



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Biología Celular y Patología

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Laboratorio de Plasticidad Neuronal y Neuroreparación

TERAPIA CELULAR COMBINADA CON EL FÁRMACO
NEUROPROTECTOR N-OLEILETANOLAMINA EN UN MODELO
MURINO DE DEGENERACIÓN NEURONAL SELECTIVA

Tesis Doctoral presentada por

Ester Pérez Martín

para optar al grado de

Doctor en Neurociencias

por la Universidad de Salamanca

Dirigida por:

Prof. Dr. Eduardo Weruaga Prieto

Dr. David Díaz López

Salamanca, julio 2022



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSITY OF SALAMANCA

Department of Cell Biology and Pathology

INSTITUTE OF NEUROSCIENCE OF CASTILE AND LEON

Neuronal Plasticity and Neurorepair Laboratory

CELL THERAPY COMBINED WITH THE NEUROPROTECTIVE
DRUG OLEOYLETHANOLAMIDE IN A MOUSE MODEL OF
SELECTIVE NEURONAL DEGENERATION

A thesis submitted by

Ester Pérez Martín

to obtain the degree of

Doctor in Neuroscience

at University of Salamanca

Supervised by:

Prof. Eduardo Weruaga Prieto, Ph.D.

Dr. David Díaz López, Ph.D.

Salamanca, July 2022

A mis padres y hermana,

A mis abuelos,

A Carlos

Agradecimientos

“Han llegado, ya están dentro, los infinitos seres que me llenan” (Izal, 2015)

Durante estos años, han sido muchos los “seres” que me “han llenado”, me han ayudado y me han impulsado cuando más lo necesitaba, tanto en el marco profesional como en el personal. Estas palabras de agradecimiento son para vosotros.

GRACIAS a mis directores de Tesis, Eduardo Weruaga y David Díaz, por despertar en mí la curiosidad hacia el sistema nervioso allá por el año 2014, por permitirme comenzar en el fascinante mundo de la investigación en vuestro laboratorio y por guiarme en estos primeros pasos de la carrera científica.

GRACIAS a mis amigos y compañeros de poyata (y de hora del café, pizzas y alguna que otra cerveza) por los momentos compartidos que, sin duda, han hecho mucho más sencillo y agradable llegar hasta el final de esta etapa. Me gustaría expresar mi agradecimiento particular a tres personas. Carlitos (i.e., Dr. Del Pilar), gracias por tu ayuda y por todo lo que me enseñaste desde el primer momento que llegué al laboratorio (a pesar de poner en peligro mi integridad física cada vez que había un objeto punzante a tu alrededor). Laura y Paula, gracias por apoyarme en todo momento y por compartir nuestras alegrías, penas, desahogos y cotilleos (muchos).

GRACIAS al resto de compañeros y profesores del Departamento de Biología Celular y Patología por transmitirme no solo vuestro entusiasmo por la ciencia, sino vuestra pasión por la docencia y la divulgación científica. Especialmente, Rosario Arévalo, Conchi Lillo y Almudena Velasco, gracias por convertirnos en un ejemplo a seguir desde que coincidimos, siendo yo alumna, en el Grado en Biología y en el Máster en Neurociencias.

THANKS to Kamran Khodakhah and all the members of the Khodakhah’s Lab for making me feel at home across the Atlantic and showing me how beautiful, how exciting, but also how painful electrophysiology is.

GRACIAS a los servicios de separación celular y de isótopos radiactivos y radioprotección de la Universidad de Salamanca por vuestra ayuda en el desarrollo de esta Tesis.

GRACIAS a mis vecinas del IBFG Marina y Brenda por salvar uno de los últimos experimentos de esta Tesis Doctoral en un caluroso sábado del pasado agosto.

GRACIAS a mi familia y a mis amigas por vuestro apoyo y cariño a pesar de mi ausencia recurrente en estos últimos años.

GRACIAS a Carlos por inspirarme cada día, personal y profesionalmente, por hacerme feliz, por quererme tanto y tan bien.

GRACIAS a mi hermana, Elena, por ser mi compañera, mi amiga y el hombro fiel en el que apoyarme desde que nací.

GRACIAS a mis padres por educarme con unos valores que me han permitido convertirme en lo que soy, por vuestra confianza en mí a pesar de mis tropiezos y, sobre todo, por vuestra paciencia. GRACIAS por enseñarme a ser fuerte ante cualquier adversidad y por alimentarme con vuestro cariño incondicional e inagotable (y sí, también con *tuppers*). Esta Tesis Doctoral es vuestra.

A todos vosotros:

¡GRACIAS por haberme acompañado en esta maravillosa aventura!

La investigación recogida en esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Universidades (FPU16/04259), el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2016-79668-R y PID2019-106943RB-I00), la Junta de Castilla y León (SA178U13 y SA129P20) y la Universidad de Salamanca.

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

"Nothing in life is to be feared, it is only to be understood"

"En la vida no hay nada que temer, solo hay que entender"

Maria Salomea Skłodowska-Curie

Índice

Resumen <i>Abstract</i>	I
Abreviaturas	III
INTRODUCCIÓN	1
Enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamación	1
Neuroinflamación asociada a la degeneración neuronal	2
Gliosis reactiva y tormenta de citocinas.....	2
Cerebelo.....	6
Características anatómicas y citoarquitectura	6
Sinaptología de los circuitos cerebelosos y características electrofisiológicas.....	8
Conectividad externa y funciones del cerebelo	10
Terapia farmacológica: la <i>N</i> -oleiletanolamina	11
Efecto neuroprotector, antiinflamatorio e inmunomodulador de la OEA	14
Isquemia cerebral	14
Parkinsonismo inducido químicamente	15
Hipoxia neonatal.....	16
Estrés de diversa etiología.....	16
Degeneración neuronal cerebelosa.....	18
Posible mecanismo de acción de la OEA.....	18
Terapia celular	20
Origen y clasificación de las células madre	20
Células madre de la médula ósea	20
Células mesenquimales.....	23
Relación entre la terapia celular y el sistema endocannabinoide	26
El ratón mutante PCD: modelo de degeneración y neuroinflamación cerebelosa.....	27
La mutación <i>pcd</i>	28
Efectos generales de la mutación <i>pcd</i>	30
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el cerebelo.....	31
Degeneración cerebelosa en el ratón PCD	31
Proceso degenerativo de las células de Purkinje.....	32
Cambios en otras poblaciones neuronales del cerebelo y reorganización sináptica.....	33
Neuroinflamación cerebelosa	35
Efectos de la mutación en el comportamiento.....	36
Estrategias terapéuticas en el modelo PCD	37
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	45

Animales de experimentación	47
Colonia PCD.....	47
Extracción de DNA	48
Amplificación del DNA mediante PCR	49
Electroforesis en gel de agarosa	50
Colonia GFP	51
Diseño experimental y tamaño muestral de los experimentos.....	51
Terapia farmacológica.....	54
Terapia celular	54
Trasplante de médula ósea completa	54
Ablación de la médula ósea de los animales receptores por irradiación.....	54
Obtención de la médula ósea del donante.....	55
Trasplante de células madre mesenquimales.....	56
Obtención, aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales	56
Administración intravenosa vía plexo retroorbital	58
Seguimiento de la incorporación de células derivadas del trasplante	58
Obtención y preparación de muestras de sangre periférica.....	59
Inmunofluorescencia directa y adquisición en citómetro de flujo.....	59
Análisis del comportamiento motor, cognitivo y social	59
Análisis del comportamiento motor	60
Análisis del comportamiento general.....	60
Análisis de la memoria de reconocimiento	61
Análisis del comportamiento social	63
Análisis electrofisiológico	64
Ajuste de las coordenadas estereotácticas.....	65
Cirugía estereotáctica e implantación de soportes de sujeción.....	66
Registro electrofisiológico <i>in vivo</i>	68
Análisis histológico.....	69
Obtención y preparación del tejido.....	69
Sacrificio y disección.....	70
Seccionamiento.....	71
Inmunofluorescencia indirecta	72
Controles de especificidad	73
Visualización al microscopio y análisis de las imágenes.....	73
Cuantificación de las variables histológicas.....	73
Análisis molecular.....	74
Extracción de muestras en fresco	75
Aislamiento y purificación del RNA total	75

Obtención del DNA complementario.....	76
PCR cuantitativa.....	76
Análisis estadísticos.....	79
RESULTADOS.....	81
ESTRATEGIA TERAPÉUTICA I. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON OEA.....	83
Efecto neuroprotector del tratamiento con OEA.....	83
Optimización de la ventana temporal terapéutica de la OEA en el ratón PCD.....	83
Efecto neuroprotector de la dosis más efectiva de OEA a largo plazo.....	86
Efecto de la OEA en el peso corporal de los animales.....	87
Efecto antitumoral e inmunomodulador de la OEA.....	89
Cambios en la expresión génica de factores inflamatorios y neurotróficos/neuroprotectores....	89
Análisis del peso de los hemisferios cerebelosos y relación con el peso corporal total.....	89
Cambios en la expresión génica a corto plazo en condiciones fisiológicas.....	91
Cambios en la expresión génica a medio plazo.....	92
Cambios en la expresión génica a largo plazo.....	93
Efecto de la OEA en la microglia del ratón PCD.....	94
Cambios en la densidad de la microglia.....	95
Cambios en el fenotipo de la microglia.....	97
Efecto de la OEA en el reclutamiento de leucocitos.....	104
Efecto de la OEA en la actividad electrofisiológica del cerebelo.....	106
Ajuste de coordenadas estereotácticas y localización de los NCP.....	106
Análisis electrofisiológico.....	107
Efecto de la OEA en el comportamiento del ratón PCD.....	109
Comportamiento motor.....	109
Comportamiento general.....	111
Memoria de reconocimiento.....	112
Comportamiento social.....	115
Implicación del receptor PPAR α en los efectos del tratamiento con OEA.....	116
Análisis histológico.....	117
Análisis del comportamiento.....	117
ESTRATEGIA TERAPÉUTICA II. TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y BMSC.....	119
Reconstitución de la médula ósea.....	119
Efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en el comportamiento motor del ratón PCD.....	120
Llegada de células derivadas del trasplante al cerebelo.....	121
Efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y BMSC a nivel histológico.....	123
Análisis histológico a P30.....	123
Análisis histológico a P40.....	124

Efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en el peso corporal de los animales	127
ESTRATEGIA TERAPÉUTICA III. TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y MSCs.....	129
Análisis de las células derivadas del trasplante en sangre.....	129
Efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en el comportamiento motor del ratón PCD130	
Llegada de células derivadas del trasplante al cerebelo	131
Efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y MSCs a nivel histológico	132
Análisis histológico a P30.....	132
Efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en el peso corporal de los animales	134
DISCUSIÓN	137
La OEA ejerce un efecto neuroprotector en el ratón PCD	139
Optimización del tratamiento con OEA y efecto neuroprotector a largo plazo.....	139
Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la OEA.....	142
La OEA produce cambios en la expresión génica en condiciones fisiológicas	142
La OEA modula la respuesta inflamatoria del ratón PCD a largo plazo	143
La OEA disminuye la microgliosis y modula su fenotipo hacia un estado antiinflamatorio	148
La OEA reduce el reclutamiento de leucocitos periféricos.....	150
Efecto del tratamiento con OEA en la fisiología del cerebelo y comportamiento del ratón PCD152	
Propiedades electrofisiológicas del cerebelo del ratón PCD.....	152
La OEA mejora parcialmente el comportamiento motor, cognitivo y social del ratón PCD... 154	
Los efectos observados de la OEA en el ratón PCD están mediados principalmente por los receptores PPAR α	155
Efecto de los tratamientos combinados en el ratón PCD.....	156
El tratamiento combinado de OEA y células madre es seguro y eficaz.....	158
La terapia combinada de OEA y BMSC mejora parcialmente el comportamiento motor del ratón PCD a P30	160
El tratamiento combinado de OEA y células madre permite la llegada e incorporación de células derivadas del trasplante al cerebelo.....	161
Terapia combinada de OEA y BMSC.....	161
Terapia combinada de OEA y MSCs.....	162
Las terapias combinadas ejercen un efecto neuroprotector parcial a nivel histológico en el cerebelo.....	163
CONCLUSIONES.....	165
ENGLISH SUMMARY	169
Abbreviations.....	171
Introduction.....	173
Hypothesis and objectives	175
Material and Methods.....	177
Animals and experimental design	177

Pharmacological therapy	178
Cell therapy	178
Bone marrow harvesting	178
Mesenchymal stem cells culture	178
Cell transplantation and monitoring.....	179
Behavioral analyses.....	179
Electrophysiological analyses	180
Histological analyses.....	181
Tissue extraction and processing.....	181
Microscopy visualization and quantifications.....	182
Molecular analyses.....	182
Statistical analyses	183
Results	183
Approach I. Pharmacological treatment with OEA.....	183
Neuroprotective effect of OEA on Purkinje cell morphology and density	183
Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of OEA	184
OEA effect on cerebellar electrophysiology and functions.....	187
Role of PPAR α receptors in the effects exerted by OEA in PCD mice.....	189
Approach II. Combined treatment of OEA and BMSC transplantation	189
Safety and viability of the combined treatment.....	189
Effect of OEA and BMSC on motor behavior	190
Arrival of transplanted cells into the cerebellum and analysis of their effect on Purkinje cell morphology and density	190
Approach III. Combined treatment of OEA and continuous MSCs transplantation	191
Analysis of MSCs in peripheral blood.....	191
Effect of OEA and MSCs on motor behavior	192
Arrival of MSCs into the cerebellum and analysis of their effect on Purkinje cell morphology and density	192
Discussion.....	194
OEA delays Purkinje cell dysfunction and death	194
OEA modulates neuroinflammation and counteracts microgliosis and leukocyte recruitment..	196
OEA partially restores behavioral defects linked to cerebellar dysfunction	197
The neuroprotective properties of OEA are mediated by PPAR α in PCD mice	199
Combined treatments of OEA and cell therapy are safe and allow the arrival and integration of transplanted cells in the cerebellum	199
Combined treatment of OEA and cell therapy improves motor behavior at P30 but without a noticeable synergistic neuroprotective effect	201
Conclusions	202
Figures.....	204

BIBLIOGRAFÍA <i>REFERENCES</i>	227
APÉNDICES <i>APPENDICES</i>	243
Apéndice I <i>Appendix I</i>	245
Productos químicos <i>Chemicals</i>	247
Soluciones de uso común <i>Commonly used solutions</i>	250
Software.....	252
Websites.....	253
Apéndice II <i>Appendix II</i>	255
Apéndice III <i>Appendix III</i>	269
Apéndice IV <i>Appendix IV</i>	293

Resumen | *Abstract*

Desde hace décadas, la búsqueda y el desarrollo de tratamientos eficaces para hacer frente a la pérdida neuronal de las enfermedades neurodegenerativas han supuesto un gran desafío para la ciencia y la sociedad. La mayoría de las terapias actuales son paliativas y están basadas en la filosofía “*un gen, una enfermedad, un fármaco*”. Sin embargo, existen pocos estudios en los que se haya explorado el efecto sinérgico resultante de la combinación de diferentes estrategias terapéuticas para impedir esta degeneración neuronal.

Esta Tesis Doctoral analiza y compara las propiedades neuroprotectoras a nivel celular y comportamental de tratamientos combinados de una terapia farmacológica con *N*-oleiletanolamina (OEA) y de terapia celular con células madre, en un modelo de degeneración neuronal cerebelosa: el ratón mutante PCD. En primer lugar, el tratamiento exclusivo con OEA retrasa las alteraciones morfológicas y la muerte de las neuronas en degeneración, modula la neuroinflamación y restaura funciones motoras, cognitivas y sociales alteradas en este modelo animal. En segundo lugar, los tratamientos combinados evaluados no muestran de forma global una neuroprotección sinérgica respecto al tratamiento farmacológico exclusivo con OEA, salvo en el comportamiento motor.

Estos resultados ponen en evidencia la complejidad de la patología neurodegenerativa y de sus posibles tratamientos. Lejos de apoyar el enfoque empírico como solución a largo plazo, estos resultados invitan a una investigación más consolidada de los mecanismos subyacentes a estos fenómenos biológicos.

For decades, the search and development of effective treatments to stop the defining neuronal loss of neurodegenerative diseases have posed a great challenge for science and society. Most of the current therapies are palliative and based on the “one gene, one disease, one drug”

philosophy. However, few studies addressed the synergistic effect driven by the combination of different therapeutic strategies to prevent this neuronal degeneration.

In this Doctoral Thesis, the neuroprotective properties of combined treatments of a pharmacological therapy with oleoylethanolamide (OEA) and stem cell therapy are analyzed and compared at the cellular and behavioral levels in a model of cerebellar neuronal degeneration: the PCD mutant mouse. First, exclusive treatment with OEA delays morphological alterations and death of degenerating neurons, modulates neuroinflammation, and restores impaired motor, cognitive, and social functions in this animal model. Secondly, the combined treatments assessed do not fully exert a synergistic neuroprotection with respect to the exclusive pharmacological treatment of OEA, except for motor behavior.

These findings highlight the complexity of neurodegenerative pathology and its potential treatments. Far from supporting the empirical approach as a long-term solution, these results call for more consolidated research of the mechanisms underlying these biological phenomena.

Abreviaturas

AGTPBP1	Proteína de unión AGT/GTP 1 (del inglés <i>AGT/GTP Biding Protein 1</i>)
ANOVA	Análisis de la varianza (del inglés <i>ANalysis Of VAriance</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
BHE	Barrera hematoencefálica
BMSC	Células madre derivadas de la médula ósea (del inglés <i>Bone Marrow-derived Stem Cells</i>)
CCP	Capa de las células de Purkinje
CCP1	Carboxipeptidasa citosólica 1 (del inglés <i>Cytosolic CarboxyPeptidase 1</i>)
CG	Capa de los granos
CM	Capa molecular
CONDCA	Enfermedad neurodegenerativa de origen infantil con atrofia cerebelosa (del inglés <i>Childhood-Onset NeuroDegeneration with Cerebellar Atrophy</i>)
COX2	Ciclooxigenasa 2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DI	Índice de discriminación
EAE	Encefalomielitis autoinmune experimental
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
ESM	Error estándar de la media
FAAH	Amida hidrolasa de ácidos grasos (del inglés <i>Fatty Acid Amide Aydrolase</i>)
FBS	Suero fetal bovino (del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i>)
GAP43	Proteína asociada al crecimiento 43 (del inglés <i>Growth Associated Protein 43</i>)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (del inglés <i>GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>)
i.p.	Vía de administración intraperitoneal
IFN γ	Interferón γ
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible (del inglés <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
ISI CV	Coefficiente de variación del intervalo entre disparos (del inglés <i>Inter-Spike Interval Coefficient of Variation</i>)
MAP2	Proteína de unión a microtúbulos 2 (del inglés <i>Microtubule Associated Protein 2</i>)
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media (del inglés <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i>)

MSCs	Células mesenquimales (del inglés <i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
NAAA	Amidasa ácida de la N-acil-etanolamida (del inglés <i>N-Acylethanolamine Acid Amide Hydrolase</i>)
NAPE-PLD	N-acil-fosfatidiletanolamida fosfolipasa D (del inglés <i>N-Acyl PhosphatidylEthanolamine PhosphoLipase D</i>)
NCP	Núcleos cerebelosos profundos
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NOR	Reconocimiento de objetos novedoso (del inglés <i>Novel Object Recognition</i>)
OEA	N-oleiletanolamina, oleiletanolamida
OMS	Organización mundial de la salud
P	Postnatal
pb	Pares de bases
PB	Tampón fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffer</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCD	Degeneración de las células de Purkinje (del inglés <i>Purkinje Cell Degeneration</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEA	Palmitoiletanolamida
PPARα	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas α (del inglés <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α</i>)
r.o.	Vía de administración retroorbital
r.p.m.	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SI	Índice de sociabilidad
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SYN	Sinucleína (del inglés <i>SYNuclein</i>)
TNFα	Factor de necrosis tumoral α (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor α</i>)
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (del inglés <i>Transient Receptor Potential Vanilloid subtype 1</i>)
WT	Silvestre (del inglés <i>Wild Type</i>)



Introducción

ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y NEUROINFLAMACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP) caracterizadas por la pérdida progresiva de elementos neurales vulnerables que ocasiona trastornos neurológicos graves, según la OMS y los NIH¹ de los Estados Unidos (EE. UU.) (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369>, <https://www.niehs.nih.gov/research/supported/health/neurodegenerative/index.cfm>). De esta forma, todas las enfermedades neurodegenerativas comparten dos características fundamentales: vulnerabilidad neural selectiva y progreso negativo de la enfermedad. Otro rasgo común en la mayoría de ellas es el desarrollo de reacciones inflamatorias que pueden contribuir al proceso de muerte neuronal primaria y empeorar la evolución del proceso degenerativo (Guzmán-Martínez *et al.*, 2019). A pesar de ello, la incidencia, etiología, manifestaciones clínicas y pronóstico varía enormemente en función de la enfermedad concreta a la que hagamos referencia (Dugger y Dickson, 2017; Fu *et al.*, 2018).

Como se ha mencionado anteriormente, la etiología es muy diversa e incluso en muchos casos desconocida (Dugger y Dickson, 2017). Actualmente, se sabe que el primer factor de riesgo de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas es el envejecimiento (Hou *et al.*, 2019). Así, con el aumento de la esperanza de vida, se estima que la prevalencia de estas enfermedades incrementará considerablemente en las próximas décadas (OMS, GBD² 2019). En Europa, la prevalencia actual de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia es de 1,94 %, y se estima que sea del 2,00 % en 2025 y del 3,28 % en 2050. En España, las estimaciones son incluso peores y los valores de prevalencia estarían actualmente en un 2,06 %, y pasarían a 2,13 % y 3,99 %, en 2025 y 2050 respectivamente (Alzheimer Europe, 2019).

A pesar de que en la actualidad existen algunos tratamientos capaces de ralentizar algunos procesos degenerativos o, al menos, paliar los síntomas clínicos asociados (Wang *et al.*, 2020), aún no disponemos de un terapia verdaderamente eficaz que consiga frenar la pérdida neuronal. Con los datos que disponemos sobre prevalencia, y teniendo en cuenta el gran impacto que estas patologías suponen tanto para la persona que las padece como para su familia y su entorno, las enfermedades neurodegenerativas constituyen un verdadero reto para la humanidad, y para la ciencia y la medicina, en particular.

¹ Del inglés *National Institutes of Health*

² Del inglés *Global Burden of Disease Study*

En este sentido, la comunidad científica lleva décadas dedicando grandes esfuerzos a la investigación básica, traslacional y clínica de estas enfermedades, con el fin de descubrir desde los posibles mecanismos genéticos y moleculares que subyacen a las mismas, hasta el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que puedan mejorar el progreso de la enfermedad y, en definitiva, la calidad de vida del paciente. Precisamente, la evaluación de nuevas terapias farmacológicas y celulares en un modelo de degeneración neuronal y neuroinflamación constituye el objetivo principal del proyecto de investigación de la presente Tesis Doctoral.

Así, comenzaremos la Introducción de este trabajo exponiendo las características comunes que comparten las enfermedades neurodegenerativas en relación con los procesos de neuroinflamación. A continuación, se desarrollarán unos conceptos básicos sobre la citoarquitectura y sinaptología del cerebelo, región encefálica de interés del estudio que se presenta. Seguido, se expondrán los conocimientos actuales que disponemos de dos terapias prometedoras en el campo: el tratamiento farmacológico con *N*-oleiletanolamina (OEA) y la terapia celular con células madre. Y finalmente, se detallarán las principales características del modelo animal de degeneración neuronal y neuroinflamación cerebelosa empleado, el ratón mutante PCD (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*).

Neuroinflamación asociada a la degeneración neuronal

Como se mencionó anteriormente, uno de los signos fisiopatológicos comunes de muchas enfermedades neurodegenerativas es una reacción inflamatoria exacerbada en el SNC. Este proceso inflamatorio recibe el nombre de neuroinflamación y en él participan principalmente las células gliales del propio SNC, células del sistema inmunitario periférico y una tormenta de mediadores inflamatorios (Song y Colonna, 2018; Yang y Zhou, 2019). A pesar de que el objetivo principal de esta respuesta es la defensa y protección del SNC, cuando se mantiene de forma crónica y exacerbada genera un ambiente neurotóxico que contribuye al daño y a la pérdida neuronal (Kwon y Koh, 2020).

Gliosis reactiva y tormenta de citocinas

Las células gliales, principalmente astrocitos y microglía, desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis en el SNC en condiciones fisiológicas (Sousa *et al.*, 2017; Subhramanyam *et al.*, 2019; Muzio *et al.*, 2021). Ante un daño neuronal,

bien por procesos infecciosos, trauma, ictus o degeneración, las neuronas dañadas liberan moléculas de señalización que son detectadas por la microglía y astrogliá, y se desencadena un proceso inflamatorio conocido como gliosis reactiva (Baltanás *et al.*, 2013; Salter y Stevens, 2017; Subhramanyam *et al.*, 2019; Kwon y Koh, 2020). La activación de la microglía y los astrocitos está caracterizada por una hipertrofia y cambios en la morfología celular, modificación de su distribución, y producción de un amplio abanico de moléculas (Salter y Stevens, 2017; Sousa *et al.*, 2017; Song y Colonna, 2018; Subhramanyam *et al.*, 2019; Jurga *et al.*, 2020; Kwon y Koh, 2020). En el caso de los astrocitos, además de aumentar su tamaño celular, sobreexpresan una proteína del citoesqueleto, la GFAP³ (Salter y Stevens, 2017; Stephenson *et al.*, 2018; Yang y Zhou, 2019). En cuanto a los cambios morfológicos de la microglía, sus ramificaciones se acortan y aumentan de grosor, pasando de una morfología ramificada a un estado globoso e hipertrofiado (Río-Hortega, 1919; Kreutzberg, 1996; Sierra *et al.*, 2016; Stephenson *et al.*, 2018; Kwon y Koh, 2020). Además, ambas poblaciones gliales, una vez activadas, secretan un amplio abanico de mediadores inflamatorios (Mecha *et al.*, 2016; Salter y Stevens, 2017; Stephenson *et al.*, 2018; Jurga *et al.*, 2020; Kwon y Koh, 2020).

Tradicionalmente, en base a la intensidad de la gliosis y la función predominante de las células gliales ante una respuesta inflamatoria se describieron dos estados inflamatorios, especialmente en el caso de la microglía. Un estado proinflamatorio o M1, caracterizado por una activación desmesurada de las células gliales y por lo tanto neurotóxica; y un estado antiinflamatorio o M2, donde la respuesta es proporcional al daño y confiere un ambiente neuroprotector (Orihuela *et al.*, 2016; Tang y Le, 2016; Salter y Stevens, 2017). Además, en función del ambiente y los mediadores que promueven la activación de la microglía, a los dos estados mencionados anteriormente resultado de la activación clásica y alternativa, habría que añadir un tercer estado inmunosupresor producido por una desactivación adquirida (Subhramanyam *et al.*, 2019). Sin embargo, los estudios en los que se evaluó la transcriptómica y proteómica microglial han revelado que la respuesta glial va más allá de esta clasificación tricotómica, de manera que más bien consiste en un amplio espectro de fenotipos caracterizados por una expresión variable y compleja de diferentes marcadores y mediadores pro- y antiinflamatorios (Tang y Le, 2016; Salter y Stevens, 2017; Jurga *et al.*, 2020; Muzio *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2021).

³ Del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*

En procesos neurodegenerativos, donde se produce una respuesta inflamatoria crónica, la microglía libera citocinas proinflamatorias, principalmente, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL1 β) e IL6, interferón γ (IFN γ) y especies reactivas de oxígeno (ROS⁴; Wang *et al.*, 2015; Stephenson *et al.*, 2018; Kwon y Koh, 2020). Sin embargo, esta tormenta de citocinas y moléculas citotóxicas puede variar en su composición en función del daño cerebral que la desencadene (Stephenson *et al.*, 2018; Voet *et al.*, 2019; Brahadeeswaran *et al.*, 2022). En este sentido, varios autores incluso sugieren la existencia de diferentes perfiles inflamatorios y cascadas de señalización particulares en base al daño neuronal concreto (Heneka *et al.*, 2018; Liberman *et al.*, 2018; Stephenson *et al.*, 2018; Voet *et al.*, 2019; Brahadeeswaran *et al.*, 2022). En general, esta tormenta de citocinas proinflamatorias mantenida en el tiempo genera un ambiente neurotóxico y promueve la muerte de las neuronas de la región encefálica afectada (Hickman *et al.*, 2018; Kwon y Koh, 2020; Muzio *et al.*, 2021; Brahadeeswaran *et al.*, 2022). Por otro lado, se ha demostrado que un aumento en la respuesta inflamatoria también puede alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), y junto a la tormenta de citocinas y factores proinflamatorios, promover la infiltración y reclutamiento de células del sistema inmunitario periférico hacia el parénquima cerebral (Schwartz y Baruch, 2014). De manera controlada, este fenómeno juega un papel crítico en la regulación de la microglía y la neuroinflamación a través de mediadores antiinflamatorios como IL10 o TGF β ⁵ (Schwartz y Baruch, 2014). Sin embargo, una infiltración masiva de leucocitos periféricos puede contribuir negativamente en el proceso neurodegenerativo (Figura 1; Kyuhou *et al.*, 2006; Schwartz y Baruch, 2014; Sweeney *et al.*, 2018; Profaci *et al.*, 2020; Del Pilar *et al.*, 2021). De esta forma, aunque en un primer momento la respuesta neuroinflamatoria cumple un papel crucial para detener la progresión y extensión del daño cerebral que la desencadenó, si se mantiene de forma exacerbada en el tiempo, genera un círculo vicioso de retroalimentación cuyo resultado es un entorno neurotóxico que promueve la muerte de más elementos neurales (Figura 1; Schwartz y Baruch, 2014; Yang y Zhou, 2019; Kwon y Koh, 2020).

