors

Quantification of endocannabinoid receptors was carried out in sagittal sections of the vermis. Four sections from each animal were employed to obtain the mean value. Regarding PPAR α receptor expression, the percentage of PCs containing these receptors was determined. To avoid biases as much as possible, only those PCs with a noticeable nucleus (labelled with DAPI) were taken into account. CB1 and CB2 receptors were analysed qualitatively because of their diffuse expression in the cerebellum.

Morphological analysis of PCs

Morphological analysis of PCs was made in sections immunostained for calbindin at ages of P7, P15, P17, P22 and P30. The morphological parameters studied were selected on the basis on previous works and their importance for PCs function (Donald et al., 2008; Fujishima et al., 2012): 1) the length and width of the main dendrite, 2) the length of the dendritic arbour of PCs, and 3) the area of the soma. All morphological analyses were carried out with the Neurolucida (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) and ImageJ software, as previously described (Donald et al., 2008).

Behavioural analyses

Behavioural analyses were performed at P15, P17, P22 and P30 to assess the influence of both the pre-neurodegenerative (P15-P18) and neurodegenerative (P18-P30) processes of the PCs of PCD mice in social and cognitive behaviour. All devices employed were cleaned with 96% ethanol before and after each session.

The *rota-rod test* was used to characterize motor coordination. It was performed as previously described (Muñoz-Castañeda et al., 2013), with an acceleration of 0.6 rpm/s, from 4 to 40 rpm, in 10 minutes.

The *home-cage behaviour analysis* was employed to characterize the general behaviour of the animals in a non-stressing environment. Briefly, the animals were placed in the home-cage for 10 minutes each day, allowing them to explore it and become habituated. Following this, animals were recorded for 10 minutes to analyse the following parameters manually: 1) time of grooming, as an indicator of stereotyped behaviour; 2) time of rearing, to analyse environmental exploratory behaviour and 3) time of walking, to analyse the general movements of

Summary

the mice. Each animal was assigned to an individual home-cage, thus avoiding possible influences due to the odour of the other animals.

The *novel object recognition test* (NOR test) was used to analyse recognition memory. It was performed in the same home-cage as the home-cage behaviour analysis, thus ensuring the animals' habituation to the device. On the first day (P15) the animals were placed in the home-cage with two identical objects (A-A) for ten minutes. Then, on each session day animals were placed in the home-cage with the familiar object (A) and a new object each day (B for P17, C for 22 and D for P30). The objects were placed in opposite corners of the cage, and the position of the familiar and the new object was balanced within groups to avoid biases deriving from the possible preferences of the animals. The percentage of time spent by the mice in interacting with each object was measured for each animal at each age.

The *social preference test* was performed in a white Plexiglas® box (50 x 29 cm) divided into three compartments (16.67 x 29 cm), as previously described (Crawley, 2004; Panksepp and Lahvis, 2007; Silverman et al., 2010). Briefly, on each test day the animals were placed in the central compartment of the arena and were allowed to explore the device for 10 minutes. Then, animals were removed from the device and a mouse was placed in one lateral segment of the device and an object in the other one, both the mouse and object inside a barred pencil holder. To avoid possible biases deriving from room preference, the place of the object and the intruder was balanced within groups. The percentage of time spent by the animals in each lateral room and exploring each pencil holder was analysed as an indicator of social preference.

Cell culture and transfection

For *in vitro* analysis of microtubules, WT and CCP1-KO mouse embryonic fibroblasts (MEFs; three different embryos for each genotype) were employed. The latter were employed as model of PCD microtubules (Rogowski et al., 2010). MEFs were prepared as previously described (Erck et al., 2005). For transfection, MEF Nucleofector kits were employed (Amaxa Biosystems), with GFP-EB3 (provided by N. Galjart, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands) and m-cherry α -tubulin (provided by F. Saudou, Institut Curie, Paris, France) plasmids. GFP-EB3 transfection was employed to visualize microtubules (+)-end, and m-cherry α -tubulin to visualize the entire microtubules.

Video microscopy

Time-lapse videos of transfected MEFs were captured with an inverted microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss, Inc.) and a 100× NA 1.3 Plan-Neofluar oil objective controlled automatically by MetaMorph software (MDS Analytical Technologies). Images were taken every three seconds over 5 minutes. All fluorescent images were captured with a charge-coupled device camera (CoolSNAP HQ; Roper Scientific).

Microtubules dynamics and structure analysis

To study microtubule dynamics, the plusTipTracker software (Matov et al., 2010) was used to analyse GFP-EB3 time-lapse video images. We first adjusted the accuracy of GFP-EB3 comet detection and analysed the following parameters: growth and shrinking speed, growth and shrinking mean length, percentage of time in pause, growing and shrinking, distribution of microtubules based on their speed and length (slow and short, slow and long, fast and short and fast and long), frequency of catastrophes (changes from growing to shrinking) and frequency of rescues (changes from shrinking to growing). Parameters were chosen based on previous studies (Peris et al., 2009; Matov et al., 2010; Applegate et al., 2011). To ensure the accuracy of the analyses we compared the growing speed data obtained both automatically and manually.

Microtubule curvature analysis was carried out with the images obtained in the time-lapse video for m-cherry α -tubulin. In all cases the first image of each video was used to analyse the curvature. Moreover, with the GFP-EB3 labelling it was possible to obtain the maximum projection of the entire time-lapse video, allowing us to reconstruct the trajectories of the comets, whose curvature was also analysed. In sum, the curvature of microtubules was analysed both in a static way and according to their trajectory of movement.

Curvature was analysed with self-written software for the Mathematica program language (Wolfram Research Europe, U.K.). We first obtained the equation of each microtubule with a spline cubic interpolation. Then, the general formula of curvature was used to analyse the curvature of each microtubule:

$$k = \frac{x'y'' - y'x''}{(x'^2 + y'^2)^{3/2}}$$

where

Summary

$$x' = \frac{dx}{dt}, \quad x'' = \frac{d^2x}{dt^2}, \quad y' = \frac{dy}{dt}, \quad y'' = \frac{d^2y}{dt^2},$$

i.e., the first (x' , y') and second (x'' , y'') derivatives at each point t of the function obtained from the spline cubic interpolation.

OEA administration

For *in vivo* analysis, the OEA solution, it was freshly prepared each day of administration. It was first diluted in ethanol 100% and thereafter reduced with distilled water to the final dilution. OEA was administered i.p. at doses of 1, 5 and 10 mg/kg. Furthermore, three different treatments were used: 1) continuous administration from P7 to P21, 2) acute administration at P14 and 3) acute administration at P16. Thus, nine different administrations were employed per genotype plus the control groups (administered with saline). To analyse the effect of OEA on PCD postnatal cerebellar development and degeneration all animals were sacrificed at P30 and the tissue was processed as described above.

For *in vitro* analyses of OEA on microtubule dynamics and structure, OEA was diluted in dimethyl-sulphoxide and stored at -80°C until use. It was administered after cell transfection at concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 μM .

Statistical analysis

For the analysis of the postnatal cerebellar development of the PCD mouse a Student's *t*-Test was performed. For histological analysis, parameters of both genotypes were compared at each age. For behavioural analysis, the same statistical test was employed. The behavioural parameters analysed and the different confrontations of the variables are described in each behavioural procedure. All analyses were performed with SPSS statistical package software (IBM, NY, USA).

For the analysis of OEA effect, both *in vivo* and *in vitro*, an ANOVA was performed followed by the Dunnett's *C post hoc* analysis. Thus, each group was confronted with the control one. Both genotypes were analysed separately to understand the effect of OEA independently.

RESULTS

In vitro analysis of microtubule dynamics and structure

Although polyglutamylation has been widely suggested to influence the binding of microtubule-associated proteins, its effect on MTs dynamics has never been studied. To accomplish

Summary

this we used PCD MEFs, which are known to display an increase in polyglutamylated MTs. The results obtained revealed that the parameters affected by MTs polyglutamylation were the growth rate ($p < 0.05$) and catastrophe frequency ($p < 0.05$), both being increased in PCD MEFs (**Fig. 1**). Regarding MT curvature, our results showed that PCD MTs had an increased curvature ($p < 0.05$; **Fig. 1**). Also, the curvature of MTs trajectories was increased in PCD MTs ($p < 0.05$; **Fig. 1**). Thus, it seems that polyglutamylation increase the instability of MTs, also influencing their structure and movement.

Effect of OEA on microtubules dynamics and structure

Previous authors have demonstrated that OEA administration increases the expression of microtubule-associated proteins such as MAP2 and GAP43 in a PPAR α dependent manner (Bento-Abreu et al., 2007). Our results also showed that OEA modifies the dynamics and structure of microtubules. With respect to microtubule dynamics, OEA increased the growth and shrinking rates in both WT (growth rate, $p < 0.05$; shrinking rate, $p < 0.05$; **Fig. 2A**) and PCD (growth rate, $p < 0.05$; shrinking rate, $p < 0.05$; **Fig. 2B**) microtubules. However, the concentration required for this effect to be exerted was higher in PCD (1.0 μM) than in WT microtubules (0.5 μM). Moreover, the mean growth and shrinking lengths were also increased in both genotypes, and with the same concentrations (see **Table 1**). WT microtubules underwent a decrease in the percentage of time growing ($p < 0.05$) and an increase in the percentage of time in pause ($p < 0.05$). However, no effect on these parameters was seen in PCD microtubules (see **Table 1**). Moreover, regarding microtubule structure, OEA decreased PCD microtubule curvature at all concentrations employed (OEA 0.1 μM , $p < 0.05$; OEA 0.5 μM , $p < 0.05$; OEA 1.0 μM , $p < 0.05$, **Fig. 3**). By contrast, no effect was seen on microtubule trajectory curvature (**Fig. 4**).

Thus, OEA seems to partially stabilize PCD microtubules. According to previous studies, this effect may derive from the influence of OEA on microtubule-associated protein expression. Furthermore, the OEA concentration required for both WT and PCD microtubules to be affected was greater in the latter, indicating a possible relation of PCD microtubule architecture with MAP binding.