En este sentido, gran parte de las investigaciones sobre el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas están enfocadas en la modulación de esta respuesta inflamatoria crónica, bien mediante un

⁴ Del inglés *Reactive Oxygen Species*

⁵ Del inglés *Transforming Growth Factor Beta*

efecto directo sobre la microglía o indirecto sobre el sistema inmunitario periférico y la BHE (Chen y Trapp, 2016; Stephenson *et al.*, 2018; Muzio *et al.*, 2021).

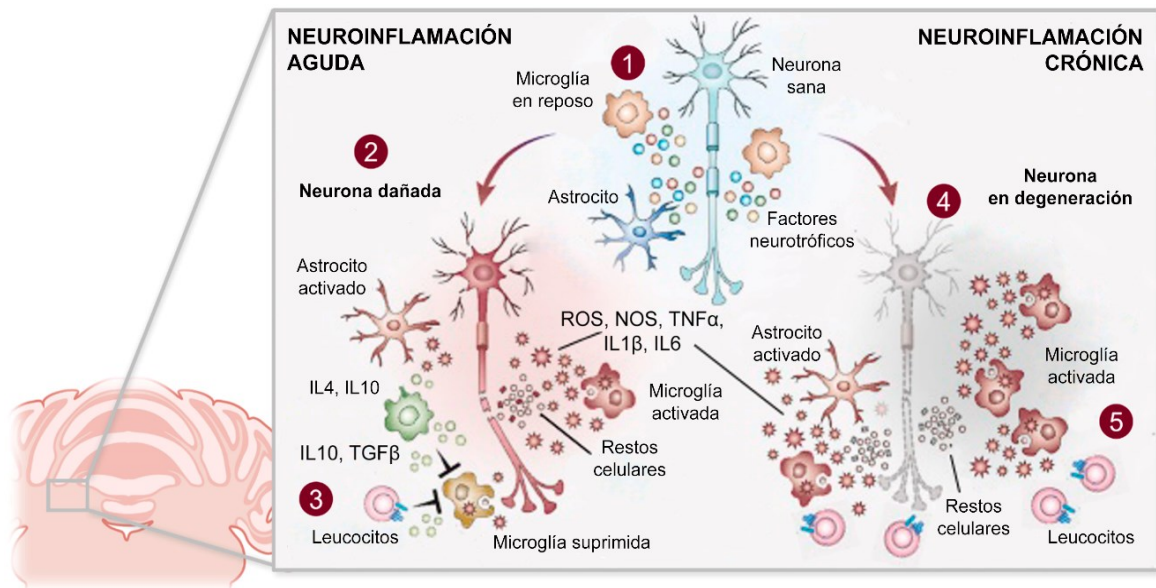


FIGURA 1 | Distintos escenarios de neuroinflamación aguda y crónica. (1) De forma general, las células gliales actúan como centinelas manteniendo la homeostasis del SNC, proporcionando al parénquima neural un entorno favorable para su función. (2) Tras un daño agudo en el SNC, las células dañadas y los restos celulares de las que han muerto activan de forma local a la microglía y los astrocitos que comienzan a secretar factores proinflamatorios como ROS, TNF α , IL1 β e IL6 que promueven la infiltración de células inmunitarias periféricas. (3) Durante el proceso de reparación tisular, los leucocitos reclutados hacia el parénquima cerebral suprimen la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias como IL10 y TGF- β ayudando a la resolución de la neuroinflamación aguda. (4) En enfermedades neurodegenerativas, la respuesta inflamatoria se mantiene crónicamente y la acumulación de factores proinflamatorios produce una reacción glial exacerbada y un ambiente neurotóxico. (5) Los restos celulares de las propias neuronas en degeneración, así como las células colindantes que mueren por la neurotoxicidad de la región, promueven la infiltración masiva de leucocitos periféricos que contribuyen al proceso degenerativo. IL, interleucina; NOS, óxido nítrico sintasa; ROS, especies reactivas de oxígeno; TGF β , factor de crecimiento transformante beta; TNF α , factor de necrosis tumoral alpha. Modificado de Schwartz y Baruch, 2014.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado un modelo animal de neurodegeneración y neuroinflamación, el ratón mutante PCD, cuya principal población neuronal afectada se encuentra en el cerebelo (ver más adelante). En los siguientes apartados de la Introducción se incluirá una descripción global y posteriormente, un enfoque particular en relación con el cerebelo. Por este motivo, consideramos oportuno introducir en este momento una serie de conceptos sobre la estructura, organización sináptica y funciones de esta región encefálica.

CEREBELO

Características anatómicas y citoarquitectura

El cerebelo es una estructura del SNC localizada en la región dorsocaudal del encéfalo de los mamíferos cuya morfología anatómica recuerda a la del cerebro, y de ahí que se denominase *cerebellum*, término que en latín significa “cerebro pequeño” (Sillitoe y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013). Macroscópicamente, el cerebelo presenta dos regiones laterales denominadas hemisferios cerebelosos, separados por una región central denominada vermis (Figura 2). La parte medial de los hemisferios que se encuentra adyacente al vermis recibe el nombre de zona intermedia o paravermis. Además, también podemos observar en las zonas más laterales del cerebelo los flóculos y paraflóculos (Figura 2; Sillitoe y Joyner, 2007).

A lo largo de su superficie externa, el cerebelo presenta una serie de surcos o fisuras perpendiculares al eje anteroposterior, que dividen la corteza cerebelosa en lóbulos (Sillitoe y Joyner, 2007). En concreto, en el plano parasagital del vermis, se distinguen diez lóbulos designados con números romanos del I al X desde la región más anterior a la región posterior (Figura 2 y 3; White y Sillitoe, 2013).

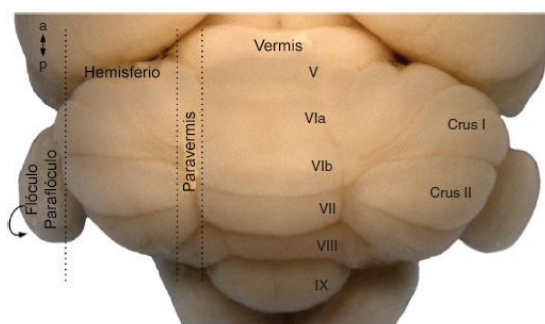


FIGURA 2 | Vista dorsal macroscópica de un cerebelo de ratón adulto. Se aprecian las tres regiones principales: hemisferios cerebelosos, zona intermedia (paravermis) y vermis. *a*, anterior; *p*, posterior. Modificado de White y Sillitoe, 2013.

A nivel histológico, diferenciamos tres regiones desde la parte más externa hacia la más interna: corteza cerebelosa, sustancia blanca y núcleos cerebelosos profundos (NCP).

La corteza cerebelosa está dispuesta en pliegues denominados láminas cerebelosas o *folia cerebelli*, y compuesta por una estructura trilaminar, que desde la parte más superficial a la más interna consiste en: la capa molecular (CM), la capa de las células de Purkinje (CCP) y la capa de los granos (CG; Figura 3). La CM presenta una alta densidad de fibras de neuropilo procedentes en su gran mayoría de capas más internas como veremos a continuación. Además, también existen somas neuronales, aunque son minoritarios, correspondientes a las células estrelladas y células en cesto cuya función principal es

modular la actividad de las células de Purkinje. A continuación, está la CCP, donde encontramos los somas de las células de Purkinje dispuestos en monocapa, las células en candelabro (Lainé y Axelrad, 1994) y los somas de la glía de Bergmann (Voogd y Glickstein, 1998). Las células de Purkinje extienden su complejo árbol dendrítico hacia la capa superior adyacente (la CM) y envían su axón hacia la capa inferior (la CG). Por último, la capa más interna de la corteza cerebelosa es la CG, constituida por el tipo neuronal más numeroso en el encéfalo, los granos cerebelosos, junto a otras interneuronas, como las células de Golgi, las células de Lugaro y las células unipolares en cepillo. Los granos cerebelosos presentan unas dendritas cortas en forma de garra y envían sus axones hacia la CM donde se bifurcan formando las fibras paralelas (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007; Sathyanesan *et al.*, 2019). Además, en la corteza cerebelosa también encontramos las terminaciones de las dos vías principales aferentes del cerebelo, las fibras musgosas y fibras trepadoras, en la CG y CM respectivamente (Sillitoe y Joyner, 2007).

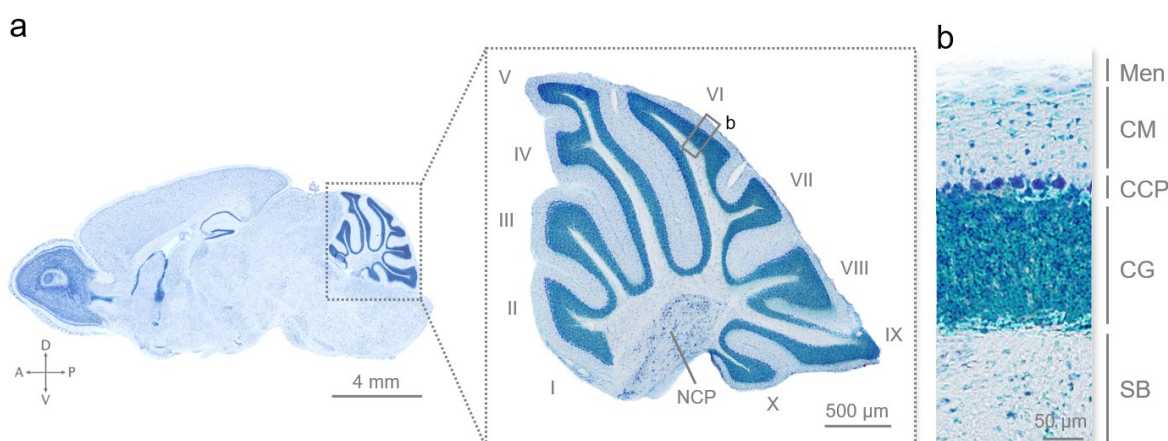


FIGURA 3 | Citoarquitectura del cerebelo de ratón adulto. (a) A la izquierda, sección sagital de un encéfalo de ratón adulto en el que se observa la localización del cerebelo en la parte dorsocaudal; a la derecha, sección sagital del vermis cerebeloso, donde podemos apreciar los diez lóbulos enumerados del I al X y los núcleos cerebelosos profundos (NCP) en la parte central rodeados por sustancia blanca. (b) Microfotografía de la corteza cerebelosa de un ratón adulto donde se observa la organización trilaminar característica de esta región y la diferencia en la densidad celular de las tres capas: capa molecular (CM), capa de las células de Purkinje (CCP) y capa de los granos (CG). A, anterior; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular; D, dorsal; Men, meninges; NCP, núcleos cerebelosos profundos; P, posterior; SB, sustancia blanca; V, ventral. Tinción azul de toluidina.

Dispuesta por debajo de la corteza cerebelosa, encontraríamos la sustancia blanca formada por neuropilo, y los NCP (Voogd y Glickstein, 1998). Los NCP son el elemento clave del circuito corticocerebeloso como veremos más adelante, pues son la única vía eferente del cerebelo. Existen tres pares simétricos, que son desde la parte más medial a la

lateral, el núcleo fastigial, el núcleo interpósito (compuesto por el núcleo emboliforme y el globoso) y el núcleo dentado (Voogd y Glickstein, 1998).

Sinaptología de los circuitos cerebelosos y características electrofisiológicas

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

El circuito básico del cerebelo continúa siendo el establecido por Santiago Ramón y Cajal hace más de un siglo en su libro *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés* (Cajal, 1909, 1911). Las células de Purkinje reciben sinapsis excitatorias principalmente de dos vías aferentes. Por un lado, las fibras musgosas procedentes de la médula espinal y el bulbo raquídeo establecen sinapsis excitatorias en los granos de la CG, y estas a través de sus largos axones en forma de T realizan sinapsis con un gran número de células de Purkinje en la CM (Figura 4; Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007). A través de esta vía, el cerebelo recibe información sensorial periférica, y de la corteza cerebral. Por otro lado, las fibras trepadoras procedentes del complejo olivar inferior discurren alrededor de las ramas de las dendritas de las células de Purkinje estableciendo con ellas numerosos contactos sinápticos (Figura 4; Voogd y Glickstein, 1998). A través de esta vía, el cerebelo recibe información somatosensorial, visual y de la corteza cerebral. Además, tanto las fibras musgosas como las fibras trepadoras proyectan colaterales hacia los NCP (Figura 4; Sillitoe y Joyner, 2007).

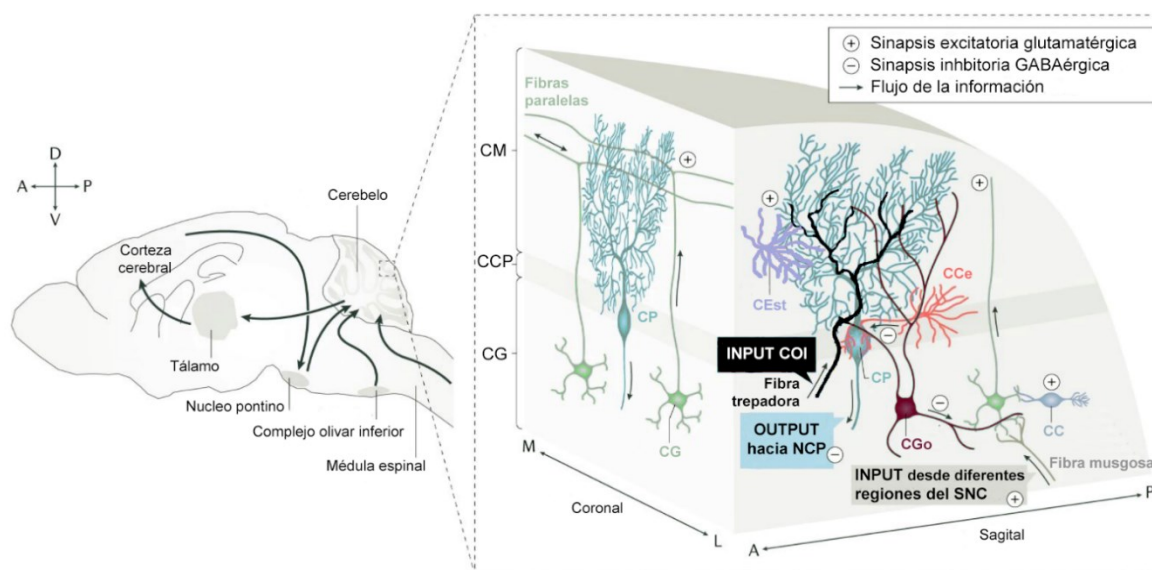


FIGURA 4 (Pie de figura en la siguiente página)

Por otro lado, la actividad de las células de Purkinje está inhibida por las células estrelladas, células en cesto y células de Golgi (Figura 4). Como se puede observar, las células de Purkinje se encuentran siempre en el medio de estos circuitos, siendo el tipo neuronal que integra y envía hacia los NCP toda la información procesada en la corteza cerebelosa (Sillitoe y Joyner, 2007).

Las dos vías excitatorias aferentes del cerebelo producen un patrón de disparo diferente en las células de Purkinje (Thach, 1968; Ito, 2006). Las fibras musgosas por medio de las fibras paralelas generan disparos simples en las células de Purkinje, y por su parte, las fibras trepadoras evocan disparos complejos. La denominación de los patrones de disparo hace referencia a la morfología de la onda durante el registro electrofisiológico de la actividad neuronal (Figura 5). Los disparos simples, como indica su nombre, son aquellos en los que se observa una onda simple como la mostrada en la Figura 5i, mientras que en los disparos complejos se observa una onda principal seguida de un tren de ondas de menor amplitud como el mostrado en la Figura 5ii (Thach, 1968; Ito, 2006).

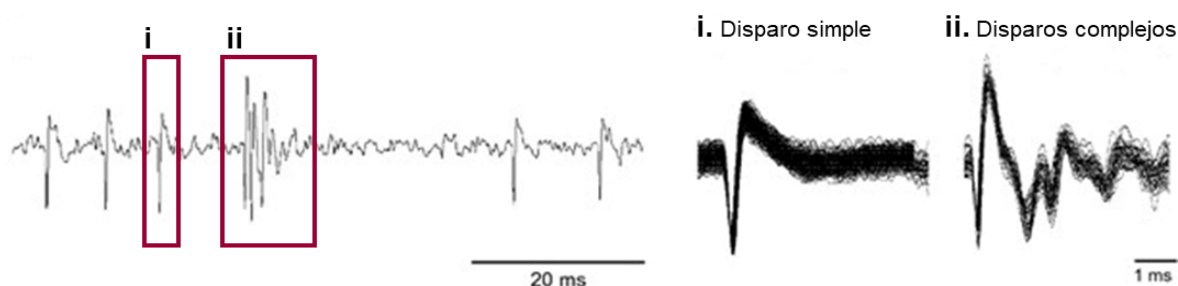


FIGURA 5 | Representación gráfica de la actividad neuronal de las células de Purkinje. A la izquierda, ejemplo de un registro electrofisiológico de una neurona con disparos simples y complejos. A la derecha, vista expandida del trazo de (i) un disparo simple y (ii) un disparo complejo, donde se observa en este último una onda principal seguida de un tren de ondas secundarias típicas de este tipo de actividad.

◀ **FIGURA 4 | Circuitos y conexiones cerebelosas principales.** A la izquierda, están representadas las vías eferentes y aferentes desde y hacia el cerebelo en un esquema general del encéfalo de un ratón. Las principales vías de entrada de información (INPUT) a través de las fibras trepadoras y musgosas proceden de la médula espinal, complejo olivar inferior (COI) y núcleo pontino, mientras que la única vía de salida (OUTPUT) es desde los núcleos cerebelosos profundos (NCP) hacia el tálamo y la corteza cerebral. A la derecha, se observa un esquema de los tipos celulares, circuitos cerebelosos y sinapsis excitatorias (+) e inhibitorias (-) dentro de la corteza cerebelosa. A, anterior; CC, célula unipolar en cepillo; CCe, célula en cesto; CCP, capa de las células de Purkinje; CEst, célula estrellada; CG, capa de los granos y célula grano; CGo, célula de Golgi; CM, capa molecular; COI, complejo olivar inferior; CP, célula de Purkinje; D, dorsal; L, lateral; M, medial; NCP, núcleos cerebelosos profundos; P, posterior; SNC, sistema nervioso central; V, ventral. Modificado de Sathyanesan et al., 2019.

Las células de Purkinje disparan espontáneamente y a intervalos muy regulares debido a su marcapasos interno (Häusser y Clark, 1997; Womack y Khodakhah, 2002). Actualmente, existen estudios que correlacionan la pérdida de precisión de este marcapasos interno de las células de Purkinje con un funcionamiento anómalo del cerebelo (Walter *et al.*, 2006; Fremont *et al.*, 2015; Tara *et al.*, 2018). Así, en modelos donde existe una afectación cerebelosa se ha observado que el patrón de disparo de las células de Purkinje se hace más irregular cuanto más grave sea dicha afectación (Walter *et al.*, 2006; Fremont *et al.*, 2015; Tara *et al.*, 2018; Washburn *et al.*, 2019; Snell *et al.*, 2022).

Por último, las células de Purkinje, una vez integrada toda la información, envían sus axones hacia los NCP donde establecerán sinapsis GABAérgicas inhibitorias. Curiosamente, esta vía eferente de la corteza cerebelosa está organizada topográficamente, de manera que las células de Purkinje situadas en regiones más laterales de los hemisferios cerebelosos establecen contacto sináptico con el NCP más lateral, es decir, el núcleo dentado; las de la zona intermedia con el núcleo interpósito y las del vermis cerebeloso con el núcleo fastigial. Por último, cada uno de los NCP envía sus proyecciones a regiones encefálicas específicas (Voogd y Glickstein, 1998). Así, las células de Purkinje constituyen la única eferencia de la corteza cerebelosa y, al mismo tiempo, los NCP, que reciben su información, son la única salida de todo el cerebelo. De esta forma, un daño o una disfunción en las células de Purkinje determina una funcionalidad cerebelosa anómala (Walter *et al.*, 2006; Tara *et al.*, 2018).

Conectividad externa y funciones del cerebelo

El cerebelo recibe aferencias cortico-ponto-cerebelosas, que informan de la orden motora, y aferencias espino-cerebelosas, que aportan información sobre el estado propioceptivo y sensorial de las extremidades y del tronco (Figura 6). Por ello, el cerebelo se considera un centro de integración esencial de la información sensorio-motora para el control del movimiento, el mantenimiento de la postura y el aprendizaje motor (Ito, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007; Manto *et al.*, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas diversos estudios de neuroanatomía, neuroimagen y de comportamiento han demostrado evidencias para redefinir las funciones en las que está implicada esta región encefálica. Así, diversos autores consideran al cerebelo una región esencial para la integración del procesamiento de la información cognitiva, afectiva y social, del lenguaje, de la atención, del aprendizaje y de la memoria (Figura 6; Reeber *et al.*, 2013; Vožeh, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Carta *et al.*, 2019; Van der Heijden *et al.*, 2021).

Tanto en estudios *in vivo* con modelos animales como en estudios clínicos en los que se analizó el comportamiento de pacientes con daño cerebeloso se ha observado que más allá de los síntomas motores típicos como la ataxia y la disartria, a menudo también aparecen alteraciones en el comportamiento cognitivo-afectivo, en la realización de funciones ejecutivas, en la memoria visoespacial y en el lenguaje (para revisión Stoodley y Schmahmann, 2010). Estos síntomas reducen drásticamente la calidad de vida del paciente que sufre la afectación cerebelosa, y por ello, es necesario evaluar posibles estrategias terapéuticas que reduzcan el daño primario o, al menos, alivien los síntomas derivados de la patología.

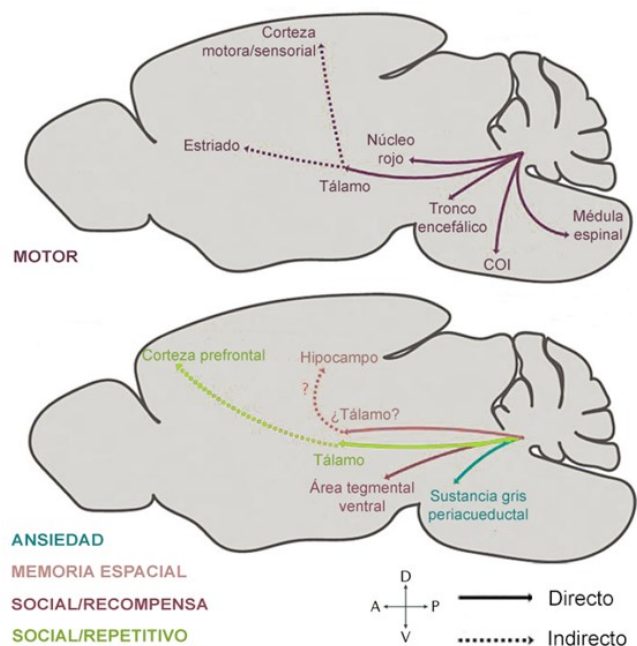


FIGURA 6 | Conexiones entre los núcleos cerebelosos profundos y otras áreas del sistema nervioso central. En el esquema superior se representan las proyecciones cerebelosas hacia regiones encefálicas tradicionalmente asociadas con el control motor. En la parte inferior se representan las proyecciones cerebelosas relacionadas con el comportamiento social y cognitivo del cerebelo. A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral. Modificado de Van der Heijden *et al.*, 2021.

TERAPIA FARMACOLÓGICA: LA N-OLEILETANOLAMINA

La OEA es un endocannabinoide perteneciente a la familia de las *N*-acil-etanolamidas sintetizado a demanda en células del intestino, del hígado, neuronas, células gliales y células del sistema inmunitario, en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003, 2005; Hansen, 2010). Se sintetiza a partir de fosfolípidos de membrana por la acción de la enzima *N*-acil-fosfatidiletanolamida fosfolipasa D (NAPE-PLD⁶) y su degradación la realizan las enzimas amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH⁷) y amidasa ácida de la *N*-acil-etanolamida (NAAA⁸; Hansen, 2010; Tsuboi *et al.*, 2013) como se muestra en la Figura 7. A pesar de ser estructuralmente similar a la anandamida y compartir rutas de biosíntesis y degradación (Figura 7), la OEA no presenta afinidad por los receptores clásicos del sistema

⁶ Del inglés *N*-Acyl phosphatidylethanolamide Phospholipase D

⁷ Del inglés *Fatty Acid Amide Hydrolase*

⁸ Del inglés *N*-Acylethanolamide Acid Amide Hydrolase

endocannabinoide CB1 y CB2⁹, sino que su mecanismo de acción principal es a través del receptor PPAR α ¹⁰ (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003; Lo Verme *et al.*, 2005; Bento-Abreu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). En el sistema nervioso de roedores, se ha detectado la expresión de este receptor en el bulbo olfativo, el hipocampo, el cerebelo y la retina (Kainu *et al.*, 1994; Braissant *et al.*, 1996; Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Dentro del cerebelo, se detectó en las tres capas de la corteza cerebelosa a lo largo del desarrollo postnatal (Braissant *et al.*, 1996; Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Además, también se ha observado expresión de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en células de Purkinje y en la CM del cerebelo (Suárez *et al.*, 2008). Cabe destacar que, a pesar de que la OEA ejerce principalmente sus acciones a través del receptor PPAR α , también se ha demostrado cierta afinidad por el receptor TRPV1¹¹ y el GPR119¹² (González-Aparicio y Moratalla, 2014; González-Aparicio *et al.*, 2014; Henry *et al.*, 2017; Antón *et al.*, 2018).

Los receptores PPAR α pertenecen a la familia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción (O'Sullivan, 2016). Tras su activación por la unión de un ligando agonista, forman heterodímeros con receptores X retinoides y se unen a secuencias PPRE¹³ del DNA regulando la expresión génica de ciertos genes diana (Fidaleo *et al.*, 2014; O'Sullivan, 2016). Estos genes están relacionados con procesos fisiológicos esenciales como la homeostasis energética, el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas, el estrés oxidativo, la proliferación, diferenciación y muerte celular, y la inflamación (Bordet *et al.*, 2006; Fidaleo *et al.*, 2014; O'Sullivan, 2016). En el SNC, los receptores PPAR α participan en la modulación del estrés oxidativo, la neurogénesis, la proliferación y la diferenciación de células gliales, en la consolidación de la memoria y en los procesos neuroinflamatorios (para revisión Bordet *et al.*, 2006; Fidaleo *et al.*, 2014; O'Sullivan, 2016). Precisamente por su papel como regulador de la inflamación y de los procesos de diferenciación y de muerte celular, a lo largo de las últimas dos décadas numerosos estudios han evaluado las propiedades terapéuticas de sus ligandos, principalmente OEA y palmitoiletanolamida (PEA), para el tratamiento de enfermedades crónicas inflamatorias, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Fidaleo *et al.*, 2014).

⁹ Del inglés *Cannabinoid Receptor*

¹⁰ Del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha*

¹¹ Del inglés *Transient Receptor Potential Vanilloid 1*

¹² Del inglés *G Protein-coupled Receptor 119*

¹³ Del inglés *Peroxisome Proliferator Response Element*

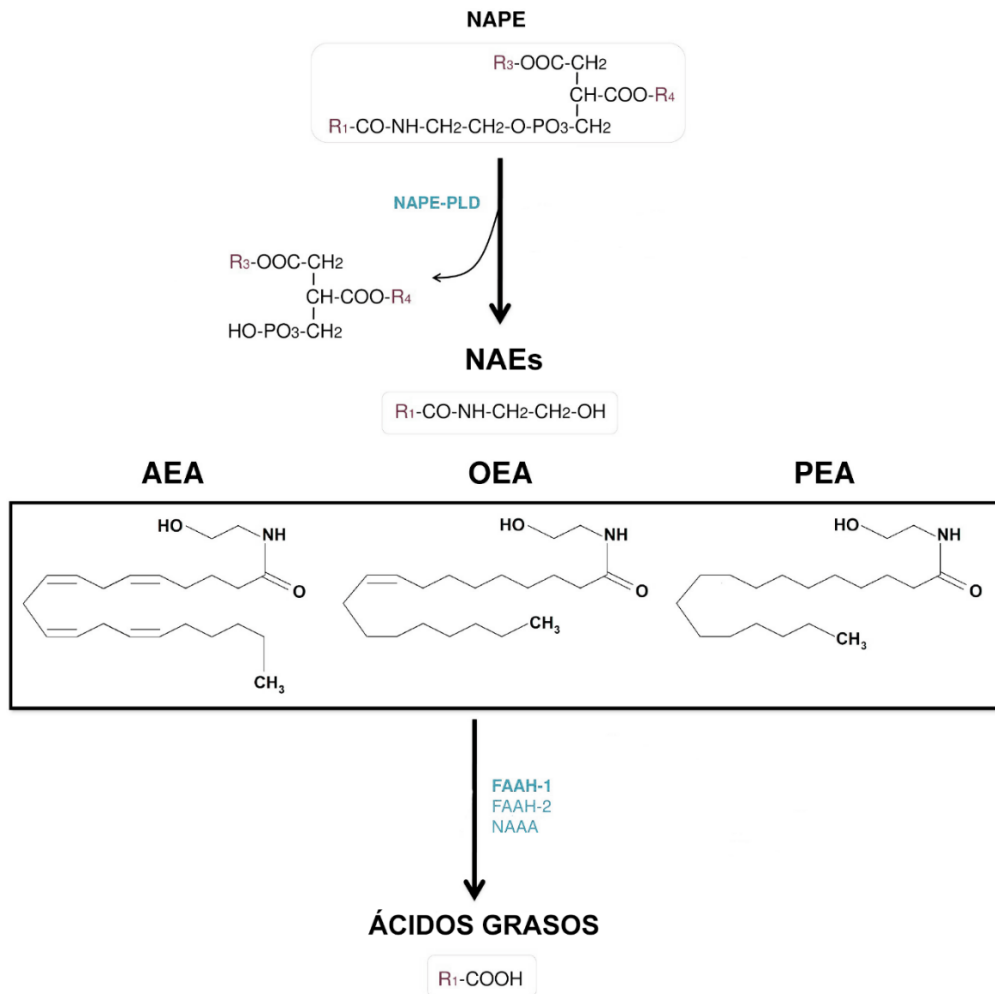


FIGURA 7 | Estructura y ruta de biosíntesis y degradación de las principales N-acil-etanolamidas anandamida, N-oleiletanolamina y palmitoiletanolamina. Obsérvese como en la síntesis y degradación intervienen las mismas enzimas. AEA, anandamida; FAAH, amida hidrolasa de ácidos grasos; NAEs, N-acil-etanolamidas; NAPE, N-acil-fosfatidiletanolamina; NAPE-PLD, N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D; NAAA, amidasa ácida de la N-acil-etanolamina, PEA, palmitoiletanolamina. Modificado de Orio *et al.*, 2019.

De esta forma, aunque inicialmente los estudios de la OEA se centraron en los efectos relacionados con procesos del metabolismo lipídico y glucídico, el metabolismo energético y la regulación del apetito (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003; Guzmán *et al.*, 2004; Lo Verme *et al.*, 2005; Fedele *et al.*, 2018), pronto comenzaron los trabajos en los que se evaluaba su papel como molécula neuroprotectora, antiinflamatoria e inmunomoduladora cuando se administraba de forma exógena en diferentes modelos animales de enfermedades neurológicas o inflamatorias (revisión en Herrera *et al.*, 2016), como se describirá el siguiente apartado.

Efecto neuroprotector, antiinflamatorio e inmunomodulador de la OEA

El efecto del tratamiento exógeno con OEA se ha evaluado en diferentes modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* de daño cerebral de diversa etiología: isquemia cerebral (Sun *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012, 2017; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019), parkinsonismo inducido químicamente (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; González-Aparicio y Moratalla, 2014; González-Aparicio *et al.*, 2014), hipoxia neonatal (Herrera *et al.*, 2014; Holubiec *et al.*, 2018), estrés de diverso origen (Kerr *et al.*, 2012; Sayd *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2018; Rani *et al.*, 2021), consumo excesivo de alcohol (Antón *et al.*, 2018; Silva-Peña *et al.*, 2019; Moya *et al.*, 2021) y degeneración neuronal cerebelosa (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Muchos de los efectos neuroprotectores, antiinflamatorios e inmunomoduladores observados contribuyen simultáneamente en la mejora histopatológica y/o funcional del modelo analizado. Por ello, en este apartado se abordarán estas propiedades de la OEA de forma conjunta.

Isquemia cerebral

En primer lugar, Sun *et al.* (2007) describen por primera vez el efecto neuroprotector de la administración de OEA en un modelo murino de isquemia cerebral por oclusión de la arterial cerebral media (MCAO¹⁴). Así, la administración intraperitoneal (i.p.) de OEA (10 mg/kg) durante los tres días previos a la oclusión arterial redujo el volumen del infarto cerebral y disminuyó la expresión génica de la enzima COX2¹⁵ relacionada con procesos neuroinflamatorios (Minghetti, 2007; Sun *et al.*, 2007). Por su parte, Zhou *et al.* (2012) demostraron la capacidad neuroprotectora de la OEA en el mismo modelo de isquemia cerebral empleado anteriormente, pero en este caso mediante administración oral del fármaco (20 y 40 mg/kg). El tratamiento no solamente disminuyó el volumen de la zona infartada, sino que, además, aumentó la expresión génica del receptor PPAR α y redujo el edema cerebral ipsilateral previamente observado en los animales no tratados. Estos resultados indicaron que la OEA a través de su acción sobre los receptores PPAR α también ejercían un efecto en la permeabilidad de la BHE (Zhou *et al.*, 2012). Además, en un estudio posterior los mismos autores comprobaron que la administración de OEA atenuaba la apoptosis observada en el estriado y en la corteza cerebral del modelo MCAO mediante la

¹⁴ Del inglés *Middle Cerebral Artery Occlusion*

¹⁵ Del inglés *Cyclooxygenase Enzyme 2*

inhibición de las vías TLR4/NF- κ B y ERK1/2¹⁶ (Zhou *et al.*, 2017). Por su parte, Yang *et al.* (2015) comprueban que la administración de OEA (30 mg/kg i.p.) diaria durante cuatro semanas antes de la oclusión arterial mejoró las deficiencias en la memoria espacial del modelo MCAO mediante el aumento en la expresión génica del factor neurotrófico BDNF¹⁷ y las proteínas relacionadas con la plasticidad neuronal GAP43 y SYN¹⁸, y el incremento de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (Yang *et al.*, 2015). Además, en este estudio también se detectó una sobreexpresión del gen *Ppara*, demostrando su participación en los efectos observados (Yang *et al.*, 2015). Por último, Luo *et al.* (2019), empleando el mismo modelo de isquemia cerebral, comprobó que la administración diaria de OEA (10 mg/kg) redujo la activación y migración glial observada en el modelo MCAO, aumentó los niveles de expresión de proteínas GAP43 y SYN y mejoró el comportamiento motor de los animales (Luo *et al.*, 2019).

Parkinsonismo inducido químicamente

En 2009, Galán-Rodríguez *et al.* (2009) demuestran por primera vez las propiedades neuroprotectoras de la administración de OEA en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo de parkinsonismo inducido químicamente con oxidopamina (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009). Los estudios *in vivo* revelaron que la administración de OEA inyectada en el estriado a concentraciones de 1 y 5 μ M aumentó la supervivencia celular de las neuronas dopaminérgicas y redujo la densidad de células microgliales en el estriado de los animales tratados (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009). Más tarde, en 2014, se publican dos trabajos en los que emplean el mismo modelo de parkinsonismo mencionado anteriormente y que completan lo publicado por Galán-Rodríguez *et al.* Por un lado, se demuestra que el efecto neuroprotector de la OEA en el sistema nigroestriatal también promueve una mejora funcional de los síntomas de parkinsonismo inducido químicamente, y esta está mediada por receptores PPAR α (González-Aparicio *et al.*, 2014). Por otro lado, se evaluó el efecto antidiscinético de la administración de OEA (5 mg/kg i.p.) tras el tratamiento crónico con levodopa (González-Aparicio y Moratalla, 2014). Así, la OEA redujo los movimientos anormales e involuntarios producidos por el tratamiento con levodopa, aunque en este caso mediado por el receptor TRPV1 (González-Aparicio y Moratalla, 2014).

¹⁶ Del inglés *Toll-like Receptor 4*, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* y *Extracellular-signal-regulated Kinase*, respectivamente

¹⁷ Del inglés *Brain-derived Neurotrophic Factor*

¹⁸ Del inglés *Growth Associated Protein 43* y *Synuclein*, respectivamente

Hipoxia neonatal

La disminución de la disponibilidad de oxígeno en el nacimiento, bien por un fallo en los pulmones del recién nacido o por una disminución del flujo sanguíneo desde la placenta, afecta gravemente al funcionamiento correcto del SNC, siendo común la aparición de alteraciones en las funciones cognitivas y en el aprendizaje en la etapa postnatal (para revisión Millar *et al.*, 2017). En relación con esta patología, Herrera *et al.* (2014) demostraron que la administración preventiva de OEA (10 mg/kg i.p.) en un modelo murino de hipoxia perinatal revertía las deficiencias en el comportamiento exploratorio y en los niveles de ansiedad de los sujetos experimentales (Herrera *et al.*, 2014). Posteriormente, Holubiec *et al.* (2018) comprobaron el efecto de la OEA y PEA en el hipocampo de otro modelo murino de hipoxia neonatal. En este caso, la OEA incrementó la expresión de GFAP y PPAR α en el hipocampo de los neonatos tratados con OEA, pero los ligeros efectos en el comportamiento cognitivo únicamente se observaron tras el tratamiento con PEA (Holubiec *et al.*, 2018).

Estrés de diversa etiología

El efecto de la OEA también se ha evaluado en el estado neuroinflamatorio y el comportamiento de animales sometidos a estrés de diferente origen: inflamación generalizada por lipopolisacárido (LPS), experiencias traumáticas o estrés crónico.

En relación con el efecto de la OEA en modelos de inflamación por LPS, varios estudios *in vivo* han demostrado una reducción de la expresión génica de los factores proinflamatorios TNF α , NF- κ B, COX2, IL1 β y prostaglandina E2, así como de los niveles de IL1 β y TNF α en plasma (Kerr *et al.*, 2012; Sayd *et al.*, 2015). Además, en estudios *in vitro* también se ha observado que la administración de OEA reduce los niveles de expresión de *Tnfa*, *Cox2* e *iNos*¹⁹, tras la exposición de las células en cultivo a LPS (Benito *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016).

Por otro lado, Joshi *et al.* (2018) evaluaron el potencial terapéutico de la OEA administrada oralmente en un modelo murino de estrés postraumático de Guerra del Golfo (Joshi *et al.*, 2018). Este modelo presenta una respuesta glial crónica que da lugar a un estado neuroinflamatorio mantenido, así como a diferentes alteraciones en las funciones cognitivas. En este caso, el tratamiento continuado con OEA de forma oral consiguió

¹⁹ Del inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*

mejorar el comportamiento de los animales, redujo la densidad de astroglia y microglia en la corteza cerebral y el giro dentado del hipocampo, y disminuyó los niveles de los factores inflamatorios IL1 β , IL6, IFN γ , en plasma, aunque no se observaron cambios en TNF α e IL10 (Joshi *et al.*, 2018). Resultados similares obtuvieron Rani *et al.* (2021) en un modelo de estrés murino por aislamiento social, en el que el tratamiento diario con OEA (10 mg/kg i.p.) previno las alteraciones observadas en el comportamiento social y en la memoria de reconocimiento (Rani *et al.*, 2021).

Consumo excesivo de alcohol

Una de las patologías sobre la que más se ha estudiado el papel neuroprotector y antiinflamatorio de la OEA es el daño cerebral causado por un consumo excesivo de alcohol (para revisión Orio *et al.*, 2019). En primer lugar, Antón *et al.* (2018) demostraron que, en personas consumidoras habituales de alcohol, tras dos días de abstinencia existía una correlación positiva entre el aumento en plasma de endocannabinoides como la OEA y el aumento de la expresión génica de los marcadores inflamatorios IL1 β , IL6, COX2 y receptores de la respuesta inmunitaria innata TLR4 y MCP1²⁰. Estos resultados revelaron que la OEA podría estar mediando algún efecto en la respuesta inflamatoria por consumo de alcohol (Antón *et al.*, 2018). Mas tarde, Rivera *et al.* (2019) demostraron que el tratamiento con OEA (10 mg/kg i.p.) durante cinco días en un modelo animal de consumo moderado de alcohol restauró la proliferación neuronal de la zona subventricular y redujo la gliosis observada en el estriado (Rivera *et al.*, 2019). Por otro lado, Silva-Peña *et al.* (2019) también comprobaron el efecto neuroprotector de la OEA en el modelo anterior pero combinado con el consumo de tetrahidrocannabinol. Aquí, además de observar un aumento en la supervivencia de las neuronas del hipocampo y la proliferación celular, también se detectó una recuperación de la memoria espacial a corto plazo de los animales y un aumento de los niveles de BDNF en el hipocampo (Silva-Peña *et al.*, 2019). Por último, se ha publicado recientemente un estudio en el que la administración de OEA (10 mg/kg i.p.) en un modelo animal del Síndrome de Wernicke-Korsakoff previno la patología asociada tanto en la corteza frontal como en el cerebelo, a nivel celular y del comportamiento (Moya *et al.*, 2021).

²⁰ Del inglés *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

Degeneración neuronal cerebelosa

En estudios previos de nuestro laboratorio se evaluó el efecto neuroprotector de diferentes dosis (1, 5 y 10 mg/kg i.p.) y pautas de administración de la OEA (aguda y crónica) en el modelo PCD de degeneración cerebelosa (ver más adelante). Así se comprobó que la administración de OEA (10 mg/kg i.p.) previa al comienzo de la degeneración neuronal conseguía reducir la muerte de las células de Purkinje y mantener ciertas características morfológicas de su citoarquitectura (Muñoz-Castañeda, 2015). Estos resultados prometedores fomentaron nuevos análisis en los que se evaluó la ventana temporal en la que la OEA presentaba una mayor neuroprotección (Pérez-Martín *et al.*, 2021), así como sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras en este modelo. Debido a que gran parte de los resultados obtenidos en estos estudios forman parte de la presente Tesis Doctoral, estos se detallarán en secciones posteriores.

Posible mecanismo de acción de la OEA

Como se ha detallado en el apartado anterior, los efectos de la administración exógena de OEA son muy diversos y, aunque están producidos principalmente por la unión al receptor PPAR α , también se han observado efectos mediados por TRPV1. Actualmente no se conoce el mecanismo de acción exacto, pero cabe esperar que impliquen diferentes rutas celulares. Además, aunque sabemos que la OEA es capaz de ejercer un efecto directo en el encéfalo puesto que cruza rápidamente la BHE tras su administración sistémica (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; Plaza-Zabala *et al.*, 2010), no podemos descartar un posible efecto indirecto periférico. De hecho, con relación a sus propiedades antiinflamatorias, en el estudio realizado por Antón *et al.* (2018) detectaron cambios en los niveles de citocinas proinflamatorias tanto en el SNC como en el plasma periférico (Antón *et al.*, 2018).

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que el efecto antiinflamatorio de la OEA podría estar mediado por la inhibición de las rutas NF- κ B y ERK1/2/AP-1/STAT3 (Yang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017), lo que explicaría la disminución de factores y enzimas proinflamatorios observados en los estudios anteriores. De hecho, en los últimos años se ha relacionado la vía NF- κ B con los fenómenos neurodegenerativos que ocurren durante un trauma o isquemia, e incluso en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o la enfermedad de Alzheimer (para revisión Shih *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de PPAR α por el ligando OEA aumenta los niveles de

factores neurotróficos o neuroprotectores como BDNF, SYN, GAP43 y MAP2²¹ (Bento-Abreu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019). Además, se sabe que tanto el receptor PPAR α como el factor BDNF pueden regular la expresión de genes relacionados con plasticidad y supervivencia neuronal a través del factor de transcripción CREB²² (Sakamoto *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2013; Amidfar *et al.*, 2020).

De esta forma, en base a todos los estudios disponibles hasta la fecha, las vías a través de las cuales la OEA podría estar ejerciendo los efectos neuroprotectores, antiinflamatorios e inmunomoduladores se muestran en la Figura 8.

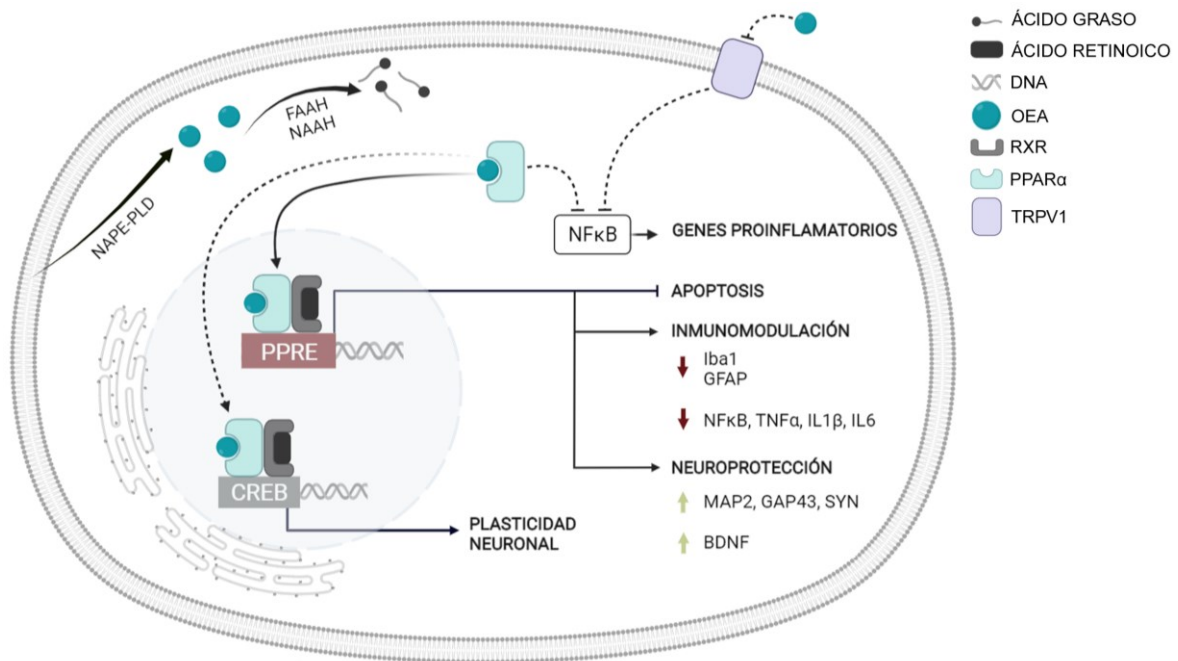


FIGURA 8 | Representación gráfica del posible mecanismo de acción de la OEA a través de los receptores PPAR α y TRPV1, y sus principales efectos neuroprotectores y antiinflamatorios. En línea continua se representan las vías documentadas y en discontinua las vías hipotéticas según los efectos observados de la OEA. BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; CREB, proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc; DNA, ácido desoxirribonucleico; FAAH, amida hidrolasa de ácidos grasos; GAP43, proteína 43 asociada al crecimiento; GFAP, proteína ácida fibrilar glial (marcador de astrocitos); Iba1, molécula adaptadora de calcio ionizado 1 (marcador microglial); IL1 β , interleucina tipo 1 β ; IL6, interleucina tipo 6; MAP2, proteína de unión a microtúbulos 2; NAAH, amidasa ácida de la N-acil-etanolamina; NAPE-PLD, N-acil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa; NF κ B, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; OEA, N-oleiletanolamina; PPAR α , receptor activado por proliferadores peroxisómicos tipo alpha; PPRE, elementos de respuesta a proliferadores peroxisómicos; RXR, receptor X retinoide; SYN, sinucleína; TNF α , factor de necrosis tumoral alpha; TRPV1, receptor de potencial transitorio tipo vaniloide 1. Creado con Biorender.com.

²¹ Del inglés *Microtubule-associated Protein 2*

²² Del inglés *CAMP Responsive Element Binding Protein 1*

TERAPIA CELULAR

La capacidad de regeneración del SNC es muy limitada comparada con la observada en el SNP (Chen *et al.*, 2018; Moattari *et al.*, 2018). Así, la terapia con células madre surgió como una estrategia muy prometedora para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Sakthiswary y Raymond, 2012). Más allá de la posibilidad de reemplazo de las neuronas o células gliales dañadas, las células madre pueden promover un ambiente neuroprotector por sus propiedades citoprotectoras e inmunomoduladoras (Dantuma *et al.*, 2010; Lindvall y Kokaia, 2010; Sakthiswary y Raymond, 2012; Bonaventura *et al.*, 2021).

Origen y clasificación de las células madre

Las células madre se definen como células indiferenciadas que presentan una capacidad de autorrenovación ilimitada y de diferenciación hacia distintos tipos celulares maduros o poblaciones de células progenitoras con un potencial de diferenciación más restringido (Mimeault y Batra, 2006; Dantuma *et al.*, 2010; Asal y Güven, 2020).

En base a su propiedad de diferenciación hacia otros tipos celulares, las células madre se clasifican en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes, siendo las células madre totipotentes las que mayor potencial de diferenciación presentan y las unipotentes las que menor (Mimeault y Batra, 2006; Dantuma *et al.*, 2010).

Atendiendo a su origen, las células madre se pueden clasificar en cuatro tipos: células madre embrionarias, células madre fetales, células madre pluripotentes inducidas y células madre adultas (Bacakova *et al.*, 2018). De todas ellas, las últimas son las más empleadas a nivel clínico debido a su fácil obtención y permisividad ética (Dantuma *et al.*, 2010; Bacakova *et al.*, 2018). Estas células madre adultas pueden encontrarse prácticamente en todos los tejidos en el organismo adulto. Sin embargo, uno de los nichos mejor caracterizado y más empleado en clínica es la médula ósea (Asal y Güven, 2020).

Células madre de la médula ósea

En general, se habla de células madre derivadas de la médula ósea o BMSC (por sus siglas estandarizadas del inglés *Bone Marrow-derived Stem Cell*) para hacer referencia a todo el conjunto de células que contiene este nicho, pero en realidad está compuesto por varias poblaciones diferentes: las células madre hematopoyéticas (Becker *et al.*, 1963), las células

madre estromales (Friedenstein *et al.*, 1970) y las células acompañantes (Goodell *et al.*, 1996). Las células madre hematopoyéticas son células multipotentes capaces de originar todos los elementos formes de la sangre de los linajes mieloide, linfoide y eritroide. Por su parte, las células madre estromales son una población heterogénea de distintos tipos celulares (Mimeault y Batra, 2006), entre los que destaca, por ser el mayoritario, el de las células madre mesenquimales o MSCs (por sus siglas estandarizadas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*). Finalmente, también se han descrito las células acompañantes, consideradas células madre hematopoyéticas primitivas (Wolmarans *et al.*, 2018).

En concreto, en la presente Tesis Doctoral se han utilizado dos aproximaciones terapéuticas diferentes, ambas con células procedentes de la médula ósea. Por un lado, se han empleado BMSC directamente de la médula ósea sin realizar ningún tipo de fraccionamiento ni separación celular (nos referiremos a ellas como BMSC). Y, por otro lado, se han empleado MSCs derivadas de la médula ósea, tras el cultivo y diferenciación de BMSC (nos referiremos a ellas como MSCs). Con relación a las propiedades y aplicaciones terapéuticas de estas últimas, se dedicará un subapartado más adelante.

En cuanto a las BMSC, en las últimas décadas se ha demostrado que tras su administración vía intravenosa tienen la capacidad de migrar a través del torrente sanguíneo hasta el encéfalo, expresar marcadores gliales y neuronales, e incluso fusionarse con neuronas e integrarse funcionalmente en el encéfalo (Mezey *et al.*, 2000; Cogle *et al.*, 2004; Hassan y El-Sheemy, 2004; Bae *et al.*, 2007; Díaz *et al.*, 2015). En concreto, una de las regiones encefálicas donde más se ha analizado la llegada e incorporación de BMSC es el cerebelo (Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003, 2007; Weimann *et al.*, 2003a, 2003b; Bae *et al.*, 2007; Magrassi *et al.*, 2007; Kemp *et al.*, 2011, 2018b; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018, 2019).

En 2001, Priller *et al.* por primera vez ponen de manifiesto la capacidad de las BMSC de llegar al cerebelo y fusionarse con neuronas adultas, concretamente con las células de Purkinje. En su estudio emplearon ratones adultos irradiados letalmente y trasplantados con BMSC positivas (+) para GFP²³. Doce meses tras el trasplante consiguieron observar células de Purkinje fusionadas con BMSC (Priller *et al.*, 2001). Posteriormente, varios estudios empleando diferentes técnicas de trasplante o mecanismos de detección de las células neurales derivadas del trasplante reportaron similares resultados (Álvarez-Dolado *et*

²³ Del inglés *Green Fluorescent Protein*

al., 2003; Weimann *et al.*, 2003a, 2003b; Magrassi *et al.*, 2007; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018; Kemp *et al.*, 2018a, 2018b) incluso en humanos (Weimann *et al.*, 2003a). Sin embargo, en la mayoría de estos estudios únicamente se analizó la llegada e integración de las células derivadas del trasplante y la aparición de heterocariontes entre ellas y las células de Purkinje, pero no se evaluó su posible efecto neuroprotector. En este sentido, dos trabajos publicados en 2018 (Kemp *et al.*, 2018a, 2018b), demostraron el potencial terapéutico del trasplante de BMSC en un modelo de ataxia de Friedreich y de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), respectivamente. En el primero, se observó una mejora tanto a nivel celular como del comportamiento en el modelo de ataxia empleado (Kemp *et al.*, 2018a). Con relación al segundo estudio, demostraron que las células de Purkinje heterocariontes formadas en el modelo de EAE eran morfológica y funcionalmente idénticas a las células de Purkinje de animales silvestres (WT²⁴), aunque observaron un menor número de células de Purkinje totales en los animales irradiados y trasplantados (Kemp *et al.*, 2018b). Cabe destacar que en ambos estudios detectaron además un aumento en el número de células Iba1+ y CD11+ en los animales irradiados y trasplantados (Kemp *et al.*, 2018a, 2018b).

En los últimos años nuestro laboratorio se ha centrado en evaluar las aplicaciones terapéuticas de esta aproximación, así como en diseñar nuevas estrategias basadas en el trasplante de BMSC para paliar procesos neurodegenerativos (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012a, 2012b, 2015, 2018, 2019). En este sentido, se ha observado que el trasplante completo de BMSC en el ratón PCD (ver más adelante) mejoró el comportamiento motor y la capacidad olfativa de los animales irradiados y trasplantados, aunque no se consiguió frenar la degeneración neuronal (Díaz *et al.*, 2012a, 2018).

Sin embargo, el trasplante de reemplazo de BMSC presenta tres limitaciones principales:

1. La necesidad de irradiar completamente al organismo o el uso de fármacos mieloablativos para asegurar que el trasplante sea efectivo (Fuchs *et al.*, 2004) puede aumentar el estado inflamatorio de los animales e incrementar el riesgo de infecciones y efectos secundarios asociados a la toxicidad del tratamiento mieloablativo (Moravan *et al.*, 2011; Mohty *et al.*, 2015; Koch *et al.*, 2016; Atila *et al.*, 2017; Sailor *et al.*, 2022).

²⁴ Del inglés *Wild-type*

2. El tiempo necesario para que las células derivadas del trasplante lleguen al cerebelo, se fusionen con células de Purkinje y/o se integren en él es como mínimo dos meses tras el trasplante, de manera que puede no ser útil en procesos neurodegenerativos rápidos y agresivos (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Magrassi *et al.*, 2007; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018).
3. La existencia de al menos dos barreras físicas que dificultan la llegada de las células a la región de interés: pequeños capilares de los pulmones y tejidos periféricos, y la BHE. Esta limitación es común a todas las terapias celulares cuya vía de administración es intravenosa (Schrepfer *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009).

Por ello es necesario diseñar nuevas estrategias o tratamientos combinados que faciliten la llegada de las células a la región encefálica de interés, con el menor número de efectos colaterales posibles. Además, hay que tener en cuenta que el trasplante de BMSC también podría ejercer un efecto periférico paracrino mediante la secreción de factores neurotróficos sin la necesidad de alcanzar físicamente el encéfalo. Este efecto paracrino se ha observado en estudios donde se emplearon poblaciones celulares específicas de las BMSC, como la fracción hematopoyética o las MSCs (Sánchez-Ramos *et al.*, 2008; Uccelli *et al.*, 2008). Estas últimas destacan precisamente por sus propiedades neuroprotectoras paracrinas y las ventajas que presentan tanto su obtención como su aplicación terapéutica, convirtiéndose así en las candidatas excelentes para la terapia celular como se describirá a continuación (Uccelli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2020; Andrzejewska *et al.*, 2021).

Células mesenquimales

Como se mencionó en el apartado anterior, las MSCs son una población específica de células madre adultas pertenecientes al grupo de células madre estromales. Estas fueron aisladas por primera vez a partir de la médula ósea de roedores (Friedenstein *et al.*, 1970) y se caracterizaron como una población heterogénea de células madre de tipo fibroblástico que proliferaban *in vitro*, se adherían al plástico y eran capaces de diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (Friedenstein *et al.*, 1970). En la actualidad, sabemos que estas células pueden obtenerse de diversos tejidos adultos; sin embargo, la fuente de obtención más empleada, estudiada y caracterizada es la médula ósea, a pesar de que suponen un 0,001-0,01 % del total de células nucleadas (Asal y Güven, 2020).

Con el fin de estandarizar todos los estudios en los que se emplean este tipo de células madre, la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció tres criterios fundamentales para definir las MSCs (Horwitz *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006):

1. Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo *in vitro*.
2. Expresión específica de marcadores antigénicos de superficie: $\geq 95\%$ positivas para CD105, CD73 y CD90; y $\leq 2\%$ negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19, HLA-DR.
3. Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos, demostrada por marcaje del cultivo celular.

Actualmente existen evidencias de la multipotencialidad de las MSCs más allá de osteoblastos, adipocitos y condroblastos, incluso pudiendo transdiferenciarse en neuronas y células gliales en estudios *in vitro*, como se muestra en la Figura 9 (Uccelli *et al.*, 2008, 2011; Urrutia *et al.*, 2019). Sin embargo, existe controversia sobre la funcionalidad de las células neurales y gliales transdiferenciadas a partir de MSCs, y su capacidad de integración en circuitos sinápticos neuronales (Karp y Leng Teo, 2009; Chen *et al.*, 2018). Por ello,

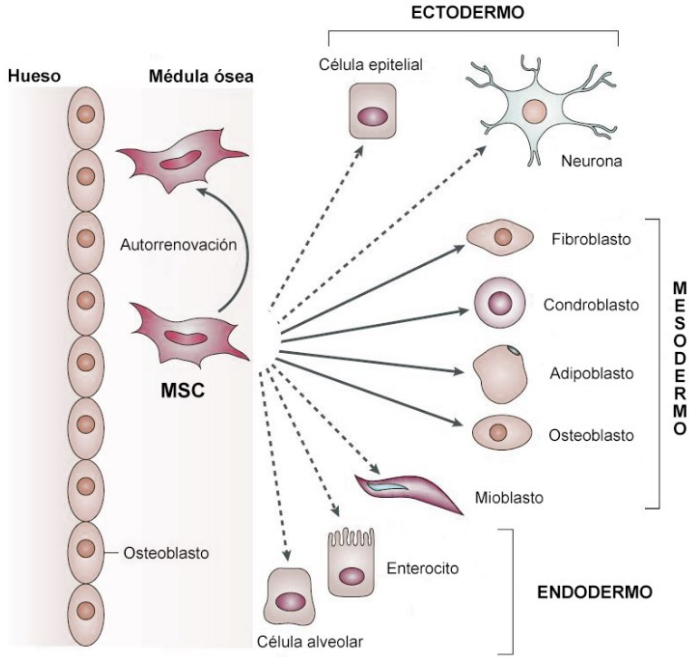


FIGURA 9 | Multipotencialidad de las células mesenquimales (MSCs). En el esquema se puede observar la capacidad de autorrenovación de las MSCs (flecha curvada) y de diferenciación en tipos celulares de linaje mesodérmico (flechas rectas y continuas), y de transdiferenciación en linajes ectodérmico y endodérmico (flechas rectas y discontinuas). Modificado de Uccelli *et al.*, 2008.

la principal hipótesis actual del mecanismo de acción de estas células madre es a través de fenómenos paracrinos, en vez de reemplazo celular (Uccelli *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2020).