Summary

	WT				PCD (CCP1 KO)			
	Control	OEA 0.1	OEA 0.5	OEA 1.0	Control	OEA 0.1	OEA 0.5	OEA 1.0
Growth rate	10.62 ± 0.34	15.30 ± 1.56 *	16.55 ± 1.26 *	13.67 ± 0.92	14.20 ± 1.69 #	13.46 ± 0.81	15.95 ± 1.38	21.73 ± 2.64 *
Shrinking rate	16.24 ± 1.67	23.46 ± 4.28	29.61 ± 2.34 *	23.30 ± 1.69	21.90 ± 2.51	14.41 ± 4.95	26.77 ± 2.73	38.34 ± 4.78 *
Growth length	2.66 ± 0.10	3.15 ± 0.19	3.81 ± 0.26 *	3.29 ± 0.24	2.72 ± 0.14	2.68 ± 0.10	2.72 ± 0.12	3.58 ± 0.33 *
Shrinking length	1.73 ± 0.18	2.18 ± 0.37	3.15 ± 0.31 *	2.76 ± 0.26 *	1.81 ± 0.15	1.15 ± 0.37	2.03 ± 0.14	3.19 ± 0.57 *
Catastrophe frequency	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.02 #	0.07 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.02
% Growing	92.05 ± 0.65	89.21 ± 1.10	88.47 ± 0.75 *	89.01 ± 1.18	91.20 ± 1.25	90.79 ± 1.31	90.81 ± 0.57	88.21 ± 1.02
% Shrinking	7.67 ± 0.63	10.46 ± 1.04	11.05 ± 0.08	10.64 ± 1.11	8.59 ± 1.19	9.13 ± 1.28	8.96 ± 0.50	11.41 ± 0.95
% Pause	0.28 ± 0.07	0.33 ± 0.09	0.48 ± 0.68 *	0.35 ± 0.09	0.22 ± 0.10	0.08 ± 0.03	0.23 ± 0.11	0.37 ± 0.10

Table 1: Microtubules dynamics results of both control and OEA administered WT and PCD microtubules. # Differences between control WT and PCD microtubules; $p < 0.05$. * Differences derived from OEA administration for each genotype; $p < 0.05$.

Morphological changes in the main dendrite of PCs begin during the pre-neurodegenerative process

Previous authors have identified nuclear changes in PCs during the pre-neurodegenerative process of the PCD mouse (Baltanás et al., 2011a). Our results indicated that the morphological changes in main dendrite width (P15, $p < 0.01$; P17, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$) and length (P17, $p < 0.05$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$) began during the same period, revealing a novel pre-neurodegenerative marker of PCs in the PCD mouse (**Fig. 5**). By contrast, changes in dendritic arbour length (P22, $p < 0.05$; P30, $p < 0.05$) and soma area (P22, $p < 0.05$; P30, $p < 0.01$) were restricted to the degenerative process (**Fig. 5**). Thus, morphological alterations of PCs increase gradually along the pre- and neurodegenerative processes of the PCD mouse.

Effect of OEA administration on PCs morphology

As stated above, the *pcd* mutation affects PC morphology progressively. Accordingly, we also analysed the effect of OEA administration on this progression. In this sense, our results showed that continuous administration of OEA –from P7 to P21– prevented morphological alterations of PCs at doses of 5 and 10 mg/kg, but not at 1 mg/kg (**Fig. 6**). Similarly, OEA administration at P14 also ameliorated these morphological defects with doses of 5 and 10 mg/kg, but not with 1 mg/kg (**Fig. 6**). However, when OEA was administered at P16, i.e. during the pre-neurodegenerative process, only the higher dose -10 mg/kg- prevented defects in PC morphology (**Fig. 6**). Thus, OEA administration seems to exert a preventive effect on PC morpho-

Summary

gy only when it is administered prior to the beginning of cerebellar alterations, this effect being milder when it is administered after them (see **Table 2**).

	PCD	OEA P7-P21			OEA P14			OEA P16		
	Control	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Main dendrite width	1.97 ± 0.31	2.41 ± 0.10	3.06 ± 0.30	3.56 ± 0.32	2.38 ± 0.22	2.40 ± 0.10	3.53 ± 0.32	2.38 ± 0.12	2.77 ± 0.51	3.61 ± 0.32
Main dendrite length	21.12 ± 2.38	24.39 ± 2.66	29.50 ± 3.31	33.31 ± 2.37	23.39 ± 2.15	28.58 ± 1.54	35.31 ± 2.37	23.83 ± 1.37	25.84 ± 2.14	32.31 ± 2.37
Soma size	71.80 ± 13.11	82.07 ± 31.40	107.56 ± .23	135.79 ± 9.85	93.96 ± .00	111.25 ± 22.90	144.83 ± 5.53	86.57 ± 3.43	87.89 ± 27.85	145.04 ± 13.58
Dendritic arbour length	84.59 ± 10.74	87.80 ± 11.02	91.80 ± 9.33	105.05 ± 5.11	91.02 ± 12.88	99.54 ± 7.31	104.98 ± 5.04	90.27 ± 4.08	100.04 ± 4.02	96.50 ± 7.33

Table 2: Effect of OEA administration at different doses on PCs morphology in PCD mice. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

TUNEL analysis revealed a general neuronal death in the cerebellum of PCD mice

Our results comparing both genotypes indicated that PCs began to die from P22 onwards, resulting in a neurodegenerative process (P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$; **Fig. 7**; (Baltanás et al., 2011a, 2013). Surprisingly, we observed that the degenerative process was not only restricted to PCs, other cell populations of the cerebellum also being affected (**Fig. 7**). Thus, neuronal death (TUNEL-positive cells) in both the molecular layer (P22, $p < 0.05$; P30, $p < 0.05$) and granular layer (P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$) occurred during the neurodegenerative process. The neuronal nature of apoptotic cells in the three cerebellar layers was confirmed with TUNEL/NeuN co-localization (**Fig. 7**). Conversely, during pre-neurodegeneration no differences in neuronal death were found between genotypes.

OEA administration prevents PCs death

One of the main objectives of the present study was to analyse the effect of OEA administration on the neurodegenerative process of PCs in the PCD mouse. Our results showed that continuous administration of OEA had a preventive effect on PC death at a dose of 5 mg/kg, but not with the lower and the higher doses, i.e. 1 and 10 mg/kg. Moreover, administration at P14 ameliorated this degeneration, but only with a dose of 10 mg/kg. However, when OEA was administered at P16 –when pre-neurodegeneration had already started- the treatment had no effect on PC death (**Fig. 8**). Thus, it seems that OEA administration prevents PCs death only when it is administered prior to the beginning of the cerebellar defects.

Changes in the endocannabinoid receptors expression during both pre- and neurodegenerative processes

Changes in cannabinoid receptors were detected during both the pre-neurodegenerative and the degenerative processes. PPAR α receptors were mainly detected in the nucleus of the different neural populations of the cerebellum in both genotypes. Also, the percentage of PCs expressing PPAR α receptors increased in the PCD mouse at the same time that as the morphological changes in dendrites appeared (P15, $p < 0.01$; P17, $p < 0.01$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$). Regarding CB1 receptors, their expression was similar in both genotypes (**Fig. 9**). At P7, CB1 receptors were expressed only in the ML of the cerebellum. In addition to this expression in the ML, CB1 receptors were also detected around the soma and the initial segment of the axon of PCs in both WT and PCD mice from P15 to P30 (**Fig. 9**). CB2 receptor expression co-localized in the cerebellum with glial cells, i.e. with S100-positive cells. In this sense, Bergmann glial processes in the ML are the main cell type expressing CB2 receptors (**Fig. 10**). Contrary to CB1 receptors, an increase in the expression of CB2 receptor expression was detected in the PCD mice during the neurodegenerative process (P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$), and the expression of PPAR α receptors seemed to increase as a result of the pre-neurodegenerative process and CB2 receptors as a result of the neurodegenerative process.

OEA administration changes endocannabinoid receptors expression

OEA administration changed the expression of the different endocannabinoid receptors in different ways. In this sense, the percentage of PCs expressing PPAR α receptors was increased with doses of 5 and 10 mg/kg, and was independent of the type of administration – from P7 to P21, at P14 or at P16-. Moreover, this effect on the expression of PPAR α receptors was seen in both WT and PCD mice (**Fig. 11**). By contrast, OEA administration did not affect the expression of either CB1 or CB2 receptors in any genotype.

Motor coordination is only affected during the neurodegenerative process

The motor performance of the PCD mouse was only altered during the neurodegenerative process, i.e. at P22 ($p < 0.05$) and P30 ($p < 0.05$; **Fig. 12**). Thus, progressive PC death, but not changes in PC morphology, seems to be responsible for the observed alterations in motor coordination, at least in PCD mice.

Home-cage behaviour is altered in PCD mice before PCs death

The results of the home-cage behaviour tests failed to reveal any differences between groups in the time the animals spent walking at all developmental stages, indicating that the *pcd* mutation does not affect general movement. Regarding grooming behaviour, no differences were found during the pre-neurodegenerative process (**Fig. 12**). However, a decrease in the number of grooming events was found during the degenerative process of the PCD mutant mice (P22, $p < 0.05$; P30, $p < 0.05$). Conversely, environmental exploratory behaviour -rearings- was also reduced in the PCD mutant mice during both the pre-neurodegenerative (P15, $p < 0.05$; P17, $p < 0.05$) and the neurodegenerative (P30, $p < 0.05$) processes. Surprisingly, at P22 no changes in exploratory behaviour were observed in the PCD mice ($p > 0.05$).

Long-term memory is only affected in late degenerative stages

The novel object-recognition test showed that the WT mice spent a greater percentage of time exploring new objects than familiar ones, indicating normal memory recognition (P17, $p < 0.05$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$). Similarly, PCD mice also spent a greater percentage of time exploring the new instead of familiar objects from P15 to P22 (P17, $p < 0.05$; P22, $p < 0.01$). However, at P30 no differences were detected in the percentage of time spent exploring both objects, suggesting deficits in object memory recognition in the PCD mice at this age (**Fig. 13**).