Si por algo destacan las MSCs es por sus propiedades neurotróficas, neuroprotectoras e inmunomoduladoras, así como por la alta capacidad de migración hacia tejidos dañados (para revisión Uccelli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018). Estas características, junto a la posibilidad de poder ser expandidas *in vitro* rápidamente, han convertido a las MSCs en las candidatas ideales para la terapia celular con el fin de paliar el daño neuronal de una gran diversidad de enfermedades neurodegenerativas (para revisión Chen *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2020; Andrzejewska *et al.*, 2021). Además, otra de las ventajas que presentan es que son unas células muy poco inmunogénicas, un hecho que allana el camino para realizar trasplantes alogénicos (Uccelli *et al.*, 2008; Ankrum *et al.*, 2014).

Debido a la gran cantidad de bibliografía existente en la actualidad en relación con los efectos de las MSCs en diferentes modelos de daño y degeneración neuronal, a continuación, únicamente se detallarán algunos de ellos en los que se ha evaluado su papel neuroprotector en modelos de daño cerebeloso por ser la región encefálica analizada principalmente en la presente Tesis Doctoral.

Los primeros trabajos sobre el efecto neuroprotector en enfermedades con afectación cerebelosa se remontan al año 2007. En ellos Bae *et al.* (2007) comprobaron que el trasplante intracerebeloso de MSCs en un modelo murino de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C promovió la fusión de estas con las células de Purkinje, mejorando sus propiedades electrofisiológicas (Bae *et al.*, 2007). Posteriormente, se publicaron diferentes trabajos en los que se evaluó esta terapia en diferentes modelos animales de ataxia cerebelosa como en el ratón mutante *Lurcher* (Jones *et al.*, 2010), lesión inducida por ácido quinolínico (Edalatmanesh *et al.*, 2011), y ataxia cerebelosa tipo 1 y 3 (Matsuura *et al.*, 2014; Huda *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2021). En primer lugar, Jones *et al.* (2010) observaron que dos meses tras el trasplante intracerebeloso de MSCs los animales mutantes *Lurcher* mostraron una mejora en el comportamiento motor, un aumento en la densidad de las células de Purkinje -alguna de ellas incluso fusionada con MSCs derivadas del trasplante- y un incremento en la expresión de BDNF, NT3 y GDNF²⁵. Además, un mes tras el trasplante, las MSCs principalmente se localizaban en la sustancia blanca del cerebelo, mientras que, tras dos meses, su distribución principal era la CM y la CCP (Jones *et al.*, 2010). Posteriormente, en el estudio publicado por Edalatmanesh *et al.* (2011) también se demostró una disminución del área de la lesión inducida por ácido quinolínico y una recuperación del comportamiento motor de los animales que habían recibido un

²⁵ Del inglés *Neurotrophin 3* y *Glial Cell Derived Neurotrophic Factor*, respectivamente

trasplante intracerebeloso de MSCs (Edalatmanesh *et al.*, 2011). Estudios posteriores también mostraron evidencias del papel neuroprotector de las MSCs en los modelos de ataxia cerebelosa tipo 1 y 3 (Matsuura *et al.*, 2014; Huda *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2021). En uno de ellos, curiosamente, se observó un mayor efecto protector tanto a nivel celular como a nivel de comportamiento cuando se inyectaba el secretoma de las MSCs, lo que apoya la hipótesis del efecto paracrino de las MSCs (Correia *et al.*, 2021). Por último, también se ha analizado el efecto de esta población de células madre en modelos de neuroinflamación cerebelosa inducida por LPS (Nam *et al.*, 2020) y EAE (Kemp *et al.*, 2011). En estos estudios se observó un aumento en la fusión de células derivadas del trasplante con células de Purkinje, una reducción en los niveles de factores proinflamatorios IL1 β y TNF α , y una modulación de la microglía hacia un fenotipo M2 (Kemp *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2020).

En resumen, existe una notable evidencia experimental en modelos preclínicos de degeneración cerebelosa que sugiere que las MSCs son unas células prometedoras para ejercer algún tipo de neuroprotección cuando se produce un daño en el cerebelo y así generar un ambiente menos perjudicial para las neuronas, bien mediante la fusión con células en degeneración o mediante la liberación de factores tróficos y neuroprotectores.

En estudios previos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la operación necesaria para la inyección intracerebelosa produce efectos negativos en el comportamiento de los animales en los que se ha realizado la cirugía (Del Pilar, 2021). Teniendo en cuenta que en la mayoría de los estudios mencionados anteriormente en los que se veía una mejora de los animales trasplantados la administración de MSCs era vía intracerebelosa, surge la duda de cuáles serían los resultados que cabría esperar si el trasplante de MSCs se realizara de forma intravenosa. Por ello, en la presente Tesis Doctoral se empleará la administración intravenosa a través del seno retroorbital (r.o.) como vía de trasplante de MSCs.

Relación entre la terapia celular y el sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide interviene en una amplia variedad de funciones fisiológicas y patológicas como vimos anteriormente. En la última década se ha descubierto su implicación en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la migración de las células hematopoyéticas y mesenquimales (Jiang *et al.*, 2011; Galve-Roperh *et al.*, 2013). A pesar de que la mayoría de los estudios relacionan estas funciones con receptores clásicos

del sistema endocannabinoide CB1 y CB2, Wollank *et al.* (2015) demostraron una posible implicación del receptor PPAR α en el proceso de migración y supervivencia de las MSCs *in vitro*. De esta forma, cuando las MSCs en cultivo se exponían a inhibidores de la enzima de degradación de las *N*-acil-etanolamidas, aumentaban los niveles de OEA y PEA, y también lo hacía la capacidad de migración de las células madre (Wollank *et al.*, 2015). Además, cuando administraban de forma exógena OEA, también se observaba un aumento de la migración y la viabilidad celular de las MSCs en cultivo, el cual se revertía completamente cuando se empleaba el inhibidor GW6471 del receptor PPAR α (Wollank *et al.*, 2015). A pesar de que aún son necesarios más estudios al respecto, existe la posibilidad de que el uso de fármacos cuya diana son los receptores endocannabinoides facilite la migración, la diferenciación y/o la supervivencia de las células madre trasplantadas en modelos *in vivo*.

EL RATÓN MUTANTE PCD: MODELO DE DEGENERACIÓN Y NEUROINFLAMACIÓN CEREBELOSA

Tanto en la investigación básica como en su vertiente más aplicada y traslacional, el empleo de modelos animales de experimentación sigue siendo una herramienta imprescindible y ha desempeñado un papel fundamental en los descubrimientos médicos del último siglo. De esta forma, los modelos animales no solo nos proporcionan información valiosa para dilucidar mecanismos y estructuras involucradas en una determinada función y/o patología, sino que además nos permiten desarrollar y evaluar nuevas estrategias terapéuticas.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado el ratón mutante PCD como modelo de degeneración selectiva y neuroinflamación cerebelosa. Este modelo animal se caracteriza por la pérdida selectiva y postnatal de diferentes poblaciones neuronales, entre ellas las células de Purkinje del cerebelo, lo que da nombre al modelo (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007). Como resultado, se produce una atrofia cerebelosa acompañada por una reacción inflamatoria exacerbada y alteraciones de las funciones relacionadas con esta región encefálica (Baltanás *et al.*, 2013; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Curiosamente, este modelo reproduce gran parte de las alteraciones fisiopatológicas y signos clínicos de la enfermedad neurodegenerativa de origen infantil con atrofia cerebelosa denominada CONDCA²⁶, que afecta a humanos portadores de la mutación análoga a la del ratón PCD (Shashi *et al.*, 2018; Karakaya *et al.*, 2019; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021). Por

²⁶ Del inglés *Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy*

ello, el ratón mutante PCD es un modelo idóneo de degeneración neuronal con una alta aplicación traslacional para evaluar nuevas terapias para prevenir o frenar la pérdida neuronal, o bien lograr una recuperación funcional.

La mutación *pcd*

En 1976, Mullen *et al.* describen por primera vez la mutación autosómica recesiva *pcd*, que apareció espontáneamente en la estirpe de ratón C57BR/cdJ en los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EE. UU.) y que, posteriormente, se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen *et al.*, 1976). Esta mutación original se denominó *pcd^{1J}* para distinguirla del resto que aparecieron posteriormente (Fernández-González *et al.*, 2002), y es precisamente la mutación que porta el modelo empleado en esta Tesis Doctoral.

La mutación *pcd* se localiza en el cromosoma 13 del ratón y el 9 de humanos, y se define como autosómica recesiva con penetrancia completa (Mullen *et al.*, 1976; Lalonde y Strazielle, 2022). El gen afectado ha recibido diferentes nombres desde que se identificó hace dos décadas: *Nna1* (del inglés *Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy*) por su papel y localización en estudios sobre regeneración axonal; *Agtppb1* (del inglés *AGT/GTP Biding Protein*) por la unión ATP/GTP que presenta en su estructura; y *Ccp1* (del inglés *Carboxypeptidase 1*) por su función como carboxipeptidasa (Harris *et al.*, 2000). Actualmente, la nomenclatura principal aceptada, tanto en ratón como en humanos, es *Agtppb1* y *AGTPBP1*, respectivamente (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:2159437>; https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:17258). Debido a que en la presente Tesis Doctoral se ha empleado el ratón portador de la mutación *Agtppb1^{pcd1J}*, la nomenclatura para genes y proteínas se realizará según las directrices establecidas por el Comité Internacional de Nomenclatura Genética Estandarizada para Ratas y Ratones (disponible en <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

En la actualidad, se han identificado 25 variantes alélicas del gen *Agtppb1* en diferentes modelos animales y líneas celulares (Tabla 1), surgidas de forma espontánea o bien generadas por inducción química o mutagénesis dirigida (Baltanás *et al.*, 2021; <http://www.informatics.jax.org/allele/summary?markerId=MGI:2159437>). De entre ellas, la variante alélica empleada en la presente Tesis Doctoral, i.e., *Agtppb1^{pcd1J}*, es la que produce las alteraciones patológicas más graves (Fernández-González *et al.*, 2002; Wang y Morgan, 2007). Con el fin de facilitar la lectura y fluidez de este trabajo, la mutación *Agtppb1^{pcd1J}* se simplificará como *pcd^{1J}*.

TABLA 1 | Origen, características clínicas y tipo de mutación de las variantes alélicas de la mutación *pcd*. Se han excluido las líneas celulares. Modificado de Baltanás *et al.*, 2021.

Nombre Alelo	Origen	Mutación genética	Características clínicas
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd1J</i>}	Espontánea	Desconocida (posiblemente en la región reguladora)	Tamaño corporal reducido, ataxia y alteraciones cognitivo-afectivas, atrofia cerebelosa, degeneración de CP y granos, CMs, neuronas talámicas, fotorreceptores, entre otros, infertilidad en machos y fertilidad parcial en hembras.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd2J</i>}	Espontánea	Inserción (~7,8Kb) en intrón 13	Alelo hipomórfico, ataxia tardía, algunos casos de infertilidad masculina.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd3J</i>}	Espontánea	Delección (~12,2Kb) entre intrón 5 y exón 8	Tamaño corporal reducido, ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración de CP, CMs, neuronas talámicas, fotorreceptores, entre otros, infertilidad en machos y fertilidad parcial en hembras.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd4J</i>}	IQ	Inserción 6 nucleótidos entre exones 6 y 7.	Ataxia, degeneración de CP.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd5J</i>}	Espontánea	Inserción de triplete del ácido aspártico en exón 18 (p.775D)	Ataxia, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, fertilidad parcial en hembras e infertilidad en machos.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd6J</i>}	IQ	Desconocida	Ataxia, atrofia cerebelosa y de los testículos, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, menor tamaño de fibras musculares esqueléticas, infertilidad en machos.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd7J</i>}	Espontánea	Desconocida	Tamaño corporal reducido, ataxia, degeneración de CP, hipocampo agrandado, problemas auditivos, cambios del comportamiento.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd8J</i>}	Espontánea	Desconocida	Alteración del desarrollo del sistema nervioso, reproductor y visual.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd9J</i>}	Espontánea	Inserción A en exón 11	Ataxia tardía.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd-JWG</i>}	Inserción transgénica	Inserción aleatoria de 4,4Kb del gen <i>Dhfr</i> y promotor SV40	Ataxia, degeneración de CP, CMs, y fotorreceptores, infertilidad parcial de machos y hembras, degeneración del esperma.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd-m2Btlr (rio)</i>}	IQ	Cambio A > G; destruye el sitio de empalme del intrón 7	Temblor, tamaño corporal reducido, motilidad reducida del esperma.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd-m3Btlr (wooble)</i>}	IQ	Cambio de A > T; ácido aspártico por valina (p.D954V)	Tamaño corporal reducido, ataxia y alteración del comportamiento motor.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>pcd-Sid</i>}	Espontánea	Delección del exón 7	Tamaño corporal reducido, ataxia, degeneración de CP y atrofia cerebelosa.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>atms</i>}	Espontánea (Knock-out)	Cambio G > C en exón 17; prolina por arginina (p.P808R)	Ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración postnatal de CP y fotorreceptores, infertilidad en machos.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>babe</i>}	IQ	Cambio de C > T produce codón de parada en arginina (p.P804X)	Ataxia y paraparesia.
<i>Agtppb1</i> ^{<i>drunk</i>}	IQ	Cambio de T > A en sitio de empalme del intrón 11	Ataxia, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, infertilidad de machos, y oligozoospermia.
<i>pcd</i> ^{KO}	Knock-out	Delección de exones 21 y 22	Ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración postnatal de CP y fotorreceptores.

*CMs, células mitrales; CP, células de Purkinje; IQ, inducida químicamente; Kb, kilobases.

Estudios posteriores han demostrado que el gen codifica la enzima CCP1, cuya función principal -entre otras- es realizar modificaciones postraduccionales de los microtúbulos, eliminando los residuos de ácido glutámico del extremo C-terminal de las tubulinas (Kalinina *et al.*, 2007; Rogowski *et al.*, 2010; Berezniuk *et al.*, 2012; Otazo *et al.*, 2013). Así, la ausencia de la actividad glutamilasa de CCP1 en el ratón portador de la mutación *pcd* se traduce en la presencia de microtúbulos hiperglutamilados cuya estructura y dinámica están alteradas (Rogowski *et al.*, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). De este modo, estudios previos han relacionado directamente el fenómeno de hiperglutamilación de los microtúbulos con procesos neurodegenerativos de las células de Purkinje (Wang *et al.*, 2006; Rogowski *et al.*, 2010; Magiera *et al.*, 2018; Shashi *et al.*, 2018; Bodakuntla *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Debido precisamente a la función carboxipeptidasa y su implicación en el proceso degenerativo del ratón PCD, emplearemos la denominación *Ccp1* para hacer referencia al gen afectado (Harris *et al.*, 2000). Por último, también se han propuesto otras funciones para la enzima CCP1 relacionadas con la estabilidad de los cromosomas (Baltanás *et al.*, 2011a), la estructura y organización del nucleolo (Baltanás *et al.*, 2019), y la dinámica y el metabolismo energético mitocondrial (Li *et al.*, 2010; Gilmore-Hall *et al.*, 2019).

Efectos generales de la mutación *pcd*

Los efectos de la mutación *pcd* vienen determinados principalmente por las estructuras donde se ha observado una mayor expresión del gen *Ccp1* en animales WT: en las células de Purkinje del cerebelo, en las células mitrales del bulbo olfativo, en neuronas talámicas, en los fotorreceptores de la retina y en espermatozoides maduros y en desarrollo (Fernández-González *et al.*, 2002). Además, una de las características que hacen al ratón PCD un modelo muy versátil para el estudio de enfermedades neurodegenerativas es que los diferentes escenarios degenerativos mencionados no solamente están separados anatómicamente en diferentes regiones encefálicas, sino que también el comienzo y progreso de la degeneración es distinto.

La degeneración más drástica y temprana, y que recordemos da nombre a la mutación, es la que afecta a las células de Purkinje, de manera que a los 40 días de edad postnatal (P40) ha muerto prácticamente toda esta población neuronal (Landis y Mullen, 1978). Además, recientemente se han descubierto células apoptóticas en la CM y en la CG a la edad en la que degeneran las células de Purkinje (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). De forma secundaria, también se ha observado una degeneración retrógrada y anterógrada de

las neuronas del complejo olivar inferior (Ghetti *et al.*, 1987; Triarhou y Ghetti, 1991; Zhou *et al.*, 2018) y de los NCP, respectivamente (Wassef *et al.*, 1986; Triarhou *et al.*, 1987; Bäurle *et al.*, 1997; Blosa *et al.*, 2016).

De forma más tardía, se produce la degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo y del tracto olfativo lateral, entre el segundo y cuarto mes de vida postnatal, finalizando en torno a P110 (Mullen *et al.*, 1976; Greer y Shepherd, 1982; Bartolomei y Greer, 1998; Valero *et al.*, 2006; Recio *et al.*, 2007). Además, durante este periodo también degeneran de forma rápida determinadas neuronas de los núcleos talámicos, permaneciendo únicamente el 10 % de estas a P90 (O’Gorman, 1985). En cuanto a la muerte de los fotorreceptores, esta ocurre de forma gradual a lo largo de un año presentando características similares a la retinosis pigmentaria (Blanks *et al.*, 1982; Marchena *et al.*, 2011). Además, recientemente Shashi *et al.* (2018) descubrieron una degeneración tardía de las motoneuronas en la médula espinal de ratones PCD de siete meses de edad (Shashi *et al.*, 2018).

Por último, la mutación *pcd* ocasiona esterilidad en machos homocigotos para la mutación debido a una menor producción de espermatozoides, que además presentan una morfología aberrante y defectos en la movilidad (Handel y Dawson, 1981; Kim *et al.*, 2011). Por su parte, las hembras sí son fértiles, aunque poseen un menor número de folículos antrales (Song *et al.*, 2015) y tienen serias dificultades en la cría de la escasa descendencia que producen (Mullen *et al.*, 1976; Handel y Dawson, 1981).

Efectos de la mutación *pcd* en el cerebelo

Degeneración cerebelosa en el ratón PCD

Como se ha mencionado anteriormente, el comienzo de la degeneración cerebelosa del ratón mutante PCD ocurre a una edad muy temprana, hacia la tercera semana de vida postnatal, y tiene una evolución muy rápida y agresiva, quedando el cerebelo desprovisto de células de Purkinje entre la quinta y la sexta semana postnatal (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2011a). Curiosamente, al igual que ocurre en otros modelos de degeneración cerebelosa, la región nodular ventral (lóbulo X) exhibe cierta resistencia a la degeneración neuronal (Wang y Morgan, 2007; Martin *et al.*, 2019). Además, la atrofia del cerebelo en el ratón PCD comienza en el vermis y avanza progresivamente hacia los hemisferios cerebelosos (Zhang *et al.*, 1997). Por último, debido

a la degeneración secundaria de otras poblaciones neuronales del cerebelo, las CM y CG disminuyen su espesor y esto contribuye también a la atrofia de esta región encefálica (Ghetti *et al.*, 1987; Triarhou *et al.*, 1998; Wang y Morgan, 2007).

Proceso degenerativo de las células de Purkinje

A pesar de que la muerte de las células de Purkinje comienza alrededor del día P18, se han observado cambios en la expresión génica, alteraciones ultraestructurales y en la citoarquitectura previos a la muerte celular (Ford *et al.*, 2008; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). De esta forma, el proceso global degenerativo se divide en una primera etapa predegenerativa (P15-P18) seguida de una etapa degenerativa *per se* a partir del momento en el que comienza la muerte de las células de Purkinje (P18 en adelante, Baltanás *et al.*, 2021).

La etapa predegenerativa está caracterizada principalmente por una serie de cambios ultraestructurales y alteraciones en la citoarquitectura de las células de Purkinje (Li *et al.*, 2010; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). También se ha detectado una alteración de la expresión de algunos genes relacionados con la migración, la supervivencia y el desarrollo neuronal (Ford *et al.*, 2008). En primer lugar, la configuración citoplasmática de las células de Purkinje del ratón PCD parece mantenerse en un estado inmaduro hasta su completa degeneración, respecto a la de animales WT de la misma edad. Así, a P15 en las células de Purkinje de los ratones PCD aún puede observarse una gran masa de polisomas y un retículo endoplasmático rugoso menos desarrollado, dilatado y carente de ribosomas. Estas características son típicas de células de Purkinje inmaduras (P10-P12) pero no de las fases más tardías del desarrollo (Landis y Mullen, 1978; Chakrabarti *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010, 2020). Posteriormente se ha comprobado que esta acumulación de polirribosomas se correlaciona con un incremento del estrés del retículo endoplasmático en las células de Purkinje del ratón PCD (Kyuhou *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2020). Estas alteraciones se agravan a medida que avanza la degeneración, disociándose los polirribosomas en ribosomas libres citoplasmáticos que, a su vez, son englobados por cisternas de retículo endoplasmático formando autofagosomas (Baltanás *et al.*, 2011b). Además, la actividad aberrante en la autofagia y mitofagia de las células de Purkinje (como la observada en la mutación *pcd^{5J}*) también podría estar contribuyendo a la degeneración celular (Chakrabarti *et al.*, 2009).

Por otro lado, la mutación *pcd* induce cambios progresivos en los compartimentos nucleares relacionados con la transcripción de RNA y procesamiento y reparación del DNA. Así, en el ratón PCD aparecen grandes dominios de heterocromatina transcripcionalmente silenciados y un aumento de DNA dañado (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019). Los cambios son especialmente evidentes en el nucléolo, donde se observa un aumento en el estrés y una alteración progresiva de los componentes fibrilar y granular (Baltanás *et al.*, 2011b, 2019). Esta desestructuración del nucléolo repercute en la síntesis de ribosomas y en la maquinaria de síntesis de proteínas de las células de Purkinje (Chakrabarti *et al.*, 2009; Baltanás *et al.*, 2011b, 2019).

Otras alteraciones a nivel citoplasmático incluyen la aparición de nematosomas en las células de Purkinje de animales de PCD, ocasionalmente a P15 y con regularidad a partir de P18-P22. Estas estructuras son inclusiones citoplasmáticas formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa (Grillo, 1970), cuyo papel en la degeneración de las células de Purkinje aún no se ha descrito.

Por último, también se han detectado alteraciones morfológicas en las células de Purkinje durante el periodo pre- y degenerativo, principalmente en el árbol dendrítico, lo que parece indicar que la degeneración de estas neuronas comienza en las dendritas (Chakrabarti *et al.*, 2009; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Además, también aparecen unos engrosamientos anormales en los axones denominados torpedos (Baltanás *et al.*, 2013). Cabe esperar que estas alteraciones pudieran estar influyendo en la actividad electrofisiológica de las células de Purkinje y en las conexiones sinápticas.

Cambios en otras poblaciones neuronales del cerebelo y reorganización sináptica

Como se describió en el apartado correspondiente, las dos principales vías excitatorias aferentes del cerebelo son las fibras musgosas, procedentes de varias regiones del SNC y cuya conexión con las células de Purkinje es a través de los granos, y las fibras trepadoras, cuyo origen se encuentra en el complejo olivar inferior y establecen conexión sináptica directa con las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998). Por otro lado, la única vía eferente del cerebelo es hacia los NCP y núcleo vestibular (Voogd y Glickstein, 1998). De esta forma, como consecuencia de la degeneración primaria de las células de Purkinje en el ratón PCD, se ha observado una reducción en el número de los granos (Wang y Morgan, 2007; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018) y de las neuronas del complejo olivar inferior (Ghetti *et al.*, 1987; Triarhou y Ghetti, 1991; Zhou *et al.*, 2018), así como de

las neuronas de los NCP en etapas tardías de la neurodegeneración (Triarhou *et al.*, 1987; Blosa *et al.*, 2016).

Por otro lado, también se ha evaluado el impacto de la mutación *pcd* en la neurotransmisión cerebelosa (para revisión Lalonde y Strazielle, 2022). En primer lugar, se ha observado que la degeneración de la principal vía eferente inhibitoria del cerebelo del ratón PCD produce una reducción en la densidad de receptores GABA_A tanto en los NCP como en el núcleo vestibular y un aumento en el sistema glicinérgico en los NCP (Grüsser-Cornehls y Bährle, 2001; Blosa *et al.*, 2016). Por otro lado, en relación con las sinapsis excitatorias, se detectó un aumento en el número de sinapsis glutamatérgicas tanto en los NCP como en el núcleo vestibular del ratón PCD (Blosa *et al.*, 2016). En segundo lugar, las proyecciones procedentes de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe y otras áreas encefálicas hacia las células de Purkinje y los granos se vuelven completamente disfuncionales cuando las células de Purkinje degeneran (Ghetti *et al.*, 1988). Por último, en relación con el sistema dopaminérgico, se ha observado que la pérdida de células de Purkinje induce un incremento en los niveles de los transportadores de dopamina en los NCP, pero al mismo tiempo produce una reducción de los mismos en la CM de la corteza cerebelosa (Delis *et al.*, 2004).

Cabe esperar que la pérdida de las principales conexiones sinápticas y los cambios en los neurotransmisores observados en el ratón PCD estén influyendo en la actividad electrofisiológica de las neuronas del cerebelo. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos estudios publicados en los que se haya analizado la actividad neuronal de las células de Purkinje o de los NCP en este modelo. Grüsser-Cornehls y Bährle analizaron la actividad electrofisiológica en el núcleo vestibular, y observaron que, al contrario de lo esperado debido a la eliminación de la inhibición tónica de las células de Purkinje, no se produjo un aumento en la actividad espontánea (Grüsser-Cornehls y Bährle, 2001). Además, aunque sí se observó una reducción en la densidad de terminales GABAérgicos respecto a los animales WT, se detectaron terminales que podrían proceder de otras regiones extracerebelosas (Grüsser-Cornehls y Bährle, 2001; Blosa *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren la posible existencia de mecanismos compensatorios inhibitorios en el sistema cerebelo-vestibular del ratón PCD.

Neuroinflamación cerebelosa

Debido a la degeneración tan agresiva y rápida de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD se produce una reacción inflamatoria exacerbada. Esta respuesta se caracteriza por una fuerte gliosis reactiva, un aumento en la expresión de genes que codifican factores proinflamatorios y un aumento en la infiltración de leucocitos periféricos hacia el cerebelo (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013; Del Pilar *et al.*, 2021). Como se describió al comienzo de la Introducción, una respuesta inflamatoria aguda puede conferir cierta protección cuando se produce un daño concreto y limitado a una región encefálica (Song y Colonna, 2018). Sin embargo, cuando el proceso neuroinflamatorio se mantiene de forma crónica, como ocurre en el cerebelo del ratón PCD, este puede contribuir al proceso de muerte neuronal promoviendo un ambiente más neurotóxico en la región afectada como se ha observado en otros modelos de degeneración neuronal (Song y Colonna, 2018; Yang y Zhou, 2019).

La gliosis reactiva observada en el cerebelo del ratón PCD afecta principalmente a la microglía (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013). En el cerebelo de ratones WT la microglía se encuentra distribuida de forma homogénea en todo el cerebelo, aunque preferentemente localizada en la CG y la sustancia blanca (Vela *et al.*, 1995; Baltanás *et al.*, 2013). Además, en condiciones basales la microglía presenta una morfología caracterizada por un cuerpo celular pequeño y prolongaciones numerosas, finas y alargadas (Subhramanyam *et al.*, 2019). Por el contrario, las células microgliales del cerebelo del ratón PCD proliferan y experimentan cambios morfológicos desde un estado más ramificado a un estado hipertrófico ameboideo a medida que avanza la degeneración de las células de Purkinje (Baltanás *et al.*, 2013). Además, también se han observado cambios cualitativos en su distribución a partir de la edad de P20, localizándose preferentemente en los lóbulos anteriores del cerebelo y en la CM y la CCP de la corteza cerebelosa (Baltanás *et al.*, 2013), donde tiene lugar principalmente el proceso degenerativo (Wang y Morgan, 2007). Así, a P25, la microglía prácticamente constituye una monocapa en la CCP donde exhibe su morfología más reactiva y cuya función principal será fagocitar las células de Purkinje en degeneración (Baltanás *et al.*, 2013). Además, concomitante a la activación microglial, también se produce una hipertrofia de los astrocitos que sobreexpresan la proteína GFAP (Baltanás *et al.*, 2013). Este aumento en la actividad de la microglía y astrogliá, también está acompañado por una sobreexpresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria

en el cerebelo, tales como *Il1*, *Il6*, *iNos* y *Mmp9*²⁷ en el cerebelo del ratón PCD (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013).

Por último, se sabe que los oligodendrocitos pueden modular la actividad microglial produciendo mediadores en respuesta a un estrés celular (Peferoen *et al.*, 2014). En el caso del ratón mutante PCD, se ha observado que se produce una reducción de sus precursores desde la edad de P20 y que finalmente mueren por apoptosis a partir de P25 (Baltanás *et al.*, 2013). Sin embargo, se cree que este fenómeno es un efecto secundario a la mutación puesto que los oligodendrocitos no expresan el gen *Ccp1* (Fernández-González *et al.*, 2002).

En resumen, en el cerebelo del ratón mutante PCD se produce una respuesta glial desmesurada que puede estar promoviendo un ambiente proinflamatorio que contribuya a la rápida degeneración neuronal observada.

Efectos de la mutación en el comportamiento

Desde la aparición espontánea de la mutación *pcd* en los años 70 y a medida que se han ido descubriendo nuevas funciones relacionadas con el cerebelo, también se han ido evaluando los diversos efectos de la mutación en el comportamiento del ratón mutante PCD.

Una de las características fenotípicas más representativas del modelo, es la ataxia cerebelosa o ausencia de coordinación motora, que está presente desde la tercera semana de vida postnatal (Landis y Mullen, 1978; Le Marec y Lalonde, 1997; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Lalonde y Strazielle, 2019). La marcha atáxica del ratón PCD evoluciona negativamente a medida que avanza la degeneración cerebelosa y se caracteriza por pasos más cortos y espaciados (Landis y Mullen, 1978; Le Marec y Lalonde, 1997; Wang y Morgan, 2007; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Lalonde y Strazielle, 2019; Machado *et al.*, 2020). Además, también se han observado deficiencias en la prueba de condicionamiento “*delayed eye-blinking*” empleada para evaluar la integridad del cerebelo (Chen *et al.*, 1996).

Por otro lado, también se han detectado alteraciones en la memoria espacial y memoria a largo plazo a través de las pruebas del laberinto acuático de Morris y de

²⁷ Del inglés *Matrix Metalloproteinase 9*

reconocimiento de objetos novedosos (NOR²⁸), respectivamente (Goodlett *et al.*, 1992; Lalonde y Strazielle, 2003; Tuma *et al.*, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Por su parte, la prueba de preferencia social reveló que la pérdida de células de Purkinje en el cerebelo produce una disminución de la interacción social y un comportamiento depresivo en los ratones PCD (Tuma *et al.*, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Por último, debido a la degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo a edades más tardías, el ratón PCD también exhibe una reducción en la capacidad de detección y discriminación olfativa (Díaz *et al.*, 2012a).

Estrategias terapéuticas en el modelo PCD

Debido a los diferentes escenarios de degeneración neuronal que presenta el ratón PCD, este modelo ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de estrategias neuroprotectoras. Principalmente se han analizado terapias farmacológicas o terapia celular, cuyo objetivo principal en ambos casos ha sido revertir, o, al menos, prevenir el proceso de degeneración cerebelosa en los mutantes PCD como se detallará a continuación.

En relación con la terapia celular, se han evaluado diferentes tipos de trasplantes celulares. En primer lugar, varios trabajos demostraron cómo el trasplante de primordios de cerebelo de ratones WT en ratones mutantes PCD, tanto en suspensiones celulares, como en implantes sólidos, eran capaces de integrarse en el circuito sináptico del cerebelo y atenuar los síntomas del fenotipo PCD (Sotelo y Alvarado-Mallart, 1986, 1987; Gardette *et al.*, 1988; Triarhou *et al.*, 1992, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Por otro lado, aprovechando la capacidad de migración y de diferenciación de las BMSC en el encéfalo (Recio *et al.*, 2011), también se han publicado varios trabajos en los que el reemplazo completo de la médula ósea de ratones PCD por médula ósea de ratones WT sanos atenuó la degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo y mejoró el comportamiento motor y la capacidad olfativa de los mutantes (Díaz *et al.*, 2012a, 2018). Sin embargo, estas aproximaciones presentan tres limitaciones principales en el modelo PCD, similares a las expuestas anteriormente en el apartado de Terapia Celular. En primer lugar, la llegada e integración de las células trasplantadas no es lo suficientemente rápida como para frenar la pérdida

²⁸ Del inglés *Novel Object Recognition test*

neuronal que ya está teniendo lugar en el cerebelo del ratón PCD. En segundo lugar, debido a las características de la administración, muchas células quedan retenidas en los pequeños capilares de órganos periféricos por lo que el número de células que potencialmente pueden alcanzar el cerebelo es mucho menor del administrado (Schrepfer *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009). Y, en tercer lugar, las células trasplantadas deben atravesar dos obstáculos físicos, la BHE y la barrera de la CG. En este sentido, se han realizado modificaciones de la técnica; por ejemplo, el trasplante diario con BMSC sí consiguió la fusión entre células trasplantadas y células de Purkinje en el ratón PCD (Díaz *et al.*, 2019). Por último, en estudios preliminares en los que se trasplantaron células mieloides inmaduras directamente en el parénquima cerebeloso se consiguió paliar los efectos perjudiciales de la neurocirugía del trasplante, aunque no se obtuvieron mejoras relacionadas con la degeneración del modelo PCD (Del Pilar, 2021). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, es necesario optimizar y refinar estas técnicas o bien combinarlas sinérgicamente con otras aproximaciones para asegurar un aporte de células que puedan alcanzar exitosamente la región afectada y ejercer un efecto neuroprotector o ampliar la ventana temporal en la que la terapia celular pueda ser efectiva.

Por su parte, las terapias farmacológicas se han enfocado principalmente en la prevención de la degeneración cerebelosa o bien en la modulación de la respuesta glial. Así, la administración del factor neuroprotector IGF1²⁹ mostró una mejora en el comportamiento motor de ratones PCD (Carrascosa *et al.*, 2004), pero, además, también reveló una estabilización en el progreso de la degeneración del cerebelo de diferentes pacientes con ataxia cerebelosa autosómica dominante (Sanz-Gallego *et al.*, 2014). Por su parte, la atenuación de la activación glial tras la administración de minociclina consiguió retrasar la muerte de las células de Purkinje y mejorar parcialmente el comportamiento motor del ratón PCD (Kyuhou *et al.*, 2006). Por último, estudios preliminares de nuestro laboratorio demostraron que la administración del endocannabinoide OEA aumentó la supervivencia celular y mejoró la morfología de las células de Purkinje en el ratón PCD (Muñoz-Casteñeda, 2015). En concreto, el mayor efecto se observó con las pautas de OEA administradas previamente al comienzo de la predegeneración (i.e., antes de P15), siendo la administración aguda de OEA (10 mg/kg i.p.) en el día P14 la que ejerció mayor efecto neuroprotector (Muñoz-Casteñeda, 2015). Los resultados prometedores obtenidos tras el tratamiento con OEA incitaron a evaluar la ventana temporal en la que esta molécula ejerce una mayor neuroprotección, no solo a nivel celular, sino también en el estado

²⁹ Del inglés *Insulin-like Growth Factor*

neuroinflamatorio y en el comportamiento del ratón PCD (Pérez-Martín *et al.*, 2021). Debido a que los resultados obtenidos en estos estudios forman parte de la presente Tesis Doctoral, se detallarán más adelante en la sección correspondiente.



Justificación,
hipótesis y objetivos

Desde hace décadas, la investigación y la búsqueda de nuevas terapias para hacer frente a las enfermedades neurodegenerativas son un gran desafío para la comunidad científica y para la sociedad. A pesar de que en la actualidad existen fármacos capaces de paliar los síntomas derivados de la degeneración neuronal, no disponemos de un tratamiento verdaderamente eficaz capaz de frenar o revertir estas afectaciones. En este sentido, la investigación en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas ha permitido dilucidar cuestiones clave sobre la etiología, la evolución y la prognosis de estas, así como diseñar nuevos tratamientos y evaluar su eficacia en estudios preclínicos.

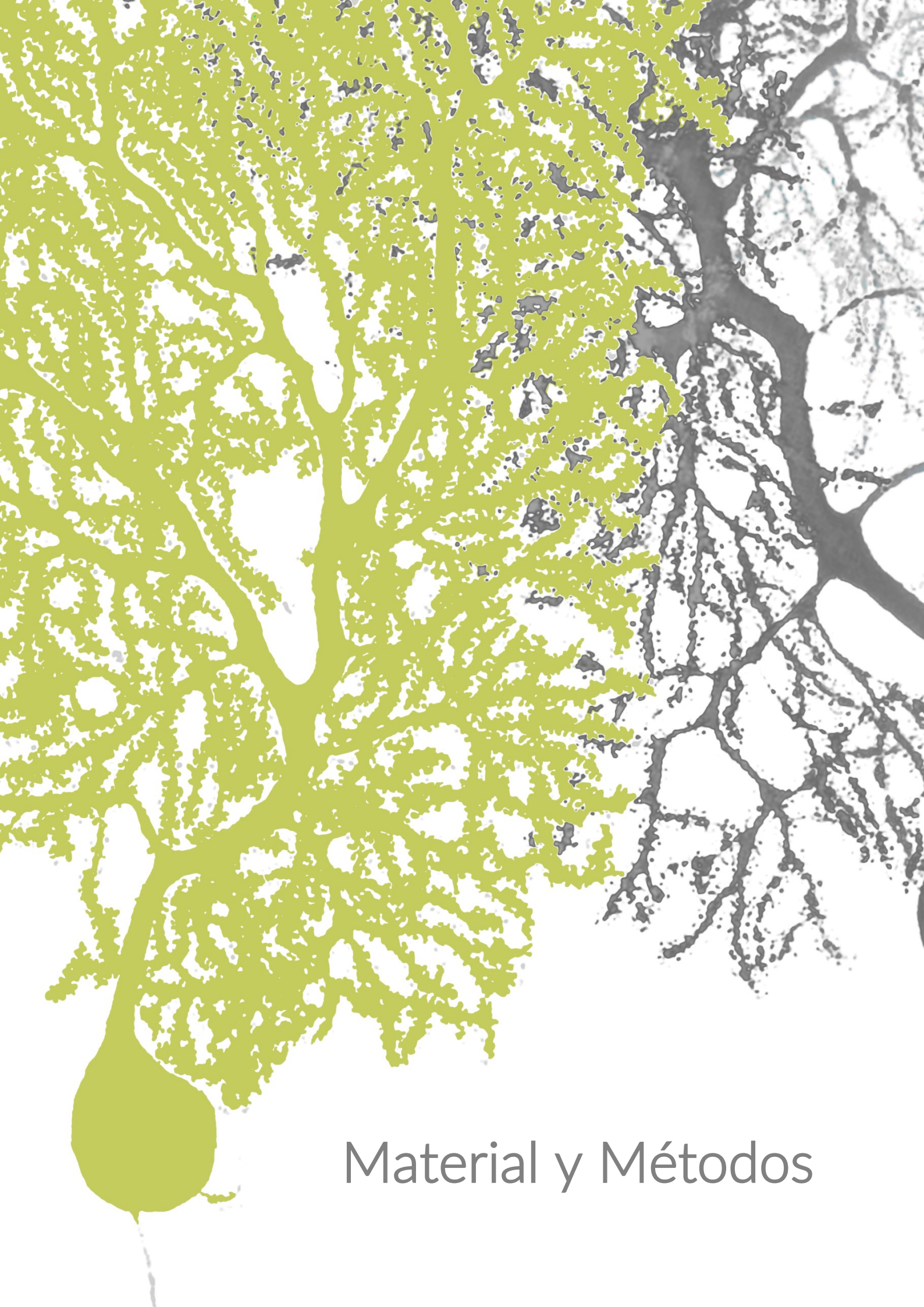
En este trabajo se ha empleado el ratón PCD como modelo de degeneración neuronal selectiva y de neuroinflamación para la evaluación de diferentes tratamientos combinados basados en dos aproximaciones: la terapia farmacológica con OEA y la terapia con células madre. Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado las propiedades neuroprotectoras individuales de cada una de las terapias mencionadas anteriormente (Díaz *et al.*, 2012, 2015, 2018, 2019; Muñoz-Castañeda, 2015). Sin embargo, en este trabajo hemos querido ir un paso más allá y analizar el posible efecto sinérgico entre ambas terapias empleadas conjuntamente. En este sentido, el ratón PCD se erige como un modelo idóneo para la evaluación de nuevas estrategias terapéuticas con una alta aplicabilidad en clínica, pues recapitula los principales signos fisiopatológicos de enfermedades neurodegenerativas que afectan a humanos (Shashi *et al.*, 2018; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021).

Por lo tanto, la **hipótesis** de la presente Tesis Doctoral es que “la combinación del tratamiento farmacológico con OEA y la terapia celular ejercen un efecto sinérgico neuroprotector en un modelo de degeneración neuronal selectiva y neuroinflamación”.

Para comprobar la hipótesis anterior, se han desarrollado los siguientes **objetivos** generales y específicos:

- I. Analizar del efecto neuroprotector, antiinflamatorio e inmunomodulador de la OEA.
 - a. Optimizar la ventana temporal terapéutica de la OEA y analizar el efecto neuroprotector a nivel histológico a P30 y P40.
 - b. Evaluar las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la dosis óptima de OEA en el cerebelo a nivel génico a corto (~P12), medio (P20) y largo plazo (P30).

- c. Analizar el efecto de la dosis óptima de OEA en la microgliosis cerebelosa y en la infiltración de leucocitos periféricos a P30.
 - d. Examinar el efecto de la dosis óptima de OEA en la actividad electrofisiológica y en las funciones motoras, cognitivas y sociales a lo largo del proceso neurodegenerativo.
 - e. Explorar la implicación de los receptores PPAR α en los efectos observados a nivel histológico y en el comportamiento tras el tratamiento con OEA a P30.
- II. Analizar el efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y el trasplante completo con células madre derivadas de la médula ósea (BMSC).
- a. Evaluar la seguridad y viabilidad del tratamiento combinado de OEA y BMSC.
 - b. Examinar el efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en el comportamiento motor a lo largo del proceso neurodegenerativo.
 - c. Analizar la llegada de las células derivadas del trasplante y el efecto neuroprotector a nivel histológico en el cerebelo a P30 y P40.
- III. Analizar el efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y el trasplante continuo de células mesenquimales (MSCs).
- a. Evaluar la viabilidad del tratamiento combinado de OEA y MSCs.
 - b. Examinar el efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en el comportamiento motor a lo largo del proceso neurodegenerativo.
 - c. Analizar la llegada de las células derivadas del trasplante y el efecto neuroprotector a nivel histológico en el cerebelo a P30.



Material y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se emplearon ratones (*Mus musculus* L. 1758; Muridae, Rodentia, Mammalia) WT y mutantes PCD de las estirpes C57BL/DBA y BALB/C57BL de diferentes edades y sexos como se detallará más adelante. Estas estirpes híbridas se obtuvieron a través del cruce entre animales C57BL/6J y DBA/2J, y BALB/cJ y C57BL/6J, respectivamente, todas procedentes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, EE. UU.).

Los animales se criaron y mantuvieron en el animalario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, en el animalario de Organismos Modificados Genéticamente del Centro de Investigación del Cáncer (ambos pertenecientes al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca) y en el animalario del Edificio Kennedy del Centro de Investigación *Albert Einstein College of Medicine* en Nueva York (NY, EE. UU.). Todos los animales se alojaron en un rack ventilado de tipo Boxunss LN63 para ratones (Tecniplast, Buguggiate, Italia) a temperatura y humedad relativa constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas y alimentados *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores Teklad Global Diet (Envigo, Indianápolis, IN, EE. UU.). Debido a las necesidades especiales de cuidado del modelo utilizado en la presente Tesis Doctoral, la dieta de los animales mutantes se suplementó con agar gelatinizado al 3 % (p/v, Panreac-AppliChem, Castellar del Vallès, España), a partir de la edad del destete (P21-22).

Todos los procedimientos se realizaron en cumplimiento de la normativa europea (Directiva 2010/63/UE), española (RD118/2021 y Ley 32/2007) y estadounidense (Health Research Extension Act of 1985, Public Law 99-158) vigentes para el manejo y cuidado de los animales de experimentación, y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (Referencia #613) y del Centro de Investigación *Albert Einstein College of Medicine* (Protocolo #00001090).

Colonia PCD

Como se indicó en la Introducción, los animales pertenecientes a la colonia híbrida PCD (C57BL/DBA) empleada en este estudio portaban la mutación original *pcd^{1J}* que fue transferida a la estirpe C57BL/6J en 1976 (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978). Esta colonia híbrida se obtuvo mediante cruces entre ratones macho heterocigotos para la mutación *pcd^{1J}* (+/*pcd*) de la estirpe C57BL/6J y hembras WT (+/+) de la estirpe DBA/2J,

de manera que se consiguió asociar el alelo mutante *pcd^{1J}* al trasfondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo WT quedó asociado al trasfondo genético del cromosoma 13 de la estirpe DBA/2J. Debido a las características relacionadas con la fertilidad y cría de los animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*; ver Introducción), el establecimiento y mantenimiento posterior de la colonia híbrida se llevó a cabo mediante cruces entre individuos heterocigotos (+/*pcd*).

A edades tempranas previas al comienzo de la predegeneración, los ratones homocigotos *pcd/pcd* son fenotípicamente indistinguibles tanto de los ratones WT (+/+) como de los heterocigotos (+/*pcd*; Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Asimismo, los animales WT y los heterocigotos tampoco se distinguen fenotípicamente en la edad adulta (Landis y Mullen, 1978), momento en el que se seleccionan los heterocigotos para la cría y mantenimiento de la colonia PCD. Por estas razones, es necesario recurrir a técnicas de identificación genética que nos permitan caracterizar genotípicamente los animales y planificar los experimentos posteriores con suficiente antelación. Para la tipificación genética se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR³⁰.

Debido a que la mutación *pcd^{1J}* se encuentra en una región reguladora del gen *Ccp1* aún no identificada (Fernández-González *et al.*, 2002), se recurrió al empleo de microsatélites como marcadores moleculares intraespecíficos para la caracterización alélica del genotipo de los animales. Se analizaron dos microsatélites presentes tanto en la estirpe C57BL/6J como en la estirpe DBA/2J, denominados D13Mit250 y D13Mit283. Ambos están localizados próximos a la región del gen *Ccp1* donde se encuentra la mutación *pcd^{1J}*, por lo que se presupone su transmisión ligada con una alta probabilidad. Además, cada uno de los microsatélites difiere en el número de pares de bases (pb) en función de la estirpe C57BL/6J y DBA/2J, lo que nos permite diferenciar los alelos *pcd^{1J}* y WT al separar mediante electroforesis los productos obtenidos tras la PCR como se describirá a continuación.

Extracción de DNA

Tras el correspondiente marcaje individual de los animales mediante perforación de la oreja alrededor de P6-8, se tomó una muestra de tejido de la propia perforación o de la cola para la extracción del DNA. Para el aislamiento del DNA genómico, el tejido se

³⁰ Del inglés *Polymerase Chain Reaction*

homogeneizó y lisó durante cuatro horas a 55 °C en un tampón que contenía: proteinasa K 6 U/ml (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU.), dodecil sulfato sódico (SDS³¹; Sigma-Aldrich) 0,2 % (p/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA³²; Sigma-Aldrich) 5 mM a pH 8,0, tampón Tris 0,1 M pH 8,0 (ver Apéndice I), NaCl 200 mM (Sigma-Aldrich) y agua Elix. Tras resuspender el homogeneizado, se centrifugó a 13.200 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 2 min a temperatura ambiente empleando una centrífuga 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se recogió el sobrenadante que contenía el DNA. A continuación, se añadió un volumen equivalente de isopropanol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia) para precipitar el DNA y se centrifugó de nuevo a 13.200 r.p.m. durante 10 min. Finalmente, cada precipitado de DNA se lavó con etanol 70 % (v/v; VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU.) a 4 °C, se centrifugó de nuevo a 13.200 r.p.m. durante 10 min, se dejó secar y se resuspendió en 20-50 µl de agua Elix.

Amplificación del DNA mediante PCR

Mediante la técnica de la PCR se amplificaron dos regiones microsatélites próximas al gen *Ccp1*: D13Mit250 y D13Mit283. El medio para realizar la PCR contenía: tampón comercial de la polimerasa Taq³³ 1X (Promega, Madison, WI, EE. UU.), Taq polimerasa 0,125 U/µl (Promega), desoxinucleótidos trifosfato 0,2 mM (Promega), dimetilsulfóxido 5 % (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, cebadores o *primers* 2,5 µM (cada uno, ver Tabla 2), DNA (100-500 ng) y agua Elix.

TABLA 2 | Secuencias sentido y antisentido de los *primers* utilizados para la amplificación de los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283.

Microsatélite	Primer sentido	Primer antisentido
D13Mit250	ACACTCATTTCATGCACGA	AGGTCCTCAAATCTCACAAGTAGG
D13Mit283	GGAAGCAGTCTCCTGCCTC	GAGAGGTGGCACATGAGGTT

Como control positivo se incluyó siempre una muestra de DNA de cada uno de los genotipos posibles (+/+, +/*pcd* y *pcd/pcd*), y como control negativo se empleó el medio descrito anteriormente sustituyendo el volumen de DNA por agua Elix.

La PCR se realizó en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) programado con las condiciones de amplificación que se muestran detalladas a continuación (Tabla 3).

³¹ Del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*

³² Del inglés *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*

³³ *Taq* hace referencia a la bacteria *Thermus aquaticus* de la cual fue aislada la DNA polimerasa empleada en la técnica de la PCR (Chien *et al.*, 1976)

TABLA 3 | Condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos de la PCR.

Ciclo	Fase	Temperatura D13Mit250/D13Mit283	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
2	Desnaturalización	94 °C	1 min
3	Alineamiento	54/53 °C	1 min
4	Elongación	72 °C	1 min 20 s
5	Elongación final	72 °C	10 min
6	Conservación	4 °C	∞

Electroforesis en gel de agarosa

Las regiones microsatélites amplificadas mediante la técnica PCR, D13Mit250 y D13Mit283, presentan diferencias en el número de pb dependiendo de la estirpe murina. En el caso del microsatélite D13Mit250, el producto de la PCR es un fragmento de 130 pb en los ratones de la estirpe C57BL/6J, mientras que en la estirpe DBA/2J consta de 116 pb. En el caso del microsatélite D13Mit283, el producto de la PCR es un fragmento de 114 pb y 136 pb en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, respectivamente (Figura 10).

Los productos de la PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa MS8 para fragmentos pequeños de DNA (Condalab, Madrid, España) al 3 % (p/v) en tampón Tris-Borato-EDTA 0,5X (ver Apéndice I) a un voltaje de 100-110 V durante 20 min. Al gel se le añadió RedSafe 0,1 µl/ml (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur), un agente intercalante del DNA que permite visualizar las bandas del DNA amplificado con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta modelo Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.).

Teniendo en cuenta la segregación diferencial de los alelos *pcd^{1J}* y WT de la colonia híbrida C57BL/DBA descrita anteriormente en la que el alelo *pcd^{1J}* está asociado al trasfondo genético de la estirpe C57BL/6J y el alelo WT al de la estirpe DBA/2J, la diferencia en el número de pb de los microsatélites en función de la estirpe permite tipificar el genotipo de los

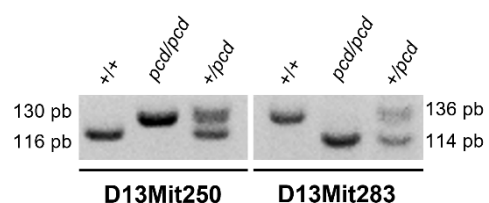


FIGURA 10 | Resultado de la electroforesis para el genotipado de la mutación *pcd^{1J}*. Las bandas simples corresponden a animales WT (+/+) y PCD (*pcd/pcd*); las bandas dobles a animales heterocigotos (+/*pcd*).

animales de los que proceden las muestras de DNA. Así, los carriles del gel en los que tras la electroforesis aparece una sola banda de 130 pb para D13Mit250 o de 114 pb para D13Mit283 corresponden con animales homocigotos para la mutación *pcd^{1J}* (*pcd/pcd*; Figura 10). Aquellos en los que aparece una única banda de 116 pb para D13Mit250 o una banda de 136 pb para D13Mit283 corresponden con los animales homocigotos WT (+/+;

Figura 10). Por último, los carriles en los que aparecen dos bandas de diferente tamaño, 130 y 116 pb para D13Mit250, o bien, 114 y 136 pb para D13Mit283 corresponden con los animales heterocigotos (+/*pcd*; Figura 10).

Colonia GFP

Para identificar las células derivadas del trasplante en los animales receptores, se emplearon animales donantes de la colonia híbrida BALB/C57BL cuyas células expresan de forma constitutiva el gen de la proteína verde fluorescente GFP y la recombinasa CRE. Esta colonia híbrida se obtuvo a partir de cruces entre animales de la estirpe BALB/c-Tg(CMV-cre)1Cgn/J y animales de la estirpe C57BL/6J que sintetizan la proteína GFP, ambos adquiridos en los Laboratorios Jackson. Esta colonia había sido empleada previamente en el laboratorio para detectar fenómenos de fusión celular derivados de trasplantes de BMSC mediante el sistema Cre-LoxP³⁴ (Díaz, 2011; Recio *et al.*, 2011). Con el fin de no aumentar el número de colonias empleadas y teniendo en cuenta que la expresión de la recombinasa CRE no influía en los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral, se utilizaron animales de esta colonia híbrida independientemente de su genotipo CRE.

En todos los procedimientos se emplearon como animales donantes de células de la médula ósea ratones heterocigotos para la proteína GFP (+/*gfp*). La proteína GFP, aislada originalmente de la medusa *Aequorea victoria* (Aequoreidae, Leptothecata, Hydrozoa), emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible al ser excitada con luz ultravioleta (Shimomura, 2005). Esto permite identificar el genotipo de los animales de la colonia BALB/C57BL a través de su fenotipo. Así, la identificación de los animales GFP se realizó mediante la exposición directa y breve de los animales a una fuente de luz ultravioleta de 312 nm modelo VL-6.MC (Vilber Lourmat, Collégien, Francia).

DISEÑO EXPERIMENTAL Y TAMAÑO MUESTRAL DE LOS EXPERIMENTOS

El diseño de los procedimientos realizados en esta Tesis Doctoral se llevó a cabo bajo el principio de las tres erres de experimentación animal propuesto por Russel y Burch con el fin de utilizar el mínimo número de animales de experimentación que permitieran obtener resultados robustos, concluyentes y reproducibles (Russell y Burch, 1959). Debido a la diversidad de grupos experimentales, edades analizadas y experimentos, el tamaño

³⁴ Del inglés *Locus of X-over P1*

muestral utilizado en cada caso se detalla en la Tabla 4. Así, el desarrollo de los objetivos se articula en base a tres fases en función de la estrategia terapéutica empleada, como se muestra a continuación (Figura 11):

- Estrategia terapéutica I: tratamiento exclusivo con OEA.
- Estrategia terapéutica II: tratamiento combinado de OEA y trasplante completo de BMSC.
- Estrategia terapéutica III: tratamiento combinado de OEA y trasplante continuo de MSCs derivadas de la médula ósea.

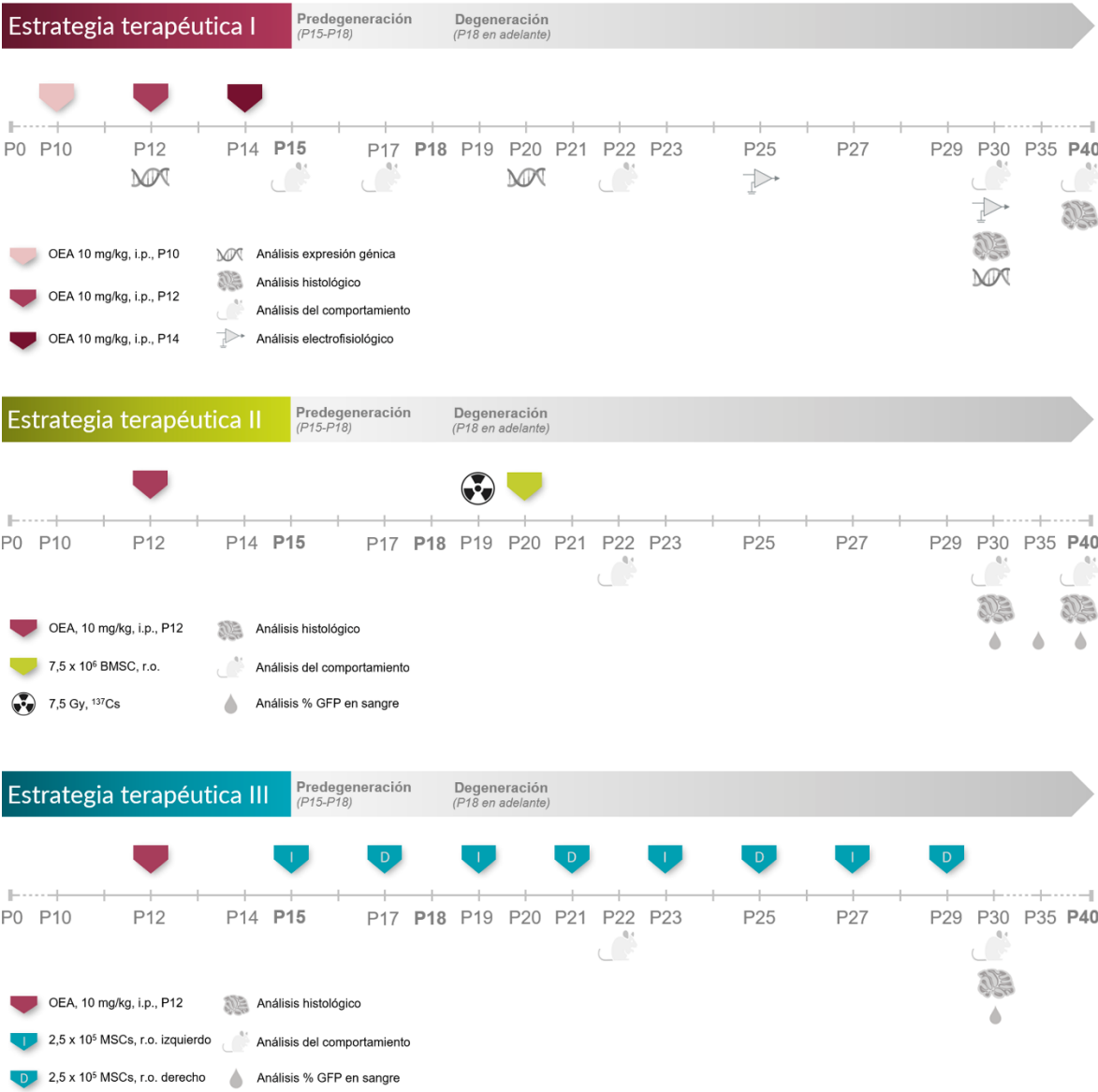


FIGURA 11 | Diseño experimental de las tres estrategias terapéuticas empleadas en la presente Tesis Doctoral y los principales análisis realizados en cada una de ellas. *i.p.*, intraperitoneal; *r.o.*, retroorbital.