To avoid biases deriving from the motor alterations in the PCD mice, the number of visits to both objects and the mean time spent exploring each object per visit were analysed on P30. Regarding the number of visits, the results did not show differences between genotypes (**Fig. 13**). Concerning the mean time elapsed exploring each object per visit, the WT mice spent more time exploring the new object with respect to the familiar one ($p < 0.05$). By contrast, the PCD mice showed no differences in the mean time spent exploring both objects. These results corroborated the alteration in long-term memory, thus ruling out any influence of PCD motor impairments (**Fig. 13**).

Social preference is affected in PCD mice as a result of cerebellar degeneration

The results of the social preference test revealed a higher percentage of time spent exploring the intruder room (with an animal) than the other one (with an object) in the WT mice from P15 to P30 (P15, $p < 0.05$; P17, $p < 0.05$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$; **Fig. 14**). However, the PCD mice spent the same percentage of time exploring both the intruder and the object rooms at all ages (**Fig. 14**). Thus, cerebellar alterations during the pre-neurodegenerative process

Summary

seem to be sufficient to induce social deficits, and these latter can also be extended to the degenerative process.

In sum, behavioural analyses of the PCD mice strongly suggested a close relationship between cerebellar function and cognition. Moreover, cerebellar alterations affected cognitive and affective tasks progressively.

OEA administration did not affect motor behaviour in PCD mice

Taking into account the results obtained during the present work for a Doctoral Thesis, OEA seems to prevent histological changes in PCD mutant mice. Thus, one objective was to analyse the effect of its administration on motor behaviour. The results showed that OEA did not affect motor coordination, as measured with the rota-rod test, at any of the doses employed (**Fig. 15**). Thus, the preventive effect observed both in microtubules and cerebellar histology was not reflected in an improvement in motor coordination.

DISCUSSION

During last decades cerebellar function has been redefined on the basis of both preclinical and clinical studies: from the idea of an exclusive motor control function, currently the cerebellum is starting to be considered an essential structure for both cognitive and affective coordination (Schmahmann, 2000; Glickstein et al., 2009). However, some inconsistencies in the results obtained by different authors have led some researchers to question these “new” cerebellar functions. Different psychiatric disorders have been related to impairments of the cerebellum, but cerebellar defects have not been found in all patients diagnosed with these psychiatric disorders (Daum and Ackermann, 1995; Timmann and Daum, 2010). Likewise, not all authors working with animal models with cerebellar disorders have reported similar results (Biran et al., 2012; Tsai et al., 2012; Galliano et al., 2013). Accordingly, in order to have a clearer idea about cerebellar involvement in a specific type of behaviour, we should take into account that the different models employed in these studies feature different cerebellar alterations, ranging from single synaptic modifications to defects throughout the cerebellum.

We characterized the effect of a microtubular alteration in the cerebellum in a mouse model with cerebellar degeneration. In this sense, we analysed the animals' behaviour prior to PC death, when pathological changes within these neurons have been described, as well as when the PCs disappeared. This holistic approach has allowed us to establish a temporal rela-

Summary

tionship between the cerebellar abnormalities found in PCD mice and their influence on cognitive and affective processes, all based on microtubular dynamics and structural alterations.

To facilitate an understanding of the results, we shall discuss the influence of microtubule alterations on PCD mouse development and then the effect of OEA administration on development.

***pcd* mutation increase MTs instability but not early cerebellar structure**

First, we studied the effect of the *pcd* mutation on MTs dynamics and structure. Although previous results had already demonstrated that this mutation increases MT polyglutamylation (Rogowski et al., 2010), we observed for the first time that this increase in polyglutamylation affected MT stability and structure. Interestingly, the expression of the CCP1 enzyme is elevated at P15 in the cerebellum of WT mice (Baltanás et al., 2011a), i.e. at the beginning of the pre-neurodegenerative process in the PCD mouse (Baltanás et al., 2011b). Thus, MTs polyglutamylation seems to be essential during cerebellar development, a reduction of this post-translational change being necessary at the end of neuronal growth. In this sense, it is known that MTs at the growth cones are more unstable, with an increase in the frequency of catastrophes (Dent et al., 1999). Moreover, the increased curvature of MTs observed in the present work is consistent with the observation that doublecortin binds preferably to curved MTs (Bechstedt et al., 2015), this neuroactive molecule being essential for the correct migration and growth of neurons (Gleeson et al., 1999; Bechstedt and Brouhard, 2012; Fu et al., 2013),

Thus, although these alterations of MTs trigger the degeneration of the cerebellum in PCD, they may be essential during early developmental stages. Our results demonstrated that at P7 there were no differences between WT and PCD mice as regards any of the parameters studied: PC morphology was not affected by the *pcd* mutation at this age, and the expression of endocannabinoid receptors did not differ between genotypes. Thus, it can be confirmed that our mouse model developed normally during the first perinatal stages.

Morphological defects of PCs influence non-motor behaviour

During the pre-neurodegenerative process, both cerebellar and behavioural alterations were found (both at P15 and P17). Although a specific alterations of PC synaptic inputs do not affect non-motor tasks (Galliano et al., 2013), our results demonstrate for the first time that morphological alterations in the main dendrite of PCs occurs simultaneously to defects in social and environmental exploratory behaviour, when no motor alterations had yet been de-

Summary

tected. Thus, previous studies have demonstrated that alterations in dendritic morphology impact the electrophysiological activity of neurons (Krichmar et al., 2002; Bekkers, 2011). More precisely, defects in PC axial resistance, which depends on dendritic length and width, has been demonstrated to disrupt synaptic integration in PCs (Bekkers, 2011). Accordingly, the ability of PCs to integrate all the synaptic information received would be compromised. Consequently, and as previously hypothesized, problems in the ability of the cerebellum to integrate and coordinate information seems to lead to cognitive dysmetria, i.e. the inability of the cerebellum to coordinate cognitive information and make adequate responses (Schmahmann, 2000, 2001). In this sense, although the effect of PC morphological alterations on non-motor behaviour has never been studied, morphological defects in PCs in different psychiatric disorders have been described recently (Fatemi et al., 2002; Mavroudis et al., 2013; Sudarov, 2013).

Regarding endocannabinoid receptors, during the pre-neurodegenerative process the expression of CB1 and CB2 receptors was similar in both genotypes: from P7 onwards CB1 receptors were highly expressed in the ML. Moreover, as from P15 CB1 receptor expression reflected the beginning of the establishment of the “*Pinceaux* formation”, as previously described (Buttermore et al., 2012). In contrast, in both genotypes CB2 receptors were only detected in the ML from P15 onwards. Thus, CB1 and CB2 receptors do not seem to have any influence on the social defects observed in PCD mice during pre-neurodegeneration. By contrast, the expression of PPAR α receptors was increased in the PCs of the PCD mutant mice during pre-neurodegeneration, apparently reflecting the reaction of PCs to this process. In agreement with this idea, previous authors have demonstrated a preventive effect of PPAR α receptor agonists on neuronal death (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio and Moratalla, 2014). Moreover, PPAR α receptor KO mice show an increase in apoptotic and inflammatory processes after the induction of mechanical injury, also leading to an increase in secondary damages (Genovese et al., 2005). Additionally, recent results have demonstrated that PPAR α receptors are essential in hippocampal-dependent learning and memory through the regulation of CREB expression (Roy et al., 2013). Accordingly, although the possible influence of PPAR α receptors on cerebellar function has still not been elucidated, we cannot discard a possible role of this increased expression of PPAR α receptors in the behaviour of PCD mice.

In sum, during the pre-neurodegenerative process –when no motor defects are detected– morphological alterations of PCs affect social and environmental exploratory behaviour in PCD mutant mice. Moreover, these structural alterations also elicit an increase in PPAR α receptor expression in PCs, with an unclear influence on mouse behaviour.

Progression of cerebellar defects affects behavioural tasks progressively

Regarding the neurodegenerative process, neuronal death begins to be apparent along the three cerebellar layers. Previous authors have assumed that granule cell death is residual and delayed over time with respect to PC loss (Wang and Morgan, 2007). However, our results show that PC and granule cell death occurs simultaneously. Hence, contrary to pre-neurodegeneration, during the neurodegenerative process neural populations from the three cerebellar layers seem to be affected in PCD mice.

With respect to morphological alterations of PCs, the changes in the length and width of the main dendrite persist during neurodegeneration. Moreover, along this process the lengths of PC somata and the dendritic arbour were also reduced in comparison with WT neurons. Similarly, social preference and environmental exploratory behaviour also persisted during neurodegeneration in the PCD mice. Moreover, in this latter stage grooming behaviour was decreased in the mice in comparison to WTs. Although this behaviour has previously been shown to be increased in animal models of specific PC loss (Tsai et al., 2012), models with a more general alteration of the cerebellum have been described to show a decrease in grooming behaviour (Strazielle and Lalonde, 1998). In this sense, the activity of granular (Hartmann and Bower, 2001) and Purkinje cells (Ghosh et al., 2011) are known to increase during grooming behaviour. Thus, this behaviour may be differentially affected by isolated alteration of PCs as compared with general defects of the cerebellum.

Interestingly, general cerebellar alteration of PCD mice disrupts this memory recognition only at P30. Although previous studies have failed to identify memory recognition impairments related to the cerebellum, neuroimaging studies have revealed cerebellar activation during memory tasks (Cabeza et al., 1997; Weis et al., 2004). More importantly, this activation occurred mainly with positive recognitions but not when the subjects failed on the recognition task (Weis et al., 2004). Thus, general neural alterations of the cerebellum seem to be necessary to affect memory recognition. Although previous studies with animal models have not indicated defects in object memory recognition related to the cerebellum (Tsai et al., 2012), in clinical trials memory recognition has been reported to activate cerebellar function (Weis et al., 2004). Thus, a global alteration of the cerebellum is possibly needed to disrupt memory recognition. In this sense, memory recognition is only affected in the PCD mouse at P30, when there are only a few PCs remaining in the lobe X, the general structure of the cerebellum being affected.

Summary

Finally, the alteration of the endocannabinoid system during neurodegeneration varies, depending on the receptor. In this sense, CB1 receptors show no apparent differences in their expression in PCD mice with respect to WT animals. Curiously, CB1 receptor expression in the “Pinceaux formation” remains unchanged, despite the PC defects, indicating a high stability of these synaptic contacts. By contrast, the expression of CB2 receptors was increased during the neurodegenerative process in the PCD mice. CB2 receptors are mainly expressed in cells of the immune system, and can therefore be associated with immunological and inflammatory responses (Facci et al., 1995; Onaivi, 2011). In the central nervous system, glial cells express CB2 receptors, but there is no consensus about their possible expression in neurons (Gong et al., 2006; Onaivi, 2011). Our results indicate that CB2 receptors are expressed in the cerebellum by Bergmann glial cells. Taking into account that CB2 expression is increased during neurodegeneration, the same period in which astroglial activation markers have been seen to be increased (Baltanás et al., 2013), the expression of these receptors may be related to inflammatory processes in the central nervous system. Finally, PPAR α receptor expression in PCs is still increased at P22 in PCD mice, but not at P30. As indicated above, PPAR α receptors seem to be related to a preventive effect of neuronal damage (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014). Thus, once PCs loss is almost complete this increased expression is not necessary.

In conclusion, the instability of the MTs of PCD mice affects PC morphology from P15, when PC maturation is mainly complete, finally producing their death from P18 onwards, when PCs are remodelling their dendritic arbour and synaptic contacts. Moreover, during the neurodegenerative process increasing morphological alterations of PCs overlap general neuronal death. These alterations affect mouse behaviour more deeply than during pre-neurodegeneration. Thus, the severity of cerebellar defects is directly proportional to their influence on non-motor tasks.

OEA administration prevents cerebellar alterations in the PCD mouse

In recent years, different authors have reported that PPAR α agonists reduce neuronal death and neuroinflammation in pharmacological models of neurodegeneration (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio and Moratalla, 2014). We have also seen that PPAR α receptor expression is influenced by the progression of the PCD neurodegenerative process. Thus, one of the objectives of the present Doctoral Thesis was to analyze the influence of the PPAR α agonist OEA on microtubular and cerebellar histological changes in the PCD mouse.

Summary

We have demonstrated that the *pcd* mutation influences the stability and structure of microtubules, rendering them similar to those found in embryo cells. Previous authors have demonstrated that OEA administration increases the expression of microtubule-associated proteins such as MAP2 and GAP43 in a PPAR α -dependent manner (Bento-Abreu et al., 2007). Indeed, different investigators have demonstrated that microtubule-associated proteins affect microtubule dynamics (Illenberger et al., 1996; Drewes et al., 1998; Al-Bassam et al., 2002; Chakravarthy et al., 2008; Mishra et al., 2008). However, polyglutamylation has been widely proposed to influence the binding of microtubule-associated proteins such as MAP2 and MAP1 (Bonnet et al., 2001; Ikegami et al., 2007). Thus, taking into account that the binding of proteins is affected by both protein affinity and concentration, a decrease in their affinity will require higher concentrations for a similar binding to occur. This idea is supported by our results, which demonstrate that PCD microtubules require higher concentrations of OEA to elicit an effect on microtubule dynamics similar to WT microtubules. Thus, this increase in the concentration of OEA in PCD microtubules could be related to these alterations in affinity. Consequently, the increase in OEA concentration would increase microtubule-associated protein expression and concentration, normalizing their binding in PCD microtubules. Moreover, MAP2, which is increased by OEA (Bento-Abreu et al., 2007), is known to restore the increased curvature induced by taxol (Dye et al., 1993). Accordingly, the effect of OEA on microtubules seems to be mediated by the increase in microtubule-associated protein expression.

Although we have seen that OEA affects microtubule dynamics and structure, this effect is not translated into a functional recovery; i.e. motor coordination is not improved. However, it is important to take into account that the rota-rod test only allowed us to differentiate gross improvements (Buccafusco, 2001). Thus, more precise motor tasks would be needed to understand the influence of OEA. Moreover, to gain an overall understanding of the effect of OEA on motor behaviour, the use of different motor tests would be required to analyze different parameters (motor coordination, foot-printing, motor dexterity...).

Despite this lack of effect on motor performance, OEA did increase the expression of PPAR α receptors, as previously described (Zhou et al., 2012). As proposed above, the increase in PPAR α receptor expression may be related to a PC plastic process in order to prevent neuronal death, which would be in accordance with the neuroprotective effect we observed in PCD mice. Nevertheless, CB1 and CB2 receptors were not affected by OEA. In this sense, although previous studies have established an anti-inflammatory effect of OEA (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014; González-Aparicio and Moratalla, 2014), it appears that this effect would not be related to the cerebellar expression of CB2 receptors. Neverthe-

Summary

less, despite this lack of effect in both CB1 and CB2 receptors, more precise analyses may be needed in order to understand the possible effect of OEA on their expression. Thus, the effect of OEA seems to differ, depending on the different elements of the endocannabinoid system.

The effect of OEA on microtubule dynamics and structure is translated into the prevention of PC morphological alterations in PCD mice. Moreover, this preventive effect is observed in all morphological parameters studied. In this sense, previous studies have demonstrated that OEA administration affects the morphology of hippocampal neurons (Bento-Abreu et al., 2007). Taking into account that microtubules are the underpinning of cell morphology, this preventive effect may be related to the influence of OEA on microtubule dynamics and structure.

In recent years it has been demonstrated that OEA administration prevents neuronal death in animal models of neurodegeneration (Galán-Rodríguez et al., 2009; González-Aparicio et al., 2014; González-Aparicio and Moratalla, 2014; Sayd et al., 2015). These studies were carried out with pharmacological models of neurodegeneration. Thus, here we have demonstrated for the first time a neuroprotective effect of OEA in natural occurring neurodegeneration. Moreover, this effect was also observed for the first time in the PCs of the cerebellum. Thus, our results show that OEA improves PC survival, this effect only being seen when OEA is administered prior to the beginning of pre-neurodegeneration. In accordance with previous works, OEA improves PC survival in an inverted U-shape manner. This effect is mainly seen in conditions of continuous administration but not with acute administration at P14. However, at P14 the effective dose was the highest one -10 mg/kg- preventing us from determining the effect of higher doses.

In sum, OEA administration partially prevents microtubule alterations derived from the *pcd* mutation. This microtubular effect is translated into morphological improvements, mainly when OEA is administered prior to the beginning of pre-neurodegeneration. Moreover, PPAR α receptors, but not CB1 and CB2 receptors, are affected by OEA, which may be related to its preventive effect on PC death. However, despite this microtubular and histological prevention of OEA, no effect was seen in motor function.

CONCLUSIONS

Taking into account the proposed objectives and the results obtained during the present Doctoral Thesis, we can conclude that:

- I. An excess of polyglutamylation in microtubules affects their dynamics and structure, probably by means of the binding of microtubule-associated proteins, making them more unstable.
- II. Microtubule dynamics influences both the normal development of Purkinje cells and the morphological and functional development of the cerebellum.
- III. Cerebellar alterations in the PCD mouse progressively affect the expression of elements of the endocannabinoid system. Moreover, those alterations affect not only motor behaviour but also cognitive and affective processes.
- IV. OEA administration promotes the stability of microtubules, which is translated into both the rescue of the morphological alterations and neuroprotection of the neurodegenerative process occurring in the cerebellum of the PCD mouse.

ICONOGRAFÍA/*FIGURES*

BIBLIOGRAFÍA/*REFERENCES*

- A**bbott BD (2009) Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol* 27:246–257.
- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:309–322.
- Al-Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA (2002) MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol* 157:1187–1196.
- Andreasen NC, Pierson R (2008) The role of the cerebellum in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 64:81–88.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Fauré S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D (2002) The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16:2350–2364.
- Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93–110.
- Anwar H, Hepburn I, Nedelescu H, Chen W, De Schutter E (2013) Stochastic calcium mechanisms cause dendritic calcium spike variability. *J Neurosci* 33:15848–15867.
- Applegate KT, Besson S, Matov A, Bagonis MH, Jaqaman K, Danuser G (2011) PlusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *J Struct Biol* 176:168–184.
- Arimura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:194–205.
- Armstrong DD (2001) Rett syndrome neuropathology review 2000. *Brain Dev* 1:S72–S76.
- Ashton JC, Glass M (2007) The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol* 5:73–80.
- Asthana J, Kapoor S, Mohan R, Panda D (2013) Inhibition of HDAC6 deacetylase activity increases its binding with microtubules and suppresses microtubule dynamic instability in MCF-7 cells. *J Biol Chem* 288:22516–22526.
- Atkins MJ, Apps R (1997) Somatotopical organisation within the climbing fibre projection to the paramedian lobule and copula pyramidis of the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 389:249–263.
- B**aas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8335–8339.
- Baltanás FC, Berciano MT, Valero J, Gómez C, Díaz D, Alonso JR, Lafarga M, Weruaga E (2013) Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia* 61:254–272.
- Baltanás FC, Casafont I, Lafarga V, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M (2011a) Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *J Biol Chem* 286:28287–28302.
- Baltanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M (2011b) Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in Purkinje cells. *Brain Pathol* 21:374–388.
- Barmack NH (2003) Central vestibular system: Vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res Bull* 60:511–541.
- Barmack NH, Yakhnitsa V (2003) Cerebellar climbing fibers modulate simple spikes in Purkinje cells. *J Neurosci* 23:7904–7916.
- Barmack NH, Yakhnitsa V (2008) Functions of interneurons in mouse cerebellum. *J Neurosci* 28:1140–1152.