TABLA 4 | Tamaño muestral de los diferentes grupos experimentales.

Estrategia y objetivo		Grupo Experimental	n	Total
ESTRATEGIA I	Análisis histológico del efecto neuroprotector OEA a P30	WT	6	32
		PCD sin tratamiento	7	
		PCD tratado con OEA P10	7	
		PCD tratado con OEA P12	7	
		PCD tratado con OEA P14	5	
	Análisis histológico del efecto neuroprotector a P40	WT	8	24
		PCD sin tratamiento	8	
		PCD tratado con OEA P12	8	
	Análisis molecular del efecto antiinflamatorio de la OEA a corto plazo (~P12)	WT sin tratamiento	6	18
		WT 3h postratamiento con OEA P12	6	
		WT 24h postratamiento con OEA P12	6	
	Análisis molecular del efecto antiinflamatorio de la OEA a medio plazo (P20)	WT	6	18
		PCD sin tratamiento	6	
		PCD tratado con OEA P12	6	
	Análisis molecular del efecto antiinflamatorio de la OEA a largo plazo (P30)	WT	6	18
		PCD sin tratamiento	6	
		PCD tratado con OEA P12	6	
	Análisis histológico de la microglía tras el tratamiento con OEA a P30	WT	5*	0
		PCD sin tratamiento	7*	
PCD tratado con OEA P12		7*		
Análisis electrofisiológico tras el tratamiento con OEA (P25 y P30)	WT	6	11	
	PCD sin tratamiento	3		
	PCD tratado con OEA P12	2		
Análisis del comportamiento motor, social y cognitivo tras el tratamiento con OEA	WT	8*	0	
	PCD sin tratamiento	8*		
	PCD tratado con OEA P12	8*		
Implicación de los receptores PPAR α en el efecto neuroprotector de la OEA a nivel histológico y del comportamiento a P30	PCD sin tratamiento	7*	4	
	PCD tratado con OEA P12	7*		
	PCD tratado con inhibidor de PPAR α y OEA P12	4		
ESTRATEGIA II	Análisis del efecto neuroprotector del tratamiento OEA y trasplante completo de BMSC a nivel histológico y del comportamiento P30	WT	6*	8
		PCD sin tratamiento	6*	
		PCD tratado con OEA	7*	
		PCD tratado con OEA y trasplantado con BMSC	5	
		Donantes GFP	3	
	Análisis del efecto neuroprotector del tratamiento OEA y trasplante completo de BMSC a P35	PCD sin tratamiento	4	10
		PCD tratado con OEA y trasplantado con BMSC	4	
		Donantes GFP	2	
	Análisis del efecto neuroprotector del tratamiento OEA y trasplante completo de BMSC a nivel histológico y del comportamiento a P40	WT	8*	11
		PCD sin tratamiento	8*	
PCD tratado con OEA		8*		
PCD tratado con OEA y trasplantado con BMSC		6		
Donantes GFP		5		
ESTRATEGIA III	Cultivo y diferenciación de células MSCs derivadas de médula ósea de ratón	Donantes GFP	4	4
	Análisis del efecto neuroprotector del tratamiento OEA y trasplante continuo de MSCs a nivel histológico y del comportamiento a P30	WT	6*	3
		PCD sin tratamiento	7*	
		PCD tratado con OEA	7*	
		PCD tratado con OEA y trasplantado con BMSC	5*	
		PCD tratado con OEA y trasplantado con MSCs	3	

* Se reutilizó tejido de animales de fases y/u objetivos previos (indicados con el mismo color). BMSC, células madre derivadas de la médula ósea; MSCs, células mesenquimales; OEA, N-oleiletanolamina.

TERAPIA FARMACOLÓGICA

El fármaco OEA (CAS: 111-58-0; Sigma-Aldrich) y el antagonista del receptor PPAR α GW6471 (CAS: 880635-03-0; Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido) se prepararon en fresco el día de la administración, evitando así la degradación de los compuestos. Las dosis empleadas fueron de 10 mg/kg y 2,5 mg/kg (peso del animal), respectivamente, administradas por vía i.p. con una jeringa de insulina (0,5 ml, 30G x 0,3 x 8 mm; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) en un volumen de 10 μ l/g (peso del animal) como se había descrito en estudios previos (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; González-Aparicio y Moratalla, 2014; González-Aparicio *et al.*, 2014; Muñoz-Castañeda, 2015).

En primer lugar, los compuestos se disolvieron por separado en etanol 100 % (v/v) y a continuación se diluyeron en agua Elix hasta una concentración final de etanol 10 % (v/v). La OEA se administró de forma aguda en los días P10, P12 o P14 según la pauta de administración de cada grupo experimental (Figura 11). Cuando fue necesario, se administró el inhibidor GW6471 15 min antes del tratamiento con OEA o NaCl 0,9 % (p/v) también por vía i.p.. Todos los animales fueron tratados por la mañana a las 10 a. m. y se monitorizó su peso corporal durante el tiempo que se extendieron los procedimientos experimentales debido al efecto anorexigénico de la OEA (Fu *et al.*, 2003, 2005; Fedele *et al.*, 2018).

TERAPIA CELULAR

En este apartado se describirá cómo se obtuvieron los diferentes tipos celulares utilizados en los tratamientos combinados de las estrategias terapéuticas II y III, la técnica de trasplante y el seguimiento de los animales tratados con cualquiera de las dos terapias combinadas: a) tratamiento con OEA y trasplante completo de médula ósea (OEA + BMSC), y b) tratamiento con OEA y trasplante continuo de MSCs derivadas de la médula ósea (OEA + MSCs).

Trasplante de médula ósea completa

Ablación de la médula ósea de los animales receptores por irradiación

En los trasplantes completos de BMSC, un requerimiento fundamental previo para asegurar el anidamiento y repoblación de la médula ósea trasplantada es la ablación de la médula ósea propia de los animales receptores (Whetton y Graham, 1999; Fuchs *et al.*,

2004; Hidalgo, 2008). En el presente trabajo, la eliminación de la médula ósea se realizó mediante radiación homogénea del cuerpo completo del animal en el día P19 con una fuente de ^{137}Cs y una dosis de 7,5 Gy, dosis letal mínima que permite la eliminación de la médula ósea en ratones de esta edad (Recio *et al.*, 2011; Díaz, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015). El equipo de irradiación para ratones que se utilizó fue Gammacell 1000 Ellite (Nordion, Ottawa, ON, Canadá) del Servicio de Isótopos radiactivos y Radioprotección del Servicio Nucleus de la Universidad de Salamanca, cuya tasa de radiación es de 243 cGy/min y la energía de emisión de 0,662 MeV.

Todos los animales irradiados, se mantuvieron separados en jaulas especiales hasta el momento del trasplante de médula ósea, 24 horas tras la irradiación (P20).

Obtención de la médula ósea del donante

Las BMSC para el trasplante completo se obtuvieron a partir de fémures, tibias e ilion de animales donantes GFP de P80-P90. Para ello, el mismo día del trasplante (P20), los animales donantes se sacrificaron por dislocación cervical, y los huesos mencionados se diseccionaron cuidadosamente para evitar fisuras o fracciones (Figura 12 a). A continuación, los huesos se mantuvieron en una placa de cultivo con PBS³⁵ 0,1 M, pH 7,4 a una temperatura de 4 °C y se trasladaron al interior de una campana de flujo laminar Heraguard ECO 1.5 (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para extraer la médula ósea en condiciones asépticas. A continuación, se perforaron las dos epífisis de cada hueso con una jeringa de insulina (0,5 ml, 30G x 0,3 x 8 mm; Becton Dickinson) y se inyectó medio IMDM³⁶ (Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU.) tres veces por cada epífisis (Figura 12 b). La médula ósea obtenida de los huesos de un mismo animal se recogió sobre un tamiz celular de 70 μm de diámetro de poro (Becton Dickinson) acoplado a un tubo Falcon de 50 ml (Corning, Nueva York, NY, EE. UU.), y se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C (Figura 12 c). A continuación, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 ml de tampón de lisis de eritrocitos (ver Apéndice I) durante 1 min a 4 °C sin agitación (Figura 12 d). La reacción de lisis finalizó al añadir PBS hasta un volumen de 50 ml. En este punto, se tomó una alícuota de 20 μl para estimar el número total de células de la médula ósea extraídas en una cámara Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). Se empleó azul de tripán (Gibco, Waltham, MA, EE. UU.) para evaluar la viabilidad celular del conjunto de células extraídas. Mientras se realizaba el recuento celular, las células

³⁵ Del inglés *Phosphate Buffered Saline*

³⁶ Del inglés *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

resuspendidas en los 50 ml de PBS se centrifugaron de nuevo a 1.500 r.p.m. durante 5 min a 4 °C. Finalmente, se resuspendió el precipitado de células en un volumen de PBS variable en función del número de células estimadas en el recuento, de tal forma que 70 μ l contuvieran $7,5 \times 10^6$ células. Esta suspensión final se mantuvo a 4 °C hasta el momento del trasplante vía intravenosa (ver más adelante).

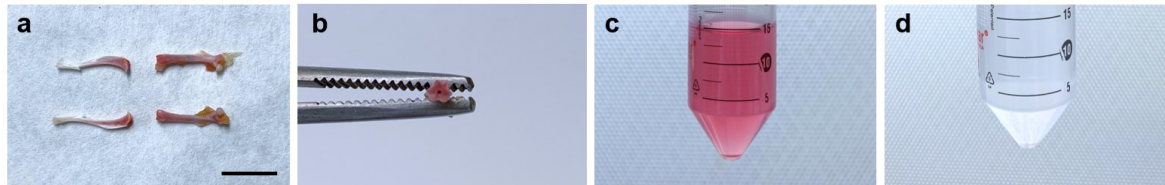


FIGURA 12 | Obtención de BMSC. (a) Huesos íntegros a partir de los que se realizó la extracción de médula ósea. (b) Detalle de la perforación de la epífisis de un hueso. (c) Suspensión de la médula ósea completa en medio IMDM. (d) Suspensión de células de la médula ósea con los eritrocitos lisados. Barra de escala: 1 cm.

Trasplante de células madre mesenquimales

Obtención, aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales

Las MSCs se obtuvieron a través del cultivo y diferenciación de BMSC de ratones donantes GFP de P50-P60. El procedimiento de obtención de BMSC fue idéntico al expuesto en el apartado anterior, con las únicas excepciones de que el medio que se empleó para el lavado de huesos fue α -MEM³⁷ sin nucleósidos (Gibco) y no se realizó el lisado de los eritrocitos. Tras el recuento celular, se resuspendieron las células obtenidas en 16 ml de medio de cultivo de MSCs completo a 37 °C y se sembraron en frascos para cultivo celular de 75 cm² con filtro (Nunc, Rochester, NY, EE. UU.). El medio de cultivo de MSCs completo contenía α -MEM sin nucleósidos (Gibco), L-Glutamina 2mM (Gibco), 15 % (v/v) de suero fetal bovino (FBS³⁸) inactivado por calor (Cytiva SV30160.03, Hyclone, Logan, UT, EE. UU.) y 1 % (v/v) de la mezcla antibiótica penicilina-estreptomicina-neomicina (Gibco). Las células se mantuvieron en un incubador de CO₂ Steri-Cycle HEPA Class 100 (ThermoFisher Scientific) a 37 °C y 5 % (v/v) de CO₂ durante cuatro días sin cambiar el medio para permitir la adhesión al plástico, pues es uno de los criterios mínimos que deben cumplir las MSCs según la Sociedad Internacional para la Terapia Celular para ser definidas como tal (Dominici *et al.*, 2006). Pasados estos cuatro primeros días, se realizaron cambios del medio cada 2 o 3 días para retirar las células no adherentes, y se realizaron pases a una relación 1:3 con tripsina-EDTA 0,25 % (v/v; Gibco) cuando el cultivo

³⁷ Del inglés *Minimum Essential Medium*

³⁸ Del inglés *Fetal Bovine Serum*

alcanzaba una confluencia del 90 %, es decir, cuando el 90 % de la superficie de la placa estaba ocupado por células.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se comprobó que mínimo hasta el pase 3 no se conseguía un cultivo puro de MSCs que cumpliera todos los criterios necesarios (Dominici *et al.*, 2006; Mota Rodríguez, 2019):

- Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo *in vitro*.
- Expresión específica de marcadores antigénicos de superficie: ≥ 95 % positivas para CD105, CD73 y CD90; y ≤ 2 % negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19, HLA-DR.
- Capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condroblastos.

Por esta razón, las MSCs en cultivo no se utilizaron para el trasplante hasta que no se encontraban en pase 4 (Figura 13).

El mismo día del trasplante se realizó el levantamiento de las células adheridas al plástico añadiendo 5 ml de tripsina-EDTA 0,25 % (v/v) por frasco de cultivo. Este añadido se incubó durante 5 min a 37 °C, y tras este periodo, se añadieron lentamente 10 ml de

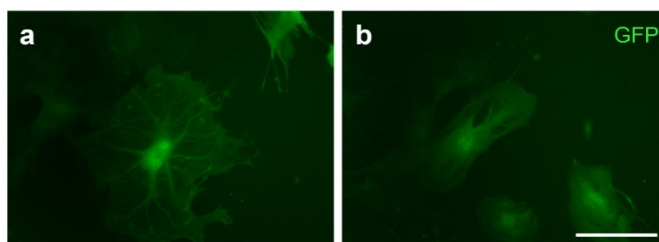


FIGURA 13 | Microfotografías de células mesenquimales en pase 4 en canal Cy2 de epifluorescencia (a, b). Barra de escala: 20 μ m.

medio de cultivo MSCs completo para parar la reacción. A continuación, se recogió toda la suspensión celular en un tubo Falcon de 50 ml y se tomó una alícuota de 20 μ l para el recuento total de MSCs en una cámara Neubauer como se explicó en el apartado anterior. La suspensión se centrifugó a 1.200 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de MSCs en un volumen de PBS variable en función del número de células estimadas en el recuento, de tal forma que 50 μ l contuvieran $2,5 \times 10^5$ MSCs. La dosis y pauta de administración de MSCs se diseñó en base a estudios previos donde se administraban dos dosis de 1×10^6 MSCs en dos semanas consecutivas (Wang *et al.*, 2018). Con el fin de tener un aporte continuo de MSCs, cada dosis semanal de 1×10^6 células se separó en cuatro dosis de $2,5 \times 10^5$ células administradas cada segundo día (ver a continuación).

Administración intravenosa vía plexo retroorbital

Ambos trasplantes, tanto de BMSC como de MSCs, se realizaron por vía intravenosa a través del plexo r.o. (Yardeni *et al.*, 2011). Los animales en los que se realizó un trasplante completo de BMSC recibieron una única inyección r.o. en el seno derecho de $7,5 \times 10^6$ células en un volumen de $70 \mu\text{l}$ a P20 (24 horas post-irradiación). Por su parte, en los animales en los que se realizó un trasplante continuo de MSCs se administraron ocho inyecciones de $2,5 \times 10^5$ células en un volumen de $50 \mu\text{l}$ alternando los senos r.o. derecho e izquierdo a P15, P17, P19, P21, P23, P25, P27 y P29.

A continuación, se detalla la técnica de la administración intravenosa vía plexo r.o. para el lateral derecho. En primer lugar, se indujo la anestesia de los ratones con isoflurano al 5 % (v/v, CAS: 26675-46-7; Provesa, Murcia, España) y se posicionó al animal en decúbito lateral izquierdo sobre una superficie plana. A continuación, se protruyó su ojo derecho ejerciendo una leve presión en la zona superior e inferior del ojo, y se introdujo la aguja de una jeringa de insulina de 0,3 ml, 30G x 0,3 x 8 mm (Becton Dickinson) a través del canto interno (Figura 14), previamente cargada con el volumen de suspensión celular (50 o $70 \mu\text{l}$). Una vez realizada la administración, la aguja se retiró lentamente para evitar el retorno del contenido inyectado. Tras el trasplante, los animales se alojaron en una jaula individual con manta térmica hasta su recuperación total.

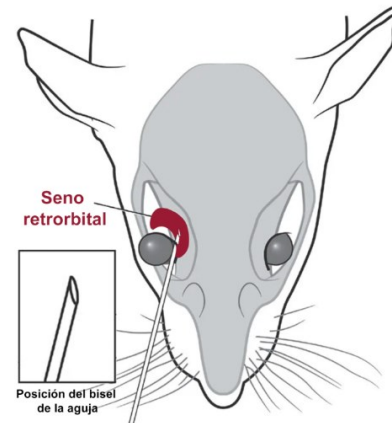


FIGURA 14 | Ruta de administración por vía retroorbital. Modificado de Yardeni *et al.*, 2011.

Debido a la delicadeza de los procedimientos realizados, todos los animales trasplantados recibieron cuidados especiales de mantenimiento y comprobaciones diarias de las condiciones de salud para asegurar su bienestar.

Seguimiento de la incorporación de células derivadas del trasplante

Con el objetivo de conocer el grado de incorporación de las células derivadas del trasplante celular en los animales receptores (concepto denominado como quimerismo), se analizó el porcentaje de células GFP+ en sangre periférica mediante inmunofluorescencia directa y citometría de flujo.

Obtención y preparación de muestras de sangre periférica

En el momento previo al sacrificio de los animales a P30, P35 o P40 (en función del grupo experimental) se tomó una muestra de sangre mediante punción cardiaca, y se recogió en un tubo Eppendorf heparinizado de 1,5 ml de volumen. A continuación, la sangre heparinizada se trasvasó a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 6 ml de tampón de lisis de eritrocitos específico para sangre periférica (ver Apéndice I) y se mantuvo durante 20 min a 4 °C sin agitación. Después, las muestras se centrifugaron a 1.200 r.p.m. durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 100 µl de PBS suplementado con 2 % (v/v) de FBS y se trasvasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Durante el manejo de la sangre periférica fue muy importante mantener la temperatura a 4 °C para evitar la lisis del resto de células sanguíneas.

Inmunofluorescencia directa y adquisición en citómetro de flujo

En todos los análisis de citometría de flujo se incluyó como referencia una muestra control positiva (animal donante GFP) y una muestra negativa (animal WT). Además, para que la adquisición en el citómetro de flujo fuera más precisa, todas las suspensiones celulares se incubaron con el anticuerpo CD45-APC (Becton Dickinson Pharmigen) a una dilución 1:100 en PBS con 2 % (v/v) FBS, durante 60 min a 4 °C y en agitación. Tras la incubación, la suspensión se centrifugó a 1.200 r.p.m. durante 5 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 200 µl de PBS con 2 % (v/v) de FBS. Finalmente, la suspensión celular se pasó a tubos especiales de citometría de flujo y se analizó en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) en el Servicio de Separación Celular de Nucleus de la Universidad de Salamanca. Los resultados obtenidos tras la adquisición se expresaron en porcentaje de células doble positivas para CD45 y GFP.

ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MOTOR, COGNITIVO Y SOCIAL

Con el fin de analizar una posible mejora de las funciones motoras, cognitivas y sociales que se encuentran afectadas en el ratón mutante PCD tras los diferentes tratamientos evaluados, se realizó una batería de pruebas de comportamiento a diferentes edades en función de la estrategia terapéutica empleada: a) P15, P17, P22, P30 y P35 o P40 (en función de la edad de sacrificio) en la estrategia I, b) P22, P30 y P40 en la estrategia II, y c) P22 y P30 en la estrategia III. Todas las pruebas se realizaron en el orden que se describirán a continuación, entre las 9 a. m. y las 2 p. m. con intervalos de descanso

de 5 min entre el final e inicio de pruebas consecutivas, y grabadas con una cámara digital de video para el posterior análisis de las variables de interés. Todos los aparatos y objetos utilizados en las pruebas de comportamiento se lavaron con etanol al 70 % (v/v) antes y después de cada animal y sesión para minimizar la posible influencia de olores en la ejecución de la tarea.

Análisis del comportamiento motor

La prueba de la varilla giratorio o test *Rotarod* se empleó para analizar la habilidad motora de los ratones (Schönfeld *et al.*, 2017; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). El aparato RotaRod LE8200 (Panlab, Barcelona, España) consiste en una barra giratoria moleteada de 3,5 cm de diámetro dispuesta horizontalmente a 25 cm de la base del dispositivo, y con discos separadores perpendiculares a la barra que permiten colocar varios ratones a la vez sin que puedan interactuar entre ellos mientras realizan la prueba (Figura 15). Los ratones se disponen en carriles separados sobre la varilla que gira a una velocidad inicial de rotación constante de 4 r.p.m. Cuando todos los animales caminan sobre la barra, comienza la prueba en la que la velocidad de rotación irá aumentando de 4 a 40 r.p.m. en 10 min, es decir, con una aceleración de 3,6 r.p.m./min (0,06 r.p.m./s). El ratón deberá desplazarse en el sentido opuesto al giro de la varilla para evitar caerse. Cuando un ratón cae, acciona una plataforma basculante que se encuentra en la base del dispositivo, lo que permite registrar la velocidad máxima de rotación del rodillo y el tiempo que tardó en caerse de la barra (tiempo de latencia) de forma independiente para cada sujeto experimental. Cada animal realizó esta prueba 7 veces con intervalos de descanso de 10-15 min cada uno de los días en que se realizaron las pruebas de comportamiento, y se calculó la media de estos siete valores para la variable latencia a la caída para cada animal y edad analizada.

Análisis del comportamiento general

El comportamiento general de los ratones se evaluó en jaulas estandarizadas de mantenimiento Sealsafe modelo 1285L cubiertas con 1.5 cm de viruta Safe Selet fine (Safe Bedding, Rosenberg, Alemania). Para cada animal se asignó una jaula el primer día de las pruebas, y esta se mantuvo hasta el final del periodo experimental, evitando así el posible estrés causado por la adaptación de los animales a ambientes nuevos y la influencia de olores de otros ratones. Cada día de la prueba, el animal se situó en el centro de la jaula y tras 10 min de habituación se grabó el comportamiento libre durante otros 10 min. A continuación, se analizó el tiempo dedicado a la realización de diferentes conductas

relacionados con el comportamiento general de roedores: limpiezas (conducta innata estereotipada), alzadas (comportamiento explorador), desplazamiento (movimiento general), actividad y descanso (Figura 15). Los variables analizadas se escogieron en base a estudios previos sobre el comportamiento general del ratón PCD (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

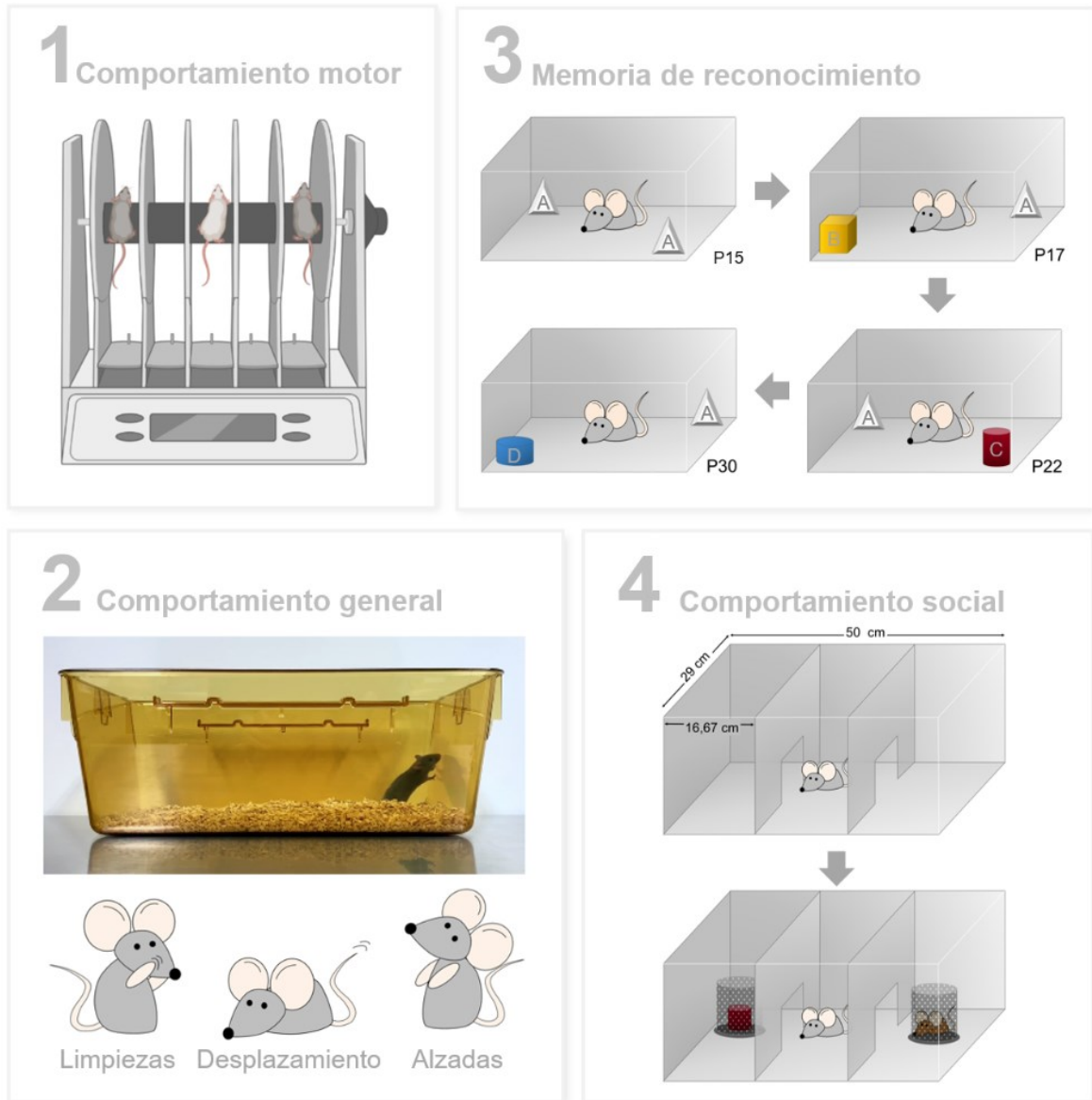


FIGURA 15 | Representación gráfica de las pruebas de comportamiento en el orden cronológico en el que se realizaron.

Análisis de la memoria de reconocimiento

La prueba NOR se empleó para analizar la memoria de reconocimiento de los ratones (Ennaceur y Delacour, 1988; Ennaceur, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Esta prueba se llevó a cabo en la misma jaula en la que se evaluó el comportamiento general, evitando

así cualquier estrés derivado de los cambios del entorno. El primer día de la prueba, se colocaron dos objetos idénticos (A-A) en esquinas opuestas de la diagonal de la jaula y se introdujo el animal en el centro de esta permitiendo que explorase los objetos durante 10 min. En los días siguientes se mantuvo siempre uno de los objetos empleados en el primer día (A, denominado “objeto familiar”) y se introdujo un objeto diferente en cada una de las edades siguientes de experimentación (B, C, D y E, denominados “objetos novedosos”; Figura 15). La prueba consistió en la exploración libre por parte del animal de ambos objetos durante 10 min, considerándose exploración efectiva cuando el ratón se situaba a una distancia menor de 2 cm del objeto familiar o novedoso. Todos los objetos estaban fabricados en plástico y presentaban diferentes formas y colores, pero igual tamaño y textura. Para cada edad de análisis de la memoria de reconocimiento, la posición del objeto familiar y novedoso se contrabalanceó en esquinas opuestas con el objetivo de evitar la influencia de la memoria espacial en la ejecución de la prueba (Ennaceur y Delacour, 1988; Ennaceur, 2010).

La memoria de reconocimiento se evaluó mediante dos medidas diferentes para cada ratón y edad analizada. La primera medida fue el porcentaje de tiempo de exploración del objeto novedoso (T_N) y el porcentaje de tiempo de exploración del objeto familiar (T_F), calculados mediante las siguientes fórmulas:

$$\% T_N = T_N / (T_N + T_F) ; \% T_F = T_F / (T_N + T_F)$$

De forma general, los ratones como animales exploradores tienden a pasar más tiempo explorando objetos novedosos en contraposición a los objetos familiares. Por el contrario, en los animales en los que el porcentaje de tiempo de exploración del objeto familiar sea mayor o igual que el de exploración del objeto novedoso, la memoria de reconocimiento se encuentra afectada (Ennaceur y Delacour, 1988; Antunes y Biala, 2012).

La segunda medida fue el índice de discriminación (DI^{39} ; (Ennaceur, 2010), calculada mediante la siguiente fórmula:

$$DI = (T_N - T_F) / (T_N + T_F)$$

Este índice representa la capacidad de discriminación entre objetos novedosos y familiares, y puede variar entre +1 y -1 en función de T_N y T_F . Los valores de $DI > 0$ (positivos) indican preferencia del animal por la exploración del objeto novedoso, y por lo

³⁹ Del inglés *Discrimination Index*

tanto, discriminación entre objetos familiares y novedosos. Por el contrario, los valores de $DI \leq 0$ (negativos o iguales a 0) indican una ausencia de discriminación, y por lo tanto afectación de la memoria de reconocimiento.