- Basavarajappa BS, Nixon RA, Arancio O (2009) Endocannabinoid system: emerging role from neurodevelopment to neurodegeneration. *Mini Rev Med Chem* 9:448–462.
- Bauman ML, Kemper TL (2005) Neuroanatomic observations of the brain in autism: A review and future directions. *Int J Dev Neurosci* 23:183–187.
- Bechstet S, Brouhard GJ (2012) Doublecortin Recognizes the 13-Protofilament Microtubule Cooperatively and Tracks Microtubule Ends. *Dev Cell* 23:181–192.
- Bechstet S, Lu K, Brouhard GJ (2015) Doublecortin Recognizes the Longitudinal Curvature of the Microtubule End and Lattice. *Curr Biol* 24:2366–2375.
- Bekkers JM (2011) Changes in dendritic axial resistance alter synaptic integration in cerebellar Purkinje cells. *Biophys J* 100:1198–1206.
- Bell CC (2002) Evolution of cerebellum-like structures. *Brain Behav Evol* 59:312–326.
- Bell CC, Han V, Sawtell NB (2008) Cerebellum-like structures and their implications for cerebellar function. *Annu Rev Neurosci* 31:1–24.
- Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J (2008) Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* 153:277–285.
- Bento-Abreu A, Tabernero A, Medina JM (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. *J Neurochem* 103:871–881.
- Berdyshev E V, Schmid PC, Krebsbach RJ, Hillard CJ, Huang C, Chen N, Dong Z, Schmid HH (2001) Cannabinoid-receptor-independent cell signalling by N-acylethanolamines. *Biochem J* 360:67–75.
- Berezniuk I, Sironi J, Callaway MB, Castro LM, Hirata IY, Ferro ES, Fricker LD (2010) CCP1/Nna1 functions in protein turnover in mouse brain: Implications for cell death in Purkinje cell degeneration mice. *FASEB J* 24:1813–1823.
- Bernard JA, Mittal VA (2014) Cerebellar-motor dysfunction in schizophrenia and psychosis-risk: the importance of regional cerebellar analysis approaches. *Front Psychiatry* 5:160.
- Blot A, Barbour B (2014) Ultra-rapid axon-axon ephaptic inhibition of cerebellar Purkinje cells by the pinceau. *Nat Neurosci* 17:289–295.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC (2001) Differential Binding Regulation of Microtubule-associated Proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by Tubulin Polyglutamylation. *J Biol Chem* 276:12839–12848.
- Boyden ES, Katoh A, Raymond JL (2004) Cerebellum-dependent learning: the role of multiple plasticity mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 27:581–609.
- Breuss M, Keays DA (2014) Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. *Adv Exp Med Biol* 800:75–96.
- Bright JJ, Kanakasabai S, Chearwae W, Chakraborty S (2008) PPAR regulation of inflammatory signaling in CNS diseases. *PPAR Res* 2008:658520
- Brodal A, Brodal P (1985) Observations on the secondary vestibulocerebellar projections in the macaque monkey. *Exp Brain Res* 58:62–74.
- Brown AJ (2007) Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 152:567–575.
- Brown JD, Plutzky J (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation* 115:518–533.
- Buccafusco JJ (2001) *Methods of behavior analysis in neuroscience*. Boca Raton (FL, EE.UU.): CRC Press
- Burton PR, Paige JL (1981) Polarity of axoplasmic microtubules in the olfactory nerve of the frog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3269–3273.
- Buttermore ED, Piochon C, Wallace ML, Philpot BD, Hansel C, Bhat MA (2012) Pinceau Organization in the Cerebellum Requires Distinct Functions of Neurofascin in Purkinje and Basket Neurons during Postnatal Development. *J Neurosci* 32:4724–4742.

- Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)* 21:38–47.
- Capasso R, Izzo AA (2008) Gastrointestinal regulation of food intake: General aspects and focus on anandamide and oleylethanolamide. *J Neuroendocrinol* 1:S39-S46.
- Carey MR, Myoga MH, McDaniels KR, Marsicano G, Lutz B, Mackie K, Regehr WG (2011) Presynaptic CB1 receptors regulate synaptic plasticity at cerebellar parallel fiber synapses. *J Neurophysiol* 105:958–963.
- Castillo PE, Younts TJ, Chávez AE, Hashimoto Y (2012) Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron* 76:70–81.
- Cesa R, Strata P (2009) Axonal competition in the synaptic wiring of the cerebellar cortex during development and in the mature cerebellum. *Neuroscience* 162:624–632.
- Chakrabarti L, Eng J, Martinez R a, Jackson S, Huang J, Possin DE, Sopher BL, La Spada AR (2008) The zinc-binding domain of Nna1 is required to prevent retinal photoreceptor loss and cerebellar ataxia in Purkinje cell degeneration (pcd) mice. *Vision Res* 48:1999–2005.
- Chakravarthy B, Rashid A, Brown L, Tessier L, Kelly J, Ménard M (2008) Association of Gap-43 (neuromodulin) with microtubule-associated protein MAP-2 in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 371:679–683.
- Chang AC, Ghetti B (1993) Embryonic cerebellar graft development during acute phase of gliosis in the cerebellum of pcd mutant mice. *Chin J Physiol* 36:141–149.
- Chu CP, Bing YH, Liu H, Qiu DL (2012) Roles of molecular layer interneurons in sensory information processing in mouse cerebellar cortex Crus II in vivo. *PLoS ONE* 7:e37031.
- Conde C, Cáceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319–332.
- Cravatt BF, Lichtman AH (2004) The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *J Neurobiol* 61:149–160.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405–1415.
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem* 70:1366–1375.
- Da Cruz-Höfling MA, Rapôso C, Verinaud L, Zago GM (2009) Neuroinflammation and astrocytic reaction in the course of Pseudotumor cerebri (armed-spider) blood-brain barrier (BBB) opening. *Neurotoxicology* 30:636–646.
- Daoust A, Bohic S, Saoudi Y, Debacker C, Gory-Fauré S, Andrieux A, Barbier EL, Deloulme JC (2014) Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Etoposide D treatment, as observed using MEMRI. *Neuroimage* 96:133–142.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141:765–774.
- De Petrocellis L, Di Marzo V (2010) Non-CB1, Non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: Focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 5:103–121.
- De Zeeuw CI, Berrebi AS (1995) Postsynaptic targets of Purkinje cell terminals in the cerebellar and vestibular nuclei of the rat. *Eur J Neurosci* 7:2322–2333.
- De Zeeuw CI, Hoebeek FE, Bosman LWJ, Schonwille M, Witter L, Koekkoek SK (2011) Spatiotemporal firing patterns in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 12:327–344.

- Dent EW, Callaway JL, Szebenyi G, Baas PW, Kalil K (1999) Reorganization and movement of microtubules in axonal growth cones and developing interstitial branches. *J Neurosci* 19:8894–8908.
- Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605–613.
- Dewey WL (1986) Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev* 38:151–178.
- Díaz D, Muñoz-Castañeda R, Alonso JR, Weruaga E (2014) Bone marrow-derived stem cells and strategies for treatment of nervous system disorders: many protocols, and many results. *Neuroscientist*. *In press*
- Díaz D, Recio JS, Weruaga E, Alonso JR (2012) Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 21:1595–1602.
- Donald S, Humby T, Fyfe I, Segonds-Pichon A, Walker SA, Andrews SR, Coadwell WJ, Emson P, Wilkinson LS, Welch HCE (2008) P-Rex2 regulates Purkinje cell dendrite morphology and motor coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4483–4488.
- Drewes G, Ebnet A, Mandelkow EM (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* 23:307–311.
- Durisko C, Fiez JA. (2010) Functional activation in the cerebellum during working memory and simple speech tasks. *Cortex* 46:896–906.
- Dye RB, Fink SP, Williams RC (1993) Taxol-induced flexibility of microtubules and its reversal by MAP-2 and Tau. *J Biol Chem* 268:6847–6850.

- E**astwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D, Harrison PJ (2007) Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *J Psychopharmacol* 21:635–644.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47–59.
- Erdozain AM, Meana JJ, Callado LF (2009) Implicación del sistema cannabinoide endógeno en el alcoholismo. *Trastor Adict* 11:85–95.
- Evarts E V, Thach WT (1969) Motor mechanisms of the CNS: cerebrotocerebellar interrelations. *Annu Rev Physiol* 31:451–498.

- F**acci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A (1995) Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3376–3380.
- Faivre C, Legrand C, Rabié A (1985) The microtubular apparatus of cerebellar purkinje cell dendrites during postnatal development of the rat: The density and cold-stability of microtubules increase with age and are sensitive to thyroid hormone deficiency. *Int J Dev Neurosci* 3:559–565.
- Fan A, Wu X, Wu H, Li L, Huang R, Zhu Y, Qiu Y, Fu J, Ren J, Zhu C (2014) Atheroprotective effect of oleoylethanolamide (OEA) targeting oxidized LDL. *PLoS One* 9:e85337.
- Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, Thuras P, Metz A (2002) Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cell Mol Neurobiol* 22:171–175.
- Fernández-González A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JJ, Zuo J (2002) Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 295:1904–1906.
- Fink AJ, Englund C, Daza RAM, Pham D, Lau C, Nivison M, Kowalczyk T, Hevner RF (2006) Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci* 26:3066–3076.
- Flores A, Maldonado R, Berrendero F (2013) Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Front Neurosci* 7:256.

- Földy C, Malenka RC, Südhof TC (2013) Autism-associated neuroligin-3 mutations commonly disrupt tonic endocannabinoid signaling. *Neuron* 78:498–509.
- Fortin DA, Srivastava T, Soderling TR (2012) Structural modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. *Neurosci* 18:326–341.
- Fowler CJ, Rojo ML, Rodríguez-Gaztelumendi A (2010) Modulation of the endocannabinoid system: neuroprotection or neurotoxicity? *Exp Neurol* 224:37–47.
- Fride E (2008) Multiple roles for the endocannabinoid system during the earliest stages of life: pre- and postnatal development. *J Neuroendocrinol* 20:75–81.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez de Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature* 425:90–93.
- Fu X, Brown KJ, Yap CC, Winckler B, Jaiswal JK, Liu JS (2013) Doublecortin (Dcx) family proteins regulate filamentous actin structure in developing neurons. *J Neurosci* 33:709–721.
- Fujishima K, Horie R, Mochizuki A, Kengaku M (2012) Principles of branch dynamics governing shape characteristics of cerebellar Purkinje cell dendrites. *Development* 139:3442–3455.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4:583–591.

Galán-Rodríguez B, Suárez J, González-Aparicio R, Bermúdez-Silva FJ, Maldonado R, Robledo P, Rodríguez de Fonseca F, Fernández-Espejo E (2009) Oleylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology* 56:653–664.

- Galliano E, Potters J-W, Elgersma Y, Wisden W, Kushner SA, De Zeeuw CI, Hoebeek FE (2013) Synaptic transmission and plasticity at inputs to murine cerebellar Purkinje cells are largely dispensable for standard nonmotor tasks. *J Neurosci* 33:12599–12618.
- Gamblin TC, Nachmanoff K, Halpain S, Williams RC (1996) Recombinant microtubule-associated protein 2c reduces the dynamic instability of individual microtubules. *Biochemistry* 35:12576–12586.
- Gardner MK, Zanic M, Howard J (2013) Microtubule catastrophe and rescue. *Curr Opin Cell Biol* 25:1–9.
- Garin N, Escher G (2001) The development of inhibitory synaptic specializations in the mouse deep cerebellar nuclei. *Neuroscience* 105:431–441.
- Garner JP, Meehan CL, Mench JA (2003) Stereotypies in caged parrots, schizophrenia and autism: Evidence for a common mechanism. *Behav Brain Res* 145:125–134.
- Genovese T, Mazzone E, Di Paola R, Cannavò G, Muià C, Bramanti P, Cuzzocrea S (2005) Role of endogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors α in the secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Exp Neurol* 194:267–278.
- Giaume C, Kirchhoff F, Matute C, Reichenbach A, Verkhratsky A (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ* 14:1324–1335.
- Glickstein M, Strata P, Voogd J (2009) Cerebellum: history. *Neuroscience* 162:549–559.
- Goetz A (1970) Introduction to differential geometry, 1^a ed. Reading, Massachusetts: Addison Wesley.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071:10–23.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 57:1045–1050.
- González-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, Pavón FJ, Parsons LH, Maldonado R, Robledo P, Fernández-Espejo E, Rodríguez de Fonseca F (2014) The systemic administration of oleylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:455–468.

- González-Aparicio R, Moratalla R (2014) Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 62:416–425.
- Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4653–4657.
- Greer CA, Shepherd GM (1982) Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res* 235:156–161.
- Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D (2004) Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem* 279:27849–27854.
- Haines DE, Koletar SL (1979) Topography of cerebellar corticonuclear fibers of the albino rat. Vermis of anterior and posterior lobes. *Brain Behav Evol* 16:271–292.
- Hammond JW, Huang C-F, Kaech S, Jacobson C, Banker G, Verhey KJ (2010) Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* 21:572–583.
- Hamori J, Jakab RL, Takacs J (1997) Morphogenetic plasticity of neuronal elements in cerebellar glomeruli during deafferentation-induced synaptic reorganization. *J Neural Transplant Plast* 6:11–20.
- Hansson E, Rönnbäck L (2003) Glial neuronal signaling in the central nervous system. *FASEB J* 17:341–348.
- Harris A, Morgan JI, Pecot M, Soumare A, Osborne A, Soares HD (2000) Regenerating motor neurons express *Nna1*, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. *Mol Cell Neurosci* 16:578–596.
- Hartmann MJ, Bower JM (2001) Tactile responses in the granule cell layer of cerebellar folium crus IIa of freely behaving rats. *J Neurosci* 21:3549–3563.
- Hashimoto K, Kano M (2005) Postnatal development and synapse elimination of climbing fiber to Purkinje cell projection in the cerebellum. *Neurosci Res* 53:221–228.
- Hayashi T, Sakai K, Sasaki C, Itoyama Y, Abe K (2000) Loss of bag-1 immunoreactivity in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 852:496–500.
- Heneka MT, Landreth GE (2007) PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1771:1031–1045.
- Hering H, Sheng M (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2:880–888.
- Herkenham M, Groen BG, Lynn AB, De Costa BR, Richfield EK (1991) Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. *Brain Res* 552:301–310.
- Hibi M, Shimizu T (2012) Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol* 72:282–301.
- Hillard CJ (2000) Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61:3–18.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010) Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610–638.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201–214.
- Hockberger PE, Tseng HY, Connor JA (1989) Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture. *J Neurosci* 9:2258–2271.
- Howlett AC (1995) Pharmacology of cannabinoid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:607–634.

- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161–202.
- Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F (2007) Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nat Rev Neurosci* 8:673–686.
- Husson Z, Rousseau CV, Broll I, Zeilhofer HU, Dieudonné S (2014) Differential GABAergic and glycinergic inputs of inhibitory interneurons and Purkinje cells to principal cells of the cerebellar nuclei. *J Neurosci* 34:9418–9431.
- Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, Taira S, Hatanaka K, Morone N, Yao I, Campbell PK, Yuasa S, Janke C, Macgregor GR, Setou M (2007) Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3213–3218.
- Illenberger S, Drewes G, Trinczek B, Biernat J, Meyer HE, Olmsted JB, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark: Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* 271:10834–10843.
- Inagaki N, Chihara K, Arimura N, Ménager C, Kawano Y, Matsuo N, Nishimura T, Amano M, Kaibuchi K (2001) CRMP-2 induces axons in cultured hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 4:781–782.
- Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645–650.
- Ito M (2002a) The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nat Rev Neurosci* 3:896–902.
- Ito M (2002b) Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. *Ann N Y Acad Sci* 978:273–288.
- Ito M (2006) Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78:272–303.
- Ito M (2008) Control of mental activities by internal models in the cerebellum. *Nat Rev Neurosci* 9:304–313.
- Janke C, Bulinski JC (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:773–786.
- Janke C, Kneussel M (2010) Tubulin post-translational modifications: Encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33:362–372.
- Jansen J, Brodal A (1940) Experimental studies on the intrinsic fibers of the cerebellum. II. The cortico-nuclear projection. *J Comp Neurol* 73:267–321.
- Jiang X, Yeung RS (2006) Regulation of microtubule-dependent protein transport by the TSC2/mammalian target of rapamycin pathway. *Cancer Res* 66:5258–5269.
- Joseph RM, Tager-Flusberg H, Lord C (2002) Cognitive profiles and social-communicative functioning in children with autism spectrum disorder. *J Child Psychol Psychiatry* 43:807–821.
- Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B (1997) DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements: Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 272:25252–25259.
- Kalinina E, Biswas R, Berezniuk I, Hermoso A, Avilés FX, Fricker LD (2007) A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J* 21:836–850.

- Kaneko M, Yamaguchi K, Eiraku M, Sato M, Takata N, Kiyohara Y, Mishina M, Hirase H, Hashikawa T, Kengaku M (2011) Remodeling of monopolar Purkinje cell dendrites during cerebellar circuit formation. *PLoS ONE* 6:e20108.
- Kapitein LC, Yau KW, Hoogenraad CC (2010) Microtubule Dynamics in Dendritic Spines. *Methods Cell Biol* 97:111-32
- Kawai K, Nowak TS, Klatzo I (1995) Loss of parvalbumin immunoreactivity defines selectively vulnerable thalamic reticular nucleus neurons following cardiac arrest in the rat. *Acta Neuropathol* 89:262–269.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T, Kano M (2006) The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J Neurosci* 26:2991–3001.
- Kelly RM, Strick PL (2003) Cerebellar loops with motor cortex and prefrontal cortex of a nonhuman primate. *J Neurosci* 23:8432–8444.
- Kemp JM, Powell TP (1971) The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:441–457.
- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in dephosphorylated tubulin is not a direct function of dephosphorylation level. *J Cell Biol* 106:141–149.
- Kim J, Kwon N, Chang S, Kim K-T, Lee D, Kim S, Yun SJ, Hwang D, Kim JW, Hwu Y, Margaritondo G, Je JH, Rhyu IJ (2011) Altered branching patterns of Purkinje cells in mouse model for cortical development disorder. *Sci Rep* 1:122.
- Kim SG, Uğurbil K, Strick PL (1994) Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science* 265:949–951.
- Kishimoto Y, Kano M (2006) Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning. *J Neurosci* 26:8829–8837.
- Kliwer SA, Lehmann JM, Willson TM (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284:757–760.
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM (1997) Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4318–4323.
- Kohsaka S, Takayama H, Ueda T, Toya S, Tsukada Y (1988) Reorganization of cerebellar cell suspension transplanted into the weaver mutant cerebellum and immunohistochemical detection of synaptic formation. *Neurosci Res* 6:162–166.
- Kollins KM, Bell RL, Butts M, Withers GS (2009) Dendrites differ from axons in patterns of microtubule stability and polymerization during development. *Neural Dev* 4:26.
- Kotchabhakdi N, Walberg F (1978) Cerebellar afferent projections from the vestibular nuclei in the cat: An experimental study with the method of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 31:591-604.
- Lalonde R, Strazielle C (2003) The effects of cerebellar damage on maze learning in animals. *Cerebellum* 2:300–309.
- Lee JH, Joe E, Jou I (2005) PPAR-alpha activators suppress STAT1 inflammatory signaling in lipopolysaccharide-activated rat glia. *Neuroreport* 16:829–833.
- Leu B, Koch E, Schmidt JT (2010) GAP43 phosphorylation is critical for growth and branching of retinotectal arbors in zebrafish. *Dev Neurobiol* 70:897–911.
- Levitt JJ, McCarley RW, Nestor PG, Petrescu C, Donnino R, Hirayasu Y, Kikinis R, Jolesz FA, Shenton ME (1999) Quantitative volumetric MRI study of the cerebellum and vermis in schizophrenia: Clinical and cognitive correlates. *Am J Psychiatry* 156:1105–1107.