Análisis del comportamiento social

La prueba de preferencia social permite evaluar la preferencia por la interacción social de los roedores en contraposición de la interacción no-social (Moy *et al.*, 2004). Esta prueba se llevó a cabo en una caja blanca de Plexiglas (dimensiones: 50 x 29 cm) dividida en tres compartimentos comunicados entre sí de igual tamaño (29 x 16,67 cm). Tras un periodo de adaptación de 10 min donde el animal explora libremente el entorno de la caja, este se retira y se colocan otro animal del mismo sexo y edad similar al que está realizando la prueba en uno de los compartimentos laterales (estímulo social) y un objeto similar a los utilizados en la prueba NOR en el compartimento lateral opuesto (estímulo no social). Tanto el animal como el objeto se encuentran en el interior de un recipiente fenestrado que permite la interacción sensorial del sujeto que está siendo evaluado con cualquiera de los dos estímulos, social o no-social, pero evita la interacción física directa (Figura 15). La prueba consistió en la exploración libre de los compartimentos de la caja durante 10 min. Para cada edad de análisis de la preferencia social, se contrabalanceó la posición del estímulo social y no-social en los compartimentos laterales con el objetivo de evitar la influencia de la memoria espacial en la ejecución de la prueba (Moy *et al.*, 2004).

Al igual que en el test NOR, la preferencia por la interacción social se evaluó mediante dos medidas diferentes para cada ratón y edad analizada. En primer lugar, se midió el porcentaje de tiempo de exploración en el compartimento donde se localizaba el estímulo social (T_A) y el porcentaje de tiempo de exploración en el compartimento donde se encontraba el estímulo no-social (T_O), calculados mediante las siguientes fórmulas:

$$\% T_A = T_A / (T_A + T_O) ; \% T_O = T_O / (T_A + T_O)$$

Los ratones, como animales sociales, tienden a interactuar con sus congéneres en contraposición con otros estímulos, por lo que cabe esperar un mayor porcentaje de tiempo explorando el estímulo social comparado con el porcentaje de tiempo explorando el estímulo no-social. Por el contrario, los resultados en los que el porcentaje de interacción con el estímulo no-social es mayor o igual que el correspondiente al estímulo social indican un déficit en el comportamiento social.

De forma análoga al DI, se calculó el índice de sociabilidad (SI⁴⁰; Pérez-Martín *et al.*, 2021) mediante la siguiente fórmula:

$$SI = (T_A - T_O) / (T_A + T_O)$$

Este índice representa la preferencia social de los ratones analizados y también puede variar entre +1 y -1 en función de T_O y T_A . Los valores de SI positivos indican preferencia por la interacción social, los valores negativos indican evitación de la interacción social, y los próximos a 0 evidencian una ausencia de preferencia con respecto a la sociabilidad.

ANÁLISIS ELECTROFISIOLÓGICO

Con el fin de analizar el funcionamiento global del cerebelo y, en particular, el de las células de Purkinje en ratones PCD tras el tratamiento con OEA, se analizó la actividad electrofisiológica *in vivo* de los NCP y de las células de Purkinje en animales despiertos con la cabeza fija en un aparato estereotáctico a $P25 \pm 1$ día y $P30 \pm 1$ día. Estos experimentos se desarrollaron en una estancia de investigación internacional durante los meses de septiembre a diciembre del año 2021 bajo la supervisión del Dr. Kamran Khodakhah en el Centro de Investigación *Albert Einstein College of Medicine* (Nueva York, EE. UU.).

La actividad neuronal se evaluó a través de tres variables: a) frecuencia media de disparo o número total de disparos en un periodo de tiempo determinado, b) frecuencia predominante de disparo o moda de la distribución de los intervalos entre disparos, y c) coeficiente de variación del intervalo entre disparos (ISI CV⁴¹). El ISI CV indica la regularidad de los disparos de una neurona y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$ISI\ CV = \sigma\ ISI / M\ ISI$$

Donde $\sigma\ ISI$ y $M\ ISI$ son la desviación estándar y la media del intervalo entre disparos.

De esta forma, cuanto mayor es el valor del ISI CV, más irregular es su patrón de disparo (Tara *et al.*, 2018; Washburn *et al.*, 2019; Snell *et al.*, 2022). Según estudios previos, existe una correlación directa entre el ISI CV y la gravedad de síntomas motores como la ataxia en modelos de afectación cerebelosa (Walter *et al.*, 2006; Washburn *et al.*, 2019;

⁴⁰ Del inglés *Sociability Index*

⁴¹ Del inglés *Inter-Spike Interval Coefficient of Variation*

Snell *et al.*, 2022). Por ello, el uso de este parámetro es de gran utilidad como indicador del buen o mal funcionamiento del cerebelo en su conjunto.

Ajuste de las coordenadas estereotácticas

Para la realización de las cirugías estereotácticas previas al registro neuronal, así como para el propio registro electrofisiológico, es imprescindible conocer la localización específica de la región de interés en los ejes anteroposterior, dorsoventral y lateral respecto a los puntos craneométricos de referencia *bregma* y *lambda* (Figura 16). Para ello existen atlas de coordenadas estereotácticas específicas entre los que destaca el atlas del cerebro adulto de ratón de Paxinos y Franklin, por ser uno de los más precisos y utilizados (Franklin y Paxinos, 2008). Sin embargo, este atlas presenta limitaciones en estudios que implican ratones jóvenes, puesto que está realizado basándose en secciones coronales de ratones adultos C57BL/6J de 26 a 30 g de peso corporal. Así, las coordenadas estereotácticas mostradas en este atlas no se corresponden de forma precisa con la localización exacta de la región de interés en ratones de diferente peso corporal al mencionado. Por ello, con el fin de solventar esta limitación, se diseñó un ajuste proporcional de las coordenadas estereotácticas de los NCP de adulto usando como referencia la distancia real entre *bregma* y *lambda* específica e individual de cada ratón, como se muestra en la Figura 16. Básicamente, se realizaron las proporciones correspondientes teniendo en cuenta que, según el atlas de Paxinos y Franklin, en ratones adultos la distancia entre *bregma* y *lambda* es de 4,21 mm, y las coordenadas estereotácticas de los NCP son -6,24 mm en el eje anteroposterior (y) desde *bregma*, $\pm 1,75$ mm en el eje mediolateral (x) desde la línea media, y entre -1,8 a -2,1 mm en el eje dorsoventral (z) desde la superficie del encéfalo.

Con el fin de comprobar la bondad de este ajuste de las coordenadas estereotácticas, se realizaron inyecciones intracerebelosas de 10 nl de trazador CTB⁴² conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 555 (Invitrogen) a una velocidad de 1nl/s con un nanoinyector automático Nanoject III (Drummond Scientific, Broomall, PA, EE. UU.) en cuatro ratones WT de 10 g de peso corporal (similar al de ratones PCD de tres semanas de edad). Para la realización de las inyecciones intracerebelosas se realizó una cirugía estereotáctica similar a la que se detallará en el apartado siguiente. Inmediatamente después de la inyección, se sacrificaron los animales mediante perfusión intracardiaca (ver más adelante) para evitar la

⁴² Del inglés *Cholera Toxin Subunit B*

difusión del trazador. Tras ello, se seccionó el cerebelo en cortes coronales de 30 μm de grosor en un criostato NX70 (ThermoFisher Scientific; ver más adelante) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia. Puesto que todas las inyecciones realizadas se localizaron en la región de interés (ver Resultados), el ajuste de las coordenadas se consideró válido y se empleó en todas las cirugías estereotácticas.

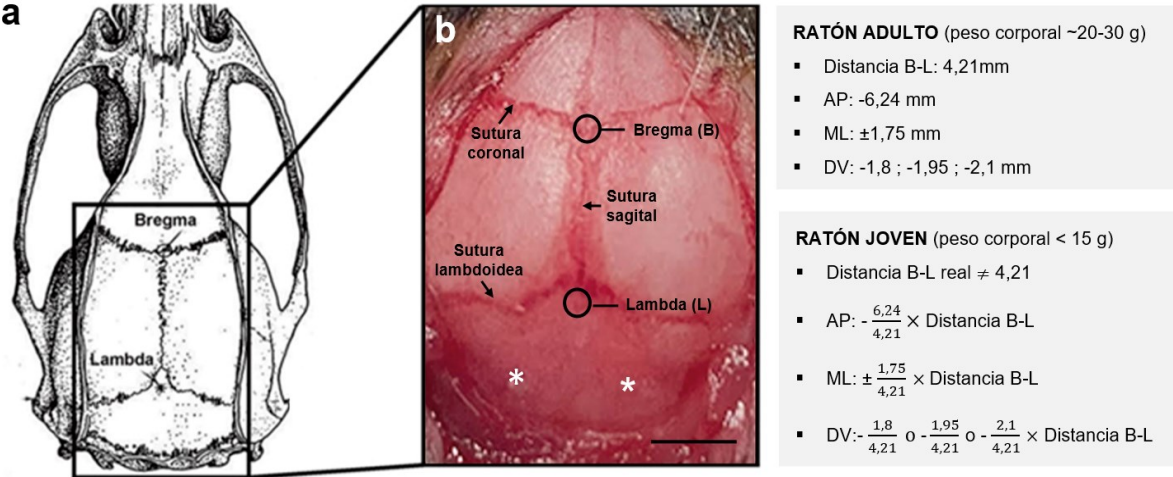


FIGURA 16 | Ajuste de las coordenadas estereotácticas del atlas de Paxinos y Franklin para ratones jóvenes (<15 g de peso corporal). (a) Ilustración de la vista dorsal del cráneo de un roedor. (b) Vista dorsal real del cráneo de un ratón a P25, los asteriscos indican la localización de los núcleos cerebelosos profundos (NCP). AP, anteroposterior, B, bregma, DV, dorsoventral, L, lambda, ML, mediolateral. Barra de escala: 2 mm.

Cirugía estereotáctica e implantación de soportes de sujeción

Un día antes del registro electrofisiológico, es decir, a P24 o P29, se realizó la cirugía para localizar las coordenadas estereotácticas de los NCP, implantar el soporte de sujeción y realizar las craneotomías correspondientes en los animales de experimentación (Figura 17). Este soporte de sujeción se fija al cráneo del animal como veremos a continuación, y permite inmovilizar al sujeto experimental a un marco estereotáctico para poder registrar la actividad neuronal *in vivo* sin la necesidad de anestésiar al animal.

En primer lugar, se indujo la anestesia con isoflurano al 5 % (v/v; Covetrus, Portland, ME, EE. UU.) y oxígeno al 1,5 % (v/v). Tras comprobar la ausencia de reflejos podal y de la compresión de la cola, los animales se colocaron en un aparato estereotáctico modelo 940-C (David Kopf Instruments, Tujunja, CA, EE. UU.) adaptado para roedores de pequeño tamaño y se mantuvo la anestesia con isoflurano al 1,5 % (v/v) durante toda la cirugía. Tras aplicar gel oftálmico Puralube (Dechra Veterinary Products, Northwich, Reino Unido) en los ojos, se desinfectó la parte superior de la cabeza del animal con etanol al 70 % (v/v) y povidona-yodada Betadine quirúrgico 7,5 % (v/v; Avrio Health, Stamford, CT, EE. UU.), se

afeitó la zona a operar, y se expuso la superficie del cráneo mediante una incisión en la piel a lo largo de la línea media. A continuación, se retiró la piel y el periostio hacia los laterales con la ayuda de una cureta quirúrgica, y se limpió la superficie del cráneo con etanol al 70 % (v/v) con el fin de facilitar la identificación de los puntos craneométricos y suturas craneales de referencia. Tras alinear correctamente el cráneo del animal con el aparato estereotáctico, se midió la distancia entre *bregma* y *lambda*, se ajustaron las coordenadas estereotácticas de los NCP y se realizó una pequeña muesca en el cráneo mediante el uso de un microtaladro quirúrgico modelo Marathon N8S03 (Saeyang, Daegu, Corea del Sur), sin llegar a perforarlo completamente (Figura 17 b). A continuación, tras aplicar una capa fina del adhesivo Optibond (Kerr Dental, Brea, CA, EE. UU.) y de composite Charisma (resina compuesta especial de fijación; Kulzer, Tokio, Japón), se posicionó el soporte de sujeción adaptado a roedores de pequeño tamaño en la parte frontal del cráneo y se fotopolimerizó el composite con una lámpara UV Coltolux LED modelo C7990 (Coltene, Altstätten, Suiza) para fijarlo al cráneo. En estudios previos (Tara *et al.*, 2018; Washburn *et al.*, 2019), los soportes de fijación al marco estereotáctico estaban compuestos de platino o titanio y presentaban la forma que se muestra en la Figura 17 a; sin embargo, debido al pequeño tamaño de los ratones PCD y la flexibilidad del cráneo a la edad de las cirugías, fue necesario modificar la forma y el material de construcción de los soportes. Para ello, en colaboración con el Servicio de Análisis Gráfico e Imagen del Departamento de Neurociencias del *Albert Einstein College of Medicine*, se diseñaron unos soportes de sujeción empleando el software Simplify3D (Cincinnati, OH, EE. UU.), para conseguir una mejor adaptación al cráneo de animales jóvenes y para que fueran más ligeros (Figura 17 b). El material de impresión que se empleó fueron filamentos de ácido poliláctico y la impresora 3D modelo FlashForge Creator Pro (Flashforge, Zhejiang, China).

Una vez polimerizado el composite, se aplicó cemento dental (M&S Dental Supply, Jamaica, NY, EE. UU.) en la parte frontal del soporte y en la parte posterior del cráneo, formando una ventana de registro de aproximadamente 5 mm de diámetro alrededor de las muescas realizadas previamente y donde se abrieron dos craneotomías de 2 mm de diámetro completas con el uso de un microtaladro quirúrgico. Una vez limpiada la zona con NaCl 0,9 % (p/v), la ventana de registro se cubrió completamente con silicona de baja toxicidad Kwik-Sil (World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE. UU.) para proteger el tejido cerebral expuesto en las craneotomías y mantenerlo húmedo hasta el momento en el que se realizase el registro electrofisiológico. Durante todo el procedimiento quirúrgico, se monitorizaron continuamente las constantes vitales y el grado de anestesia de los animales.

Una vez finalizada la cirugía, se les administró por vía subcutánea 100 μ l NaCl 0,9 % (p/v) y Flunixin Flunazine 0,25 mg/kg (Bimeda, Oakbrook Terrace, IL, EE. UU.) en un volumen de 10 μ l/g (peso del animal) como fármaco antiinflamatorio y analgésico. A continuación, los animales se alojaron en jaulas individuales con una manta térmica. Tras su recuperación, se sometieron a un primer periodo de adaptación de una hora de duración en el marco estereotáctico utilizado para los registros electrofisiológicos (Figura 17 c), con el objetivo de disminuir el estrés por restricción de movimiento durante dichos registros.

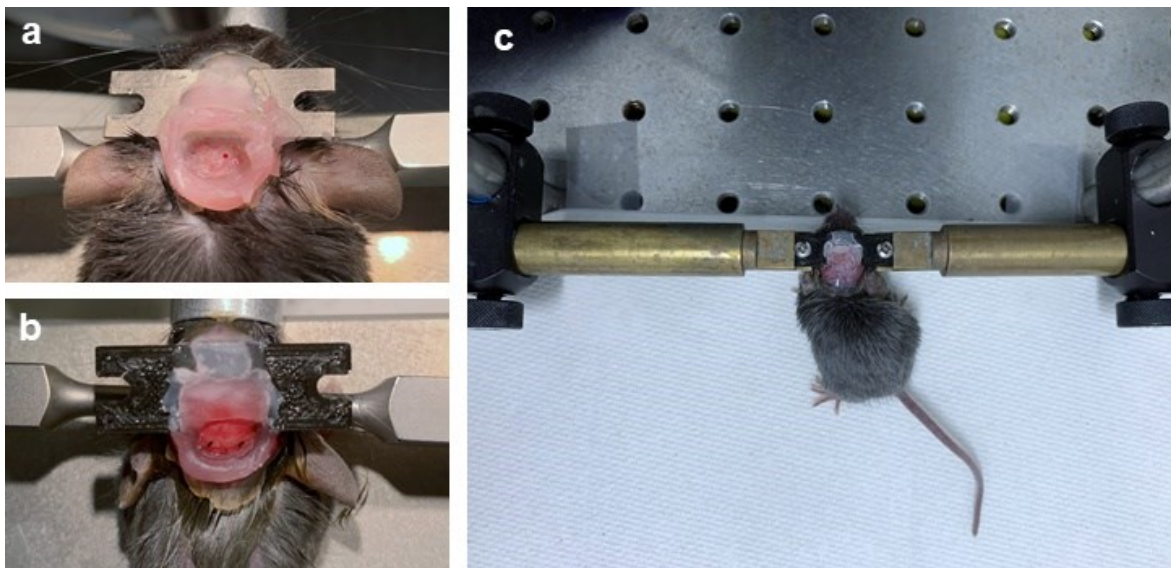


FIGURA 17 | Implantación de los soportes de fijación y marco estereotáctico de registro. (a-b) Ejemplo de soporte de sujeción realizado en platino (a) para ratones adultos, y en ácido poliláctico mediante impresión 3D (b) para ratones jóvenes. En la imagen a se observa una craneotomía completa de los NCP derechos, y en la imagen b dos muescas en la localización de ambos NCP. (c) Vista superior de las barras de fijación del marco estereotáctico para registros electrofisiológicos.

Registro electrofisiológico *in vivo*

El registro de la actividad neuronal se realizó en animales despiertos inmovilizados mediante la fijación del soporte de sujeción implantado en el cráneo al marco estereotáctico de registro (Figura 17 c). Cada animal fue registrado durante 6-7 horas diarias, dos días consecutivos, con el fin de utilizar las dos craneotomías realizadas. Para reducir el estrés, 30-60 min antes del experimento, los animales se colocaron en el marco estereotáctico de registro para su adaptación al equipo experimental y a la restricción de movimiento. A continuación, se retiró la silicona protectora, y se llenó la ventana de registro con NaCl 0,9 % (p/v). Como referencia eléctrica, se colocó un cable directamente en la solución salina que bañaba las craneotomías.

En concreto se realizaron registros extracelulares de actividad única de las células de Purkinje y de los NCP con electrodos de tungsteno (2-3 M Ω ; Thomas Recordings GmbH, Giessen, Alemania). Las células de Purkinje se identificaron por la localización del registro, la presencia de disparos complejos y la frecuencia de disparo, mientras que las neuronas de los NCP se identificaron principalmente por la localización del registro en el eje dorsoventral (Hoebeek *et al.*, 2008). Cada célula detectada fue registrada durante al menos 5 min. Las señales neuronales fueron filtradas a 200 Hz-20 kHz, amplificadas 2000 veces, y digitalizadas a 20 kHz utilizando un sistema de adquisición de datos Purkinje Cell-MIO-16-XE (National Instruments, Austin, TX, EE. UU.) y un software personalizado programado en Labview (National Instruments). A continuación, se realizó el procesamiento y filtrado de los datos adquiridos con el software Offline Sorter (Plexon, Dallas, TX, EE. UU.) utilizando parámetros como la amplitud, energía y análisis de componentes principales. Por último, la lectura final de los datos filtrados y la obtención de las variables de interés se realizó en un software personalizado codificado en Labview.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Obtención y preparación del tejido

Para los análisis histológicos de la presente Tesis Doctoral, los tiempos de supervivencia y edades de sacrificio de los animales variaron en función del experimento realizado y el objetivo del análisis, tal y como se ha recogido en la Tabla 4 y como se resumirá a continuación.

En la estrategia terapéutica I, los animales utilizados para la optimización de la ventana temporal terapéutica de la OEA y para evaluar su efecto neuroprotector a corto plazo se sacrificaron a P30, momento en el que la degeneración cerebelosa de las células de Purkinje del ratón PCD afecta a todos los lóbulos del vermis excepto a la región ventral del mismo (lóbulo X; Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Estos mismos animales se emplearon para el análisis del efecto inmunomodulador de la OEA sobre la microglía cerebelosa y la infiltración leucocitaria del ratón PCD. Los animales usados para evaluar el efecto del tratamiento farmacológico más efectivo de OEA a medio-largo plazo se sacrificaron a P40, momento en el que todos los lóbulos del vermis han degenerado y solo sobrevive alguna célula de Purkinje aislada en el lóbulo X (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007).

En la estrategia terapéutica II, los animales utilizados para evaluar el efecto neuroprotector de la terapia combinada de OEA y trasplante completo de BMSC se sacrificaron a tres edades distintas: P30, P35 y P40. El objetivo fue analizar la evolución temporal del trasplante y comparar los resultados con los datos previos obtenidos en la estrategia terapéutica I.

Por último, en la estrategia terapéutica III, los animales empleados para evaluar el efecto neuroprotector de la terapia combinada de OEA y trasplante continuo de MSCs se sacrificaron a P30. De esta manera, los datos obtenidos se pudieron comparar con los de las estrategias I y II previas.

Sacrificio y disección

A excepción de los animales donantes de médula ósea y los utilizados para el análisis molecular del efecto de la OEA (ver más adelante), los animales se sacrificaron por exanguinación previa anestesia mediante la inyección i.p. de hidrato de cloral al 5 % (p/v; Sigma-Aldrich) en un volumen de 10 μ l/g (peso del animal). El efecto del anestésico se comprobó mediante la ausencia del reflejo palpebral, podal y de compresión de la cola. A continuación, se administraron 100 μ l de heparina sódica (1.000 U/ml; Sigma-Aldrich) vía intraaórtica a través del ventrículo izquierdo del corazón. Seguidamente, los ratones se perfundieron vía intracardiaca con una solución de lavado compuesta por NaCl 0,9 % (p/v) durante 1 min, seguido de una solución fijadora (Fijador de Somogyi modificado sin glutaraldehído; ver Apéndice I) compuesta por paraformaldehído al 4 % (p/v; Panreac) y ácido pícrico saturado al 15 % (v/v; Panreac) en tampón fosfato 0,1 M, a pH 7,4 (PB⁴³), durante 15 min. Para la perfusión se empleó una bomba peristáltica Minipuls 3 modelo M312 (Gilson, Middleton, WI, EE. UU.) con un flujo constante de 6 a 9 ml/min (en función del peso corporal del animal).

Posteriormente se extrajo el encéfalo completo de cada animal y se dividió en tres bloques (rostral, medial y caudal) mediante cortes coronales en una matriz de cerebro de ratón (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.). Los bloques se mantuvieron en postfijación en la misma solución fijadora durante 2 horas, en agitación y temperatura ambiente. A continuación, las piezas de tejido se lavaron con PB hasta eliminar el exceso de fijador, y se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % (p/v; Panreac) en PB, manteniéndose durante 3 a 5 horas en agitación a 4 °C hasta que se

⁴³ Del inglés *Phosphate Buffer*

hundieron completamente. Por último, los bloques se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a - 80 °C hasta el momento de su procesamiento.

En los animales que recibieron cualquiera de los dos tratamientos combinados, también se diseccionaron los ojos, médula espinal, corazón, pulmón, hígado, intestino delgado, riñón y una biopsia de músculo esquelético para un posible análisis posterior. Todos los órganos se procesaron como se ha indicado anteriormente y se almacenaron a - 80 °C.

Seccionamiento

Los análisis histológicos de la presente Tesis Doctoral se realizaron en su gran mayoría en secciones parasagitales del cerebelo de 30 μm de grosor mediante el uso de un microtomo de deslizamiento modelo Jung SM 2000 (Leica Instruments, Wetzlar, Alemania) acoplado a una unidad de congelación "Frigomobil" (Leica Instruments), a una temperatura entre -22 y -10 °C. Las secciones obtenidas se recogieron en flotación en PB de forma seriada en placas multipocillo 6x4 (VWR International, Radnor, PA, EE. UU.). A continuación, se realizaron lavados de las secciones en PB (3 x 10 min) para eliminar los restos del fijador y sacarosa, y estos se almacenaron a - 20 °C en una mezcla congeladora compuesta por glicerol al 30 % (v/v; VWR Chemicals) y polietilenglicol al 30 % (v/v; VWR Chemicals) en PB hasta su procesamiento histológico.

Para la comprobación de la localización de las coordenadas estereotácticas ajustadas del atlas de Paxinos y Franklin, los cerebelos de los animales se seccionaron en cortes coronales de 30 μm de espesor mediante el uso de un criostato NX70 (ThermoFisher Scientific), a una temperatura entre -22 y -18 °C. En este caso, los encéfalos crioprottegidos se embebieron en medio Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Tokio, Japón) en un molde de encastrado y se congelaron en un tanque de hielo seco. Tras tallar cada muestra y disponerla correctamente en el criostato, se realizaron secciones seriadas que fueron recogidas directamente sobre portaobjetos. Debido a que estos animales habían recibido inyecciones intracerebelosas de CTB conjugado con un fluorocromo Alexa 555, los lugares de inyección podían visualizarse macroscópicamente por lo que únicamente se recogieron las secciones en las que el trazador estaba presente. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente durante dos horas, y a continuación, se añadió

medio de montaje Fluoromount-G con DAPI⁴⁴ incluido (ThermoFisher Scientific) para obtener una contratinción nuclear y poder identificar las regiones de interés en las secciones en el microscopio de epifluorescencia.

Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección y caracterización de diferentes tipos neuronales y gliales basándonos en la expresión de epítomos antigénicos característicos, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En primer lugar, las secciones almacenadas a - 20 °C se lavaron en PBS a temperatura ambiente (3 x 10 min) para retirar los restos de mezcla congeladora. Tras ello se incubaron en agitación constante con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 5) diluidos en PBS con suero normal de burro al 5 % (v/v) y Tritón X-100 al 0,2 % (v/v) durante 72 horas a 4 °C. A continuación, las secciones se lavaron en PBS (3 x 10 min) y se incubaron en agitación en el antisuero secundario que contenía los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 5) diluidos a 1:500 en PBS, durante una hora y media a temperatura ambiente y oscuridad. Quince min antes de la incubación con el antisuero secundario se añadió DAPI (Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:10.000 para contrateñir los núcleos celulares. Tras lavar las secciones de nuevo con PBS (3 x 10 min), se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron usando un medio antidesvanecimiento que contenía glicerol al 70 % (v/v), n-propil-galato al 5 % (p/v), glicina al 0,42 % (v/v) y azida al 0,03 % (p/v; ver Apéndice I).

TABLA 5 | Relación de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la técnica de inmunofluorescencia indirecta

Anticuerpo primario	Especie	Origen	Dilución	Anticuerpo secundario*
Calbindina	Ratón	Swant	1:2.000	Anti-IgG de ratón Cy3 o Cy2
CD16/32	Rata	BD	1:200	Anti-IgG de rata Cy3
CD206	Cabra	R&D Systems	1:200	Anti-IgG de cabra Cy2
CD45	Rata	Bio-Rad Laboratories	1:1.000	Anti-IgG de rata Cy2
GFP	Cabra	Abcam	1:2.000	Anti-IgG de cabra Cy2
Iba1	Conejo	Wako Pure Chemical Industries	1:1.000	Anti-IgG de conejo Cy3

*Todos los anticuerpos secundarios estaban producidos en burro

Para todos los análisis histológicos cuantitativos se emplearon cuatro secciones de vermis cerebeloso separadas por 180 µm de distancia para cada animal. En el caso de los animales trasplantados, se emplearon todas las secciones contenidas en los cuatro pocillos

⁴⁴ 4',6-diamidino-2-fenilindol

de una misma columna de la placa multipocillos para tener una representación seriada del cerebelo incluyendo hemisferios y vermis.

Controles de especificidad

Con el fin de comprobar la especificidad de los anticuerpos empleados en la técnica de inmunofluorescencia, se utilizaron los siguientes controles:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios al tejido analizado.
- Omisión de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos para detectar emisión de fluorescencia inespecífica o autofluorescencia del tejido.
- En las dobles inmunofluorescencias se incubaron las secciones con cada uno de los anticuerpos primarios por separado y se añadió el anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo primario contrario para detectar posibles reacciones cruzadas.
- Como control negativo de los anticuerpos para la proteína GFP se emplearon secciones de cerebelo de ratón WT sin ningún tipo de tratamiento.

En ninguna de las comprobaciones anteriores se detectaron falsos positivos por uniones inespecíficas.

Visualización al microscopio y análisis de las imágenes

Las secciones se observaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus Provis AX70 acoplado a una cámara digital Olympus DP70 (12,5MP; Olympus, Tokio, Japón). En función de las variables analizadas, estas se cuantificaron directamente en el microscopio o se capturaron imágenes digitales para su posterior procesamiento y análisis, con los softwares Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Inc., San José, CA, EE. UU.), ImageJ (NIH, WI, EE. UU.) o NeuroLucida (MBF Bioscience, Williston, VT, EE. UU.).

Cuantificación de las variables histológicas

El efecto neuroprotector de las diferentes terapias evaluadas se analizó a nivel histológico a través de diferentes variables relacionadas con: a) la morfología de las células de Purkinje (área del soma, longitud y grosor de la dendrita primaria y longitud del árbol dendrítico), y b) densidad lineal de las células de Purkinje respecto a la longitud de su correspondiente capa cerebelosa (Figura 18). Para la obtención de las variables

morfológicas se empleó el software ImageJ, mientras que el recuento celular de células de Purkinje se realizó manualmente mediante el uso del software Neurolucida (Apéndice I).