- Li J, Gu X, Ma Y, Calicchio ML, Kong D, Teng YD, Yu L, Crain AM, Vartanian TK, Pasqualini R, Arap W, Libermann T a, Snyder EY, Sidman RL (2010) Nna1 mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF- κ B signaling. *Neuron* 68:45–60.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim H-Y, Kunos G (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13345–13350.
- Lo Verme J, Gaetani S, Fu J, Oveisi F, Burton K, Piomelli D (2005) Regulation of food intake by oleylethanolamide. *Cell Mol Life Sci* 62:708–716.
- Lotta LT, Conrad K, Cory-Slechta D, Schor NF (2014) Cerebellar Purkinje cell p75 neurotrophin receptor and autistic behavior. *Transl Psychiatry* 4:e416.
- M**accarrone M, Dainese E, Oddi S (2010) Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci* 35:601–608.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655–668.
- Manent J-B, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Represa A (2005) A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25:4755–4765.
- Maroof N, Pardon MC, Kendall DA (2013) Endocannabinoid signalling in Alzheimer’s disease. *Biochem Soc Trans* 41:1583–1587.
- Marsicano G, Lutz B (2006) Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Investig* 29:27–46.
- Martin LA, Goldowitz D, Mittleman G (2003) The cerebellum and spatial ability: dissection of motor and cognitive components with a mouse model system. *Eur J Neurosci* 18:2002–2010.
- Martin LA, Goldowitz D, Mittleman G (2010) Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. *Eur J Neurosci* 31:544–555.
- Matov A, Applegate K, Kumar P, Thoma C, Krek W, Danuser G, Wittmann T (2010) Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nat Methods* 7:761–768.
- Matsuda LA, Bonner TI, Lolait SJ (1993) Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol* 327:535–550.
- McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, Phoenix JL, Bolivar VJ, Crawley JN (2008) Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav* 7:152–163.
- McKay BE, Turner RW (2005) Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *J Physiol* 567:829–850.
- Meng H, Blázquez PM, Dickman JD, Angelaki DE (2014) Diversity of vestibular nuclei neurons targeted by cerebellar nodulus inhibition. *J Physiol* 592:171–188.
- Mishra R, Gupta SK, Meiri KF, Fong M, Thostrup P, Juncker D, Mani S (2008) GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons. *Cell Cycle* 7:348–357.
- Morales D, Hatten ME (2006) Molecular markers of neuronal progenitors in the embryonic cerebellar anlage. *J Neurosci* 26:12226–12236.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP, Cerù M. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123:131–145.
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav* 3:287–302.
- Mukaetova-Ladinska EB, Hurt J, Honer WG, Harrington CR, Wischik CM (2002) Loss of synaptic but not cytoskeletal proteins in the cerebellum of chronic schizophrenics. *Neurosci Lett* 317:161–165.

Mullen RJ, Eicher EM, Sidman RL (1976) Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:208–212.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61–65.

Muñoz-Castañeda R, Díaz D, Avila-Zarza CA, Alonso JR, Weruaga E (2014) Sex-influence of nicotine and nitric oxide on motor coordination and anxiety-related neurophysiological responses. *Psychopharmacology (Berl)* 231:695-706.

Napper RM, Harvey RJ (1988) Quantitative study of the Purkinje cell dendritic spines in the rat cerebellum. *J Comp Neurol* 274:158–167.

Nedelescu H, Abdelhack M (2013) Comparative morphology of dendritic arbors in populations of purkinje cells in mouse sulcus and apex. *Neural Plast* 2013: 948587.

Neve RL, Coopersmith R, McPhie DL, Santeufemio C, Pratt KG, Murphy CJ, Lynn SD (1998) The neuronal growth-associated protein GAP-43 interacts with rabaptin-5 and participates in endocytosis. *J Neurosci* 18:7757–7767.

Newman PP, Reza H (1979) Functional relationships between the hippocampus and the cerebellum: an electrophysiological study of the cat. *J Physiol* 287:405–426.

Nicholson-Dykstra S, Higgs HN, Harris ES (2005) Actin dynamics: Growth from dendritic branches. *Curr Biol* 15:R346-357.

Niesmann K, Breuer D, Brockhaus J, Born G, Wolff I, Reissner C, Kilimann MW, Rohlmann A, Missler M (2011) Dendritic spine formation and synaptic function require neurobeachin. *Nat Commun* 2:557.

O'Gorman S, Sidman RL (1985) Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. *J Comp Neurol* 234:277–297.

O'Neill DK, Happe FGE (2000) Noticing and commenting on what's new: differences and similarities among 22-month-old typically developing children, children with down syndrome and children with autism. *Dev Sci* 3:457–478.

O'Sullivan SE (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152:576–582.

Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I (2006) Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:696–701.

Ohtsuki G, Piochon C, Hansel C (2009) Climbing fiber signaling and cerebellar gain control. *Front Cell Neurosci* 3:4.

Onaivi ES (2011) Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropharmacol* 9:205–208.

Oscarsson O (1969) Termination and functional organization of the dorsal spino-olivocerebellar path. *J Physiol* 200:129–149.

Ovsepian S V, Steuber V, Le Berre M, O'Hara L, O'Leary VB, Dolly JO (2013) A defined heteromeric KV1 channel stabilizes the intrinsic pacemaking and regulates the output of deep cerebellar nuclear neurons to thalamic targets. *J Physiol* 591:1771–1791.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G, Pacher L, Ba N (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58:389–462.

Palmen SJMC, van Engeland H, Hof PR, Schmitz C (2004) Neuropathological findings in autism. *Brain* 127:2572–2583.

- Parham K, Bonaiuto G, Carlson S, Turner JG, D'Angelo WR, Bross LS, Fox A, Willott JF, Kim DO (2000) Purkinje cell degeneration and control mice: responses of single units in the dorsal cochlear nucleus and the acoustic startle response. *Hear Res* 148:137–152.
- Peris L, Wagenbach M, Lafanechère L, Brocard J, Moore AT, Kozielski F, Job D, Wordeman L, Andrieux A (2009) Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* 185:1159–1166.
- Person AL, Raman IM (2011) Purkinje neuron synchrony elicits time-locked spiking in the cerebellar nuclei. *Nature* 481:502–505.
- Pertwee RG (2006) Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 147:S163–S171.
- Petersen SE, Fox PT, Posner MI, Mintun M, Raichle ME (1988) Positron emission tomographic studies of the cortical anatomy of single-word processing. *Nature* 331:585–589.
- Picard H, Amado I, Mouchet-Mages S, Olié JP, Krebs MO (2008) The role of the cerebellum in schizophrenia: An update of clinical, cognitive, and functional evidences. *Schizophr Bull* 34:155–172.
- Pierce K, Courchesne E (2001) Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol Psychiatry* 49:655–664.
- Pijpers A, Apps R, Pardoe J, Voogd J, Ruigrok TJH (2006) Precise spatial relationships between mossy fibers and climbing fibers in rat cerebellar cortical zones. *J Neurosci* 26:12067–12080.
- Piochon C, Levenes C, Ohtsuki G, Hansel C (2010) Purkinje cell NMDA receptors assume a key role in synaptic gain control in the mature cerebellum. *J Neurosci* 30:15330–15335.
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R (2007) A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci* 8:743–754.
- Piomelli D, Sasso O (2014) Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators. *Nat Neurosci* 17:164–174.
- Piperno G, LeDizet M, Chang XJ (1987) Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* 104:289–302.
- Placzek EA, Okamoto Y, Ueda N, Barker EL (2008) Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology* 55:1095–1104.
- Porrás-García E, Cendelin J, Domínguez-del-Toro E, Vožeh F, Delgado-García JM (2005) Purkinje cell loss affects differentially the execution, acquisition and prepulse inhibition of skeletal and facial motor responses in Lurcher mice. *Eur J Neurosci* 21:979–988.
- Poulain FE, Sobel A (2010) The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci* 43:15–32.
- Pouzat C, Hestrin S (1997) Developmental regulation of basket/stellate cell-->Purkinje cell synapses in the cerebellum. *J Neurosci* 17:9104–9112.
- R**akhmanina EA (1976) Electrophysiologic analysis of the functional organization of cortico-cerebellar connections. *Neirofiziologija* 8:483–489.
- Rakic P, Knyihar-Csillik E, Csillik B (1996) Polarity of microtubule assemblies during neuronal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9218–9222.
- Ramnani N (2006) The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. *Nat Rev Neurosci* 7:511–522.
- Roche M, Finn DP (2010) Brain CB2 receptors: implications for neuropsychiatric disorders. *Pharmaceuticals* 3:2517–2553.
- Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermúdez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol* 40:2–14.

- Rodríguez de la Vega M, Sevilla RG, Hermoso A, Lorenzo J, Tanco S, Díez A, Fricker LD, Bautista JM, Avilés FX (2007) Nna1-like proteins are active metallocarboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily. *FASEB J* 21:851–865.
- Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, Bosc C, Deloulme JC, Bosson A, Peris L, Gold ND, Lacroix B, Grau MB, Bec N, Larroque C, Desagher S, Holzer M, Andrieux A, Moutin MJ, Janke C (2010) A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143:564–578.
- Ross RA (2009) The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* 30:156–163.
- Rossi S, Bernardi G, 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.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152:1092–1101.
- Sacchetti B, Scelfo B, Tempia F, Strata P (2004) Long-term synaptic changes induced in the cerebellar cortex by fear conditioning. *Neuron* 42:973–982.
- Safo PK, Cravatt BF, Regehr WG (2006) Retrograde endocannabinoid signaling in the cerebellar cortex. *Cerebellum* 5:134–145.
- Sagar DR, Gaw AG, Okine BN, Woodhams SG, Wong A, Kendall DA, Chapman V (2009) Dynamic regulation of the endocannabinoid system: implications for analgesia. *Mol Pain* 5:59.
- Sakakibara A, Ando R, Sapir T, Tanaka T (2013) Microtubule dynamics in neuronal morphogenesis. *Open Biol* 3:130061.
- Sarro-Ramírez A, Sánchez-López D, Tejada-Padrón A, Frías C, Zaldívar-Rae J, Murillo-Rodríguez E (2013) Brain molecules and appetite: the case of oleoylethanolamide. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 13:88–91.
- Schmahmann JD (2001) The cerebellar cognitive affective syndrome: clinical correlations of the dysmetria of thought hypothesis. *Int Rev Psychiatry* 13:313–322.
- Schmahmann JD (2004) Disorders of the Cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 16:367–378.
- Schmahmann JD, Sherman JC (1998) The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain* 121:561–579.
- Schmahmann JD, Weilburg JB, Sherman JC (2007) The neuropsychiatry of the cerebellum - insights from the clinic. *Cerebellum* 6:254–267.
- Schmidt AW, Bodznick D (1987) Afferent and efferent connections of the vestibulolateral cerebellum of the little skate, *Raja erinacea*. *Brain Behav Evol* 30:282–302.
- Schneider T, Turczak J, Przewłocki R (2006) Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology* 31:36–46.
- Sherman SM (2005) Thalamic relays and cortical functioning. *Prog Brain Res* 149:107–126.
- Sherman SM, Guillery RW (1998) On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing “drivers” from “modulators”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7121–7126.
- Shinoda Y, Sugihara I, Wu HS, Sugiuchi Y (2000) The entire trajectory of single climbing and mossy fibers in the cerebellar nuclei and cortex. *Prog Brain Res* 124:173–186.
- Siddiqui SV, Chatterjee U, Kumar D, Siddiqui A, Goyal N (2008) Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian J Psychiatry* 50:202–208.
- Sillitoe R V, Joyner AL (2007) Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:549–577.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN (2010) Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 11:490–502.

- Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD (2014) Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 16:335–344.
- Small SL, Hlustik P, Noll DC, Genovese C, Solodkin A (2002) Cerebellar hemispheric activation ipsilateral to the paretic hand correlates with functional recovery after stroke. *Brain* 125:1544–1557.
- Soha JM, Kim S, Crandall JE, Vogel MW (1997) Rapid growth of parallel fibers in the cerebella of normal and staggerer mutant mice. *J Comp Neurol* 389:642–654.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol* 72:295–339.
- Sotelo C, Dusart I (2009) Intrinsic versus extrinsic determinants during the development of Purkinje cell dendrites. *Neuroscience* 162:589–600.
- Stone TW (1979) Glutamate as the neurotransmitter of cerebellar granule cells in the rat: electrophysiological evidence. *Br J Pharmacol* 66:291–296.
- Studler B, Fritschy J-M, Brünig I (2002) GABAergic and glutamatergic terminals differentially influence the organization of GABAergic synapses in rat cerebellar granule cells in vitro. *Neuroscience* 114:123–133.
- Suardiáz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F (2007) Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain* 133:99–110.
- Suárez I, Bodega G, Rubio M, Fernández B (2005) Down-regulation of astroglial proteins in the rat cerebellum after portacaval anastomosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:163–169.
- Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Mackie K, Ledent C, Zimmer A, Cravatt BF, Rodríguez de Fonseca F (2008) Immunohistochemical description of the endogenous cannabinoid system in the rat cerebellum and functionally related nuclei. *J Comp Neurol* 509:400–421.
- Sudarov A (2013) Defining the role of cerebellar Purkinje cells in autism spectrum disorders. *Cerebellum* 12:950–955.
- Sudarov A, Joyner AL (2007) Cerebellum morphogenesis: the foliation pattern is orchestrated by multicellular anchoring centers. *Neural Dev* 2:26.
- Sun Y, Bennett A (2007) Cannabinoids: A new group of agonists of PPARs. *PPAR Res* 2007:23513
- T**avano A, Grasso R, Gagliardi C, Triulzi F, Bresolin N, Fabbro F, Borgatti R (2007) Disorders of cognitive and affective development in cerebellar malformations. *Brain* 130:2646–2660.
- Thabuis C, Tissot-Favre D, Bezelgues J-BB, Martin JC, Cruz-Hernández C, Dionisi F, Destailats F (2008) Biological functions and metabolism of oleoylethanolamide. *Lipids* 43:887–894.
- Tolbert DL (1989) Somatotopically organized transient projections from the primary somatosensory cortex to the cerebellar cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 45:113–127.
- Tolbert DL, Knight TL (2003) Persistence of spinocerebellar afferent topography following hereditary Purkinje cell degeneration. *Cerebellum* 2:31–38.
- Triarhou LC (1998) Rate of neuronal fallout in a transsynaptic cerebellar model. *Brain Res Bull* 47:219–222.
- Triarhou LC, Norton J, Ghetti B (1987) Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res* 66:577–588.
- Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M (2012) Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell *Tsc1* mutant mice. *Nature* 488:647–651.
- Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S (2011) The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2:236–240.
- U**metani T, Tabuchi T, Ichimura R (1986) Cerebellar corticonuclear and corticovestibular fibers from the posterior lobe of the albino rat, with comments on zones. *Brain Behav Evol* 29:54–67.

Ünal-Çevik I, Kiliç M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004) Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: A cautionary note. *Brain Res* 1015:169–174.

Uusisaari M, Knöpfel T (2011) Functional classification of neurons in the mouse lateral cerebellar nuclei. *Cerebellum* 10:637–646.

Valero J, Berciano MT, Weruaga E, Lafarga M, Alonso JR (2006) Pre-neurodegeneration of mitral cells in the *pcd* mutant mouse is associated with DNA damage, transcriptional repression, and reorganization of nuclear speckles and Cajal bodies. *Mol Cell Neurosci* 33:283–295.

Van Beugen BJ, Nagaraja RY, Hansel C (2006) Climbing fiber-evoked endocannabinoid signaling heterosynaptically suppresses presynaptic cerebellar long-term potentiation. *J Neurosci* 26:8289–8294.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329–332.

Van Welie I, Smith IT, Watt AJ (2011) The metamorphosis of the developing cerebellar microcircuit. *Curr Opin Neurobiol* 21:245–253.

Volle J, Brocard J, Saoud M, Gory-Fauré S, Brunelin J, Andrieux A, Suaud-Chagny MF (2013) Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr Bull* 39:969–978.

Voogd J (2011) Cerebellar zones: a personal history. *Cerebellum* 10:334–350.

Voogd J, Glickstein M (1998) The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370–375.

Voogd J, Jaarsma D, Marani E (1996) *Integrated systems of the CNS, part III - Cerebellum, basal ganglia, olfactory system*. Elsevier.

Voogd J, Pardoe J, Ruigrok TJH, Apps R (2003) The distribution of climbing and mossy fiber collateral branches from the copula pyramidis and the paramedian lobule: congruence of climbing fiber cortical zones and the pattern of zebrin banding within the rat cerebellum. *J Neurosci* 23:4645–4656.

Voogd J, Ruigrok TJH (2004) The organization of the corticonuclear and olivocerebellar climbing fiber projections to the rat cerebellar vermis: The congruence of projection zones and the zebrin pattern. *J Neurocytol* 33:5–21.

Walkley SU, Suzuki K (2004) Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim Biophys Acta* 1685:48–62.

Walmsley B, Nicol MJ (1990) Location and morphology of dorsal spinocerebellar tract neurons that receive monosynaptic afferent input from ankle extensor muscles in cat hindlimb. *J Neurophysiol* 63:286–293.

Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ (2005) Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 44:7342–7372.

Walsh J, Desbonnet L, Clarke N, Waddington JL, O'Tuathaigh CMP (2012) Disruption of exploratory and habituation behavior in mice with mutation of DISC1: An ethologically based analysis. *J Neurosci Res* 90:1445–1453.

Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem* 277:20869–20876.

Wang J, Ueda N (2009) Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89:112–119.

Wang T, Morgan JI (2007) The Purkinje cell degeneration (*pcd*) mouse: An unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res* 1140:26–40.

Webster DR, Borisy GG (1989) Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J Cell Sci* 92 (Pt 1):57–65.

- Weis S, Klaver P, Reul J, Elger CE, Fernández G (2004) Temporal and cerebellar brain regions that support both declarative memory formation and retrieval. *Cereb Cortex* 14:256–267.
- Westermann S, Weber K (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:938–947.
- White JJ, Sillitoe R V (2013) Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:149–164.
- Whitney ER, Kemper TL, Bauman ML, Rosene DL, Blatt GJ (2008) Cerebellar Purkinje cells are reduced in a subpopulation of autistic brains: A stereological experiment using calbindin-D28k. *Cerebellum* 7:406–416.
- Wiley JL, Martin BR (2002) Cannabinoid pharmacology: Implications for additional cannabinoid receptor subtypes. *Chem Phys Lipids* 121:57–63.
- Witte H, Bradke F (2008) The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *Curr Opin Neurobiol* 18:479–487.
- Witter L, Canto CB, Hoogland TM, de Gruijl JR, De Zeeuw CI (2013) Strength and timing of motor responses mediated by rebound firing in the cerebellar nuclei after Purkinje cell activation. *Front Neural Circuits* 7:133.
- Wloga D, Gaertig J (2010) Post-translational modifications of microtubules. *J Cell Sci* 124:154–154.
- Wöhr M, Scattoni ML (2013) Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: Current standards and new developments. *Behav Brain Res* 251:5–17.
- World Health Organization (2006) *Neurological Disorders Report*. WHO Press, Ginebra, Suiza
- Y**amanaka H, Yanagawa Y, Obata K (2004) Development of stellate and basket cells and their apoptosis in mouse cerebellar cortex. *Neurosci Res* 50:13–22.
- Yip J, Soghomonian JJ, Blatt GJ (2008) Increased GAD67 mRNA expression in cerebellar interneurons in autism: Implications for Purkinje cell dysfunction. *J Neurosci Res* 86:525–530.
- Yu K, Bayona W, Kallen CB, Harding HP, Ravera CP, McMahon G, Brown M, Lazar MA (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 270:23975–23983.
- Z**hang W, Linden DJ (2006) Long-term depression at the mossy fiber-deep cerebellar nucleus synapse. *J Neurosci* 26:6935–6944.
- Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W, Chen C, Jin X (2012) Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α . *Neuropharmacology* 63:242–249.