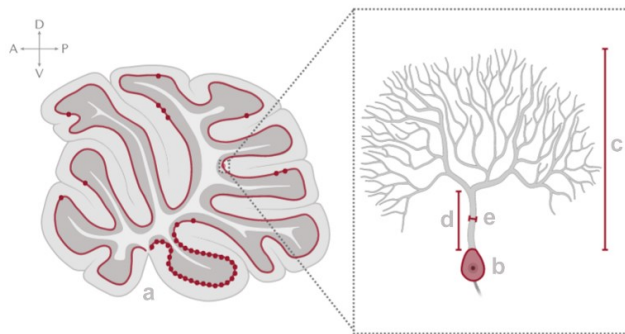


FIGURA 18 | Representación gráfica de las variables analizadas para la evaluación del efecto neuroprotector de las diferentes terapias en el cerebelo: (a) densidad lineal de células de Purkinje, (b) área del soma, (c) longitud del árbol dendrítico, (d) longitud de la dendrita primaria y (e) grosor de la dendrita primaria. A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral. Creado con BioRender.com.

Para evaluar el efecto inmunomodulador del tratamiento con OEA en el cerebelo, se cuantificaron: a) los cambios en la densidad de la microglía (células Iba1+/mm²), y b) los cambios en el porcentaje de expresión de diferentes marcadores fenotípicos de microglía (CD16/32, CD206, CD45) respecto a la microglía total (células Iba1+ y el marcador CD correspondiente/células Iba1+). Además, también se cuantificó el reclutamiento de leucocitos periféricos hacia el parénquima cerebeloso (células redondeadas o con forma de bastón CD45^{high}/mm²). Los recuentos celulares se realizaron manualmente, mientras que el análisis de las áreas correspondientes a cada región de interés se midió con el software ImageJ.

En general, todos los recuentos celulares y las variables cuantificadas se realizaron teniendo en cuenta el vermis cerebeloso completo (lóbulos I al X), y separado por lóbulos (lóbulos del I al IX vs. Lóbulo X). Los análisis donde se tuvo en cuenta la distribución celular por capas de la corteza cerebelosa (CM + CCP vs. CG) se indicará específicamente en la correspondiente sección de resultados.

ANÁLISIS MOLECULAR

Para el análisis molecular del efecto de la OEA se analizaron cambios en la expresión génica de diferentes factores proinflamatorios, neurotróficos y relacionados con la activación de los receptores PPAR α (ver más adelante), a corto (3- y 24-horas postratamiento con OEA), medio (P20) y largo plazo (P30). En los experimentos a corto plazo se emplearon únicamente animales WT puesto que a la edad del análisis (P12-13) no existen diferencias entre ellos y los mutantes PCD (Landis y Mullen, 1978; Wang y

Morgan, 2007). Para el análisis a medio y largo plazo se emplearon tanto ratones WT como animales mutantes PCD.

Extracción de muestras en fresco

Todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Después, se extrajo cuidadosamente el encéfalo y se diseccionó el cerebelo seccionándolo a su vez por la línea media sagital, para obtener por separado los dos hemisferios cerebelosos con su correspondiente área de vermis como se muestra en la Figura 19. Durante todo este proceso, el tejido se mantuvo en solución salina estéril a una temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se empleó material quirúrgico previamente esterilizado para desnaturalizar las ribonucleasas ($230\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora).

Inmediatamente después de la disección, las diferentes regiones se congelaron por separado en un tanque de nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior procesamiento entre 1 y 10 días tras la extracción.

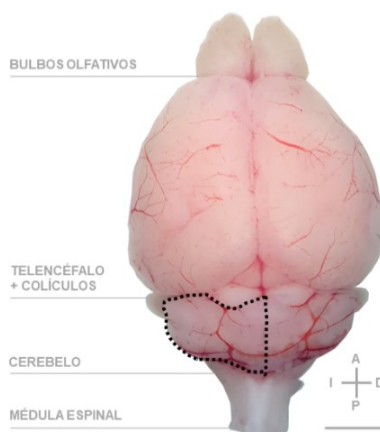


FIGURA 19 | Vista dorsal del encéfalo de un animal WT extraído en fresco. En línea punteada está indicada la región específica del cerebelo que se empleó para los análisis moleculares. A, anterior, D, derecha, I, izquierda, P, posterior. Barra de escala: 2 mm.

Aislamiento y purificación del RNA total

Los cambios en la expresión génica se evaluaron mediante la detección de variaciones en la cantidad de RNA mensajero (mRNA) de los genes de interés. Para ello, se aisló y purificó el RNA total de la mitad izquierda del cerebelo mediante el kit comercial de extracción por columnas PureLink RNA Mini Kit y PureLink DNase Set (Invitrogen). En primer lugar, el tejido se lisó en $600\text{ }\mu\text{l}$ de tampón de lisis comercial con 1% (v/v) de β -mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories) para eliminar las ribonucleasas liberadas durante la lisis celular y se homogeneizó automáticamente con el dispersor Ultra Turrax T-10 Basic (IKA, Staufen, Alemania). Tras ello se realizaron tres disgregaciones mecánicas del homogeneizado en una jeringa de insulina ($0,5\text{ ml}$, $30\text{G} \times 0,3 \times 8\text{ mm}$), y se siguió el protocolo estandarizado del kit comercial. La cantidad y calidad del RNA total extraído se

cuantificó en un nanospectrofotómetro UV/Vis P-Class (Implen, Múnich, Alemania) y se almacenó a - 20 °C o - 80 °C, en función de la proximidad de su uso.

Obtención del DNA complementario

Una vez obtenido el RNA total de todas las muestras y grupos experimentales, se llevó a cabo la retrotranscripción de 1000 ng de RNA de cada una de ellas con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Mediante la retrotranscripción conseguimos obtener cadenas de DNA complementario (cDNA) a partir de las moléculas de mRNA presentes en las muestras, que se amplificaron y cuantificaron mediante la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR) como veremos más adelante. El medio para la retrotranscripción contenía: tampón comercial de la transcriptasa reversa 2X, desoxinucleótidos trifosfato 8 mM, *primers* o cebadores aleatorios de retrotranscripción 2X, transcriptasa reversa 5U/μl, 1000 ng de RNA y agua Milli-Q libre de enzimas RNAsas. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado con las condiciones de amplificación que se muestran detalladas en la Tabla 6. Tras la reacción, el cDNA se almacenó a - 20 °C hasta su uso posterior.

TABLA 6 | Condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos de la retrotranscripción.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 min
2	37 °C	120 min
3	85 °C	4 min
4	4 °C	∞

PCR cuantitativa

La técnica de la qPCR permite obtener resultados cuantitativos de la cantidad de DNA que tenemos en una muestra, a diferencia de la PCR estándar en la que únicamente detectamos presencia o ausencia de un determinado gen. Básicamente, la cantidad de DNA de interés se mide en cada ciclo de PCR a través de la fluorescencia emitida por una molécula que se intercala entre las dos cadenas de la doble hélice de DNA, y que se denomina reportero fluorescente. De esta forma, la señal de fluorescencia incrementará de forma directamente proporcional al número de productos generados por la PCR. Por lo tanto, si en nuestra muestra de cDNA original existen muchas copias de un gen de interés, necesitaremos menos ciclos de PCR para obtener el mismo nivel de fluorescencia que otro en el caso de otro gen que esté menos presente, como se muestra en la Figura 20. Esta

medida se denomina C_T^{45} y hace referencia al número del ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia de la reacción cruza el valor del umbral (*threshold*) en el que se considera que el nivel de señal está aumentando respecto al nivel de fluorescencia de base. El parámetro C_T es el utilizado para calcular la cantidad inicial de número de copias del gen de interés en nuestra muestra de cDNA, y su valor es inversamente proporcional al número de copias del cDNA original. Teniendo en cuenta que el cDNA se obtuvo a partir de la retrotranscripción del mRNA original de la muestra, la cuantificación del cDNA a través de la qPCR nos permite inferir la cantidad de mRNA de nuestro gen de interés, es decir, su nivel de expresión génica.

Para la reacción de la qPCR se empleó el medio comercial PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y los pares específicos de *primers* indicados en la Tabla 7 para cada gen de interés siguiendo el protocolo del termociclador QuantStudio 7 Flex RT PCR System (Applied Biosystems). La reacción se realizó por triplicado para cada muestra biológica analizada y se empleó como gen de referencia para la normalización de datos el de la enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*⁴⁶), cuya expresión es estable y constitutiva en diferentes tipos celulares y organismos (Pfaffl, 2004; Kozera y Rapacz, 2013).

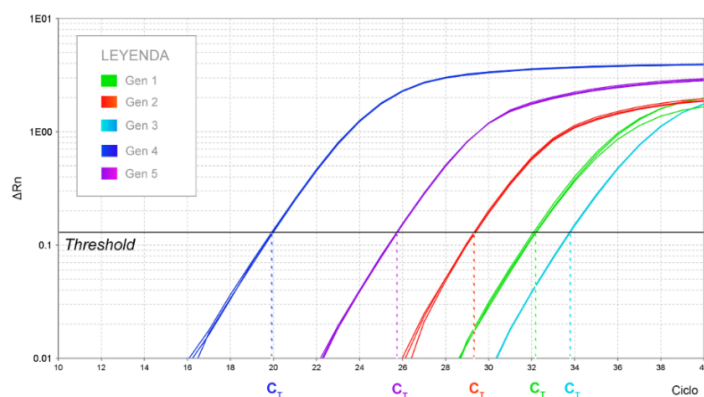


FIGURA 20 | Representación gráfica del logaritmo del incremento de fluorescencia del reportero (ΔRn) respecto al número de ciclos de PCR. Considerando que todos los replicados pertenecen a la misma muestra biológica de cDNA, el orden de los genes según su nivel de expresión sería **Gen 4 > Gen 5 > Gen 2 > Gen 1 > Gen 3**.

Los cambios relativos en la expresión génica se calcularon según el método $2^{\Delta\Delta CT}$ y se expresaron como *fold change*, medida que describe la razón de expresión entre dos muestras: el gen problema y gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001; Goni *et al.*, 2009). De esta forma, si el valor del *fold change* es = 1 no existen diferencias en la expresión del gen de interés y el gen de referencia, si *fold change* > 1 la expresión del gen

⁴⁵ Del inglés *Threshold Cycle*

⁴⁶ Del inglés *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

de interés está aumentada respecto al gen de referencia, y si *fold change* < 1 la expresión está disminuida.

Primers, curvas estándar y controles de especificidad

En este trabajo se analizó la expresión génica de diferentes factores proinflamatorios, neurotróficos y relacionados con la activación de los receptores PPAR α como se detallan a continuación en la Tabla 7.

El alineamiento y especificidad de todos los pares de *primers* se comprobó *in silico* mediante la herramienta BLAST/BLAT del buscador genómico Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>; ver Apéndice II). Además, se verificó la eficiencia, el rango lineal y la reproducibilidad de la reacción para cada par de *primers* mediante la realización de curvas estándar con diluciones seriadas de concentraciones conocidas del cDNA (Apéndice II). Todos los *primers* utilizados mostraron valores óptimos de eficiencia de reacción: pendiente de la recta $\sim -3,32$, coeficiente de correlación $R^2 > 0,99$, porcentaje de eficiencia > 99,99 % y error < 0,0001 (Svec *et al.*, 2015; Apéndice II). Finalmente, en cada análisis se incluyó un control negativo en el que la muestra de cDNA fue sustituida por agua Milli-Q libre de RNAsas con el fin de detectar una posible contaminación cruzada o anillamiento de *primers*.

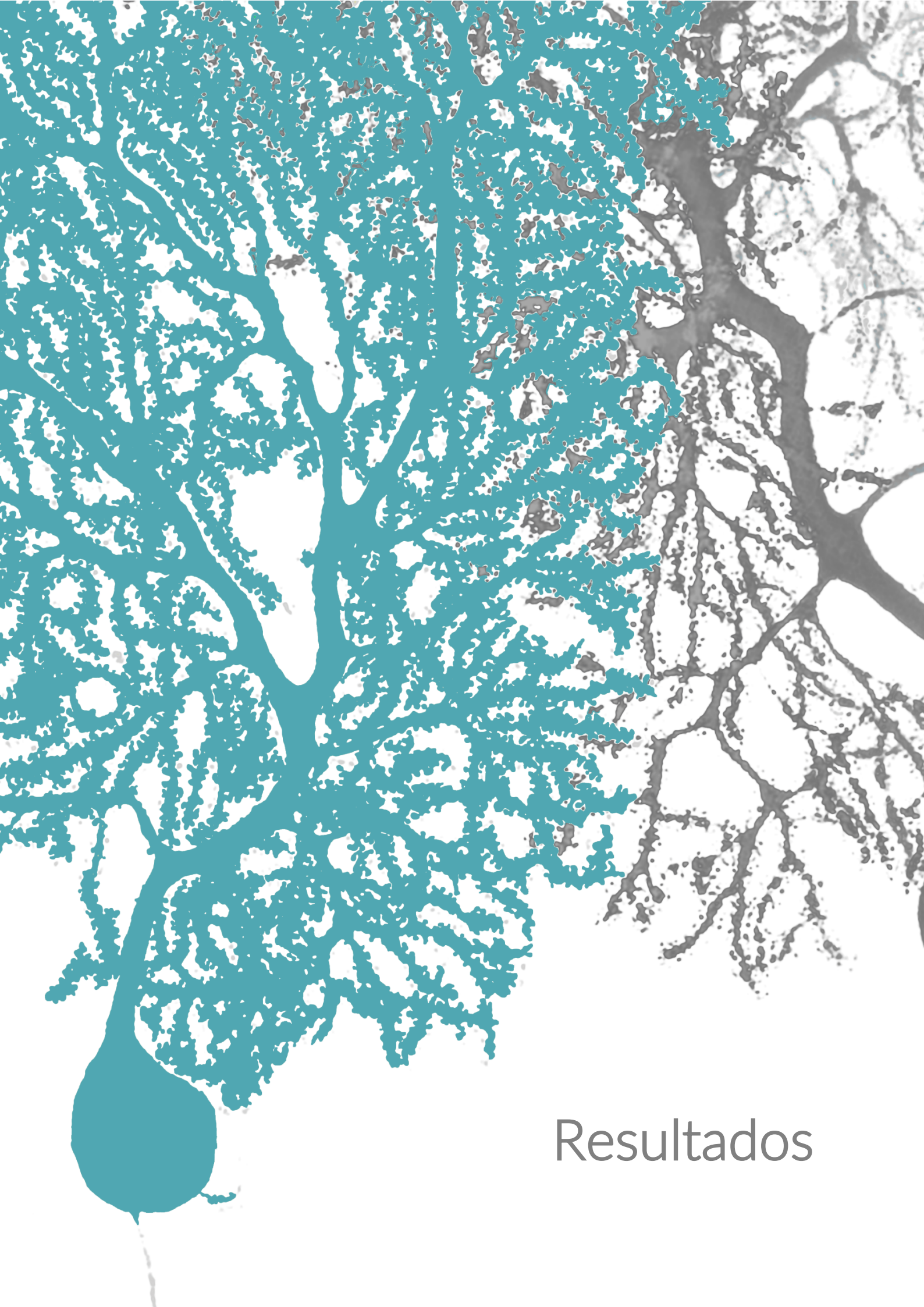
TABLA 7 | Secuencias de los *primers* utilizados en la técnica qPCR.

Gen*	Primer sentido	Primer antisentido
<i>Bdnf</i>	GTGGTGTAAAGCCGCAAAGA	AACCATAGTAAGGAAAAGGATGGTC
<i>Cox2</i>	GGTCATTGGTGGAGAGGTGTA	TGAGTCTGCTGGTTTGAATAG
<i>Gap43</i>	GCTGGTGCATCACCTTCT	TGGTGTCAAGCCGGAAGATAA
<i>Gapdh</i>	GCCTATGTGGCCTCCAAGGA	GTGTTGGGTGCCCTAGTTG
<i>Ifny</i>	CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG	TTTCCGCTTCCTGAGGCTGGAT
<i>Il1β</i>	TGCTCATGTCCTCATCCTGGAAGG	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG
<i>Il6</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>iNos</i>	CTTTGCCACGGACGAGAC	AACTTCCAGTCATTGTACTCTGAGG
<i>Map2</i>	GCTGTAGCAGTCTGAAAGGTG	CTTCCTCCACTGTGGCTGTTTG
<i>NfkB</i>	GCTGCCAAAGAAGGACACGACA	GGCAGGCTATTGCTCATCACAG
<i>Ppara</i>	ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC	TTGCCAGAGATTTGAGGTC
<i>Tfna</i>	GCTTGCTACTCGAATTTTGAGA	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC

*Abreviaturas: *Bdnf*, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*; *Cox*, del inglés *cyclooxygenase*; *Gap*, del inglés *growth associated protein*; *Gapdh*, del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; *Ifn*, del inglés *interferon*; *Il*, del inglés *interleukin*; *iNos*, del inglés *inducible nitric oxide synthase*; *Map*, del inglés *microtubule associated protein*; *Nf*, del inglés *nuclear factor*; *Tnf*, del inglés *tumor necrosis factor*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Independientemente de si se muestran los replicados biológicos, todos los datos están representados como la media \pm el error estándar de la media (ESM). Con el fin de aplicar los análisis estadísticos más adecuados según los datos obtenidos, en todos los casos se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de la muestra con las pruebas de Komogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente. Debido a la variedad de pruebas estadísticas empleadas, se indicará en cada sección de resultados el análisis utilizado. De forma general, los datos que cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad ($p > 0,05$ para las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene), se utilizaron las pruebas paramétricas t de Student o análisis de la varianza (ANOVA) seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni, en función del número de grupos experimentales a comparar. Por el contrario, cuando los datos no cumplieron el supuesto de normalidad y/o homocedasticidad ($p < 0,05$ para las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y/o Levene), se utilizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, dependiendo del número de grupos experimentales a comparar. En cualquier caso, el nivel de significación estadística mínima se estableció en $p < 0,05$. Con el fin de facilitar la lectura del apartado de Resultados de la presente Tesis Doctoral, se han excluido los valores p específicos para cada análisis estadístico del cuerpo del texto y se han recogido en tablas en el Apéndice III. Todas las representaciones gráficas y los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS versión 26 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE. UU.) y GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.), respectivamente.



Resultados

ESTRATEGIA TERAPÉUTICA I

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON OEA

EFECTO NEUROPROTECTOR DEL TRATAMIENTO CON OEA

En estudios anteriores de nuestro laboratorio se había demostrado que la administración de OEA de forma aguda un día antes (P14) o después (P16) del comienzo de la predegeneración, así como de forma crónica desde P7 a P21 aumentaban la supervivencia de las células de Purkinje y prevenía parcialmente las alteraciones morfológicas de las mismas en el ratón mutante PCD (Muñoz-Castañeda, 2015). Del conjunto de dosis y pautas analizadas, fue la administración de OEA a una dosis de 10 mg/kg (i.p.) un día previo al comienzo del proceso predegenerativo (P14) la que mostró mayores efectos neuroprotectores preventivos (Muñoz-Castañeda, 2015). Estos resultados prometedores promovieron un estudio más exhaustivo de la ventana temporal previa a la predegeneración, lo que supone la primera parte de este trabajo. Como veremos a continuación, se estableció el momento óptimo en el que el tratamiento con OEA ejerce una mayor neuroprotección, retrasando la degeneración cerebelosa de este modelo. Una vez establecida la pauta más efectiva, se evaluaron las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras del tratamiento con OEA, así como su efecto en la actividad electrofisiológica del cerebelo y en las funciones motora, cognitiva y social del ratón PCD. Por último, se evaluó la implicación de los receptores PPAR α en los efectos neuroprotectores observados tras el tratamiento con OEA, tanto a nivel histológico como en el comportamiento.

Optimización de la ventana temporal terapéutica de la OEA en el ratón PCD

En el análisis de la ventana temporal terapéutica de la OEA, se evaluaron los cambios en la morfología y la densidad de las células de Purkinje a P30 tras la administración de OEA (10 mg/kg i.p.) en tres puntos temporales diferentes P14, P12 o P10, es decir, uno, tres y cinco días antes del comienzo de la predegeneración (Figura 21). El test ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni reveló diferencias en todas las variables analizadas (Figura 21 j-n; valores *p* en Apéndice III, 1).

FIGURA 21 | Efecto neuroprotector de la OEA a nivel histológico en el ratón PCD a P30. (a-h) Inmunofluorescencia de calbindina (Cb28k, magenta) de cortes sagitales de vermis cerebeloso y de células de Purkinje de animales PCD sin tratamiento (a, e), PCD tratados con OEA a P14 (b, f), PCD tratados con OEA a P12 (c, g) y PCD tratados con OEA a P10 (d, h). (i) Representación de las variables analizadas sobre la morfología y densidad de las células de Purkinje. (j-m) Cuantificación del efecto de la OEA en la morfología de las células de Purkinje: área del soma (j), longitud del árbol dendrítico (k), grosor (l) y longitud (m) de la dendrita primaria. (n) Cuantificación del efecto de la OEA en la supervivencia de las células de Purkinje. Nótese cómo el efecto neuroprotector de las diferentes pautas de administración de OEA muestran una curva en U invertida donde la administración a P12 es la que presenta un mayor efecto para todas las variables analizadas. $^{**} p < 0,05/0,01$ para diferencias entre grupos experimentales y grupo control PCD; $^{###} p < 0,05/0,01$ para diferencias entre los diferentes tratamientos de OEA (valores p específicos en Apéndice III, 1). Los datos de los animales WT únicamente se han utilizado como referencia, no para comparar. Barra de escala: 500 μm (a-d), 20 μm (e-h). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral. Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021. ►

En relación con la morfología de las células de Purkinje, en general todas las pautas de administración analizadas previnieron los cambios en el área del soma (Figura 21 j), la longitud del árbol dendrítico (Figura 21 k), la longitud (Figura 21 l) y el grosor de la dendrita primaria (Figura 21 m) en comparación con ratones PCD sin tratar (Figura 21 j-m; Apéndice III, 1). Únicamente en el análisis de la longitud de la dendrita primaria no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento a P10 y los animales sin tratamiento (Figura 21 l; Apéndice III, 1). Además, la relación entre el efecto observado y las diferentes pautas de administración mostró una curva en forma de campana o U invertida para todas las variables morfológicas, siendo la administración de OEA a P12 la que mostró un mayor efecto en tres de las variables analizadas: área del soma (Figura 21 j), longitud del árbol dendrítico (Figura 21 k) y grosor de la dendrita primaria (Figura 21 m; Apéndice III, 1). Curiosamente, las variables relacionadas con la morfología de las células de Purkinje de los animales PCD tratados con OEA a P12 eran muy similares a las de los animales WT, mostrando una morfología típica de las células de Purkinje con un gran árbol dendrítico extendido por la CM (Figura 21 g).

En cuanto al análisis de la supervivencia de las células de Purkinje, únicamente los tratamientos a P14 y P12 aumentaron la densidad lineal de estas neuronas con respecto a los animales sin tratar (Figura 21 n), mientras que no se observó ningún efecto tras el tratamiento a P10 (Figura 21 n; Apéndice III, 1). En este caso, también se observó una relación entre el efecto y la pauta de administración en forma de U invertida, siendo la administración a P12 la pauta más efectiva, al igual que lo observado en las variables relacionadas con la morfología (Figura 21 n; Apéndice III, 1).

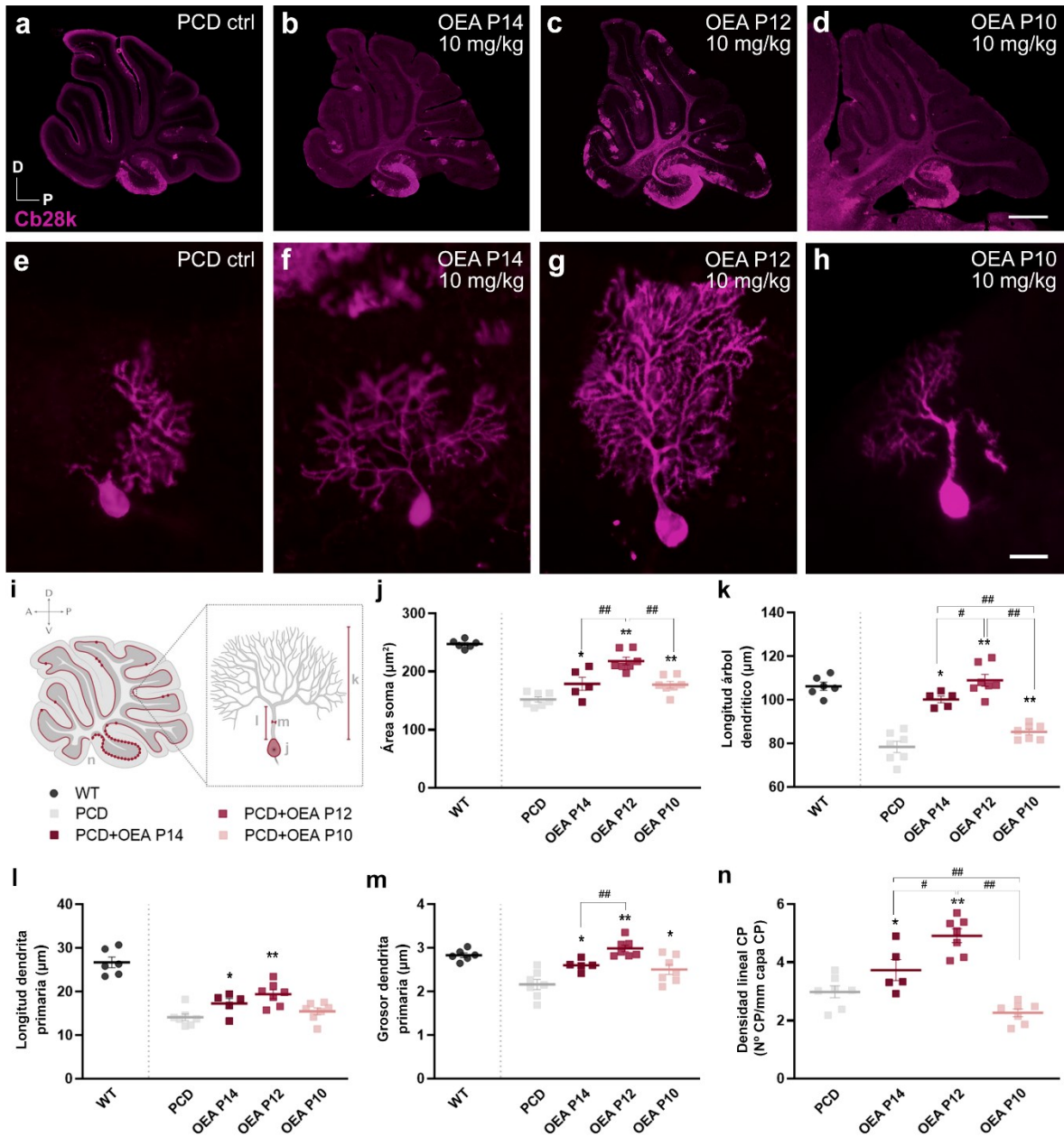


FIGURA 21 (Pie de figura en la página anterior)

Así, estos resultados corroboran que la OEA ejerce un efecto neuroprotector preventivo en las células de Purkinje del ratón PCD cuando se administra antes del comienzo de la predegeneración. Además, demuestran que la administración a P12 es la pauta óptima para prevenir las alteraciones morfológicas y frenar la pérdida de las células de Purkinje.

Efecto neuroprotector de la dosis más efectiva de OEA a largo plazo

Con el fin de evaluar si los efectos observados tras la administración de la pauta más efectiva de OEA (10 mg/kg, i.p., P12) se mantenían a lo largo del tiempo, se analizaron las mismas variables relacionadas con la morfología y la densidad de las células de Purkinje a P40 (Figura 22). En este caso, se empleó la prueba de ANOVA de dos vías (tratamiento y edad de análisis), y la prueba de *t* de Student para cada edad de análisis por separado.

En el análisis de la morfología de las células de Purkinje, se observaron diferencias debidas tanto al tratamiento como a la edad de análisis en las variables correspondientes al área del soma, la longitud del árbol dendrítico y el grosor de la dendrita primaria (Figura 22 d-g; valores *p* en Apéndice III, 2), mientras que en el caso de la longitud de la dendrita primaria únicamente se detectaron diferencias debidas al tratamiento (Figura 22 f; Apéndice III, 2). Sin embargo, también se observó una interacción entre ambos factores en las tres primeras variables (área del soma, longitud del árbol dendrítico y grosor de la dendrita primaria), lo que significa que tanto el tratamiento farmacológico como la edad del análisis están influyendo en los resultados observados (Figura 22 d-g; Apéndice III, 2). Estrictamente, debido a esta interacción no debería realizarse un análisis estadístico individual de cada variable ya que ambas en conjunto son responsables de los resultados observados. Sin embargo, con el fin de obtener la mayor cantidad de datos e información relevante sobre estos experimentos y por sugerencia de revisores externos, se analizaron tanto el efecto del tratamiento como el de la edad por separado. Así, mientras que los valores de las variables morfológicas en el grupo de animales PCD sin tratar no se vieron alterados entre la edad de P30 y P40 (Figura 22 d-g), en el caso de los animales PCD tratados con OEA fueron siempre menores a P40 respecto a P30, excepto la longitud de la dendrita primaria (Figura 22 d-g; Apéndice III, 2). Por último, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas a P40 entre los animales tratados con OEA y los no tratados en las variables correspondientes al área del soma y la longitud de la dendrita primaria (Figura 22 d-g; Apéndice III, 2).

En cuanto a la supervivencia de las células de Purkinje, también se observó un efecto debido al tratamiento y a la edad de análisis (Figura 22 h; Apéndice III, 2). En este caso, la densidad de células de Purkinje fue menor a P40 respecto a la de P30 tanto en los animales PCD sin tratar como en los tratados con OEA (Figura 22 h). Además, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales a P40 (Figura 22 h; Apéndice III, 2).

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos en este análisis, el tratamiento con OEA previene parcialmente las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje y retrasa la pérdida de esta población neuronal, aunque no es capaz de frenar completamente la degeneración, puesto que a P40 no se mantiene la neuroprotección.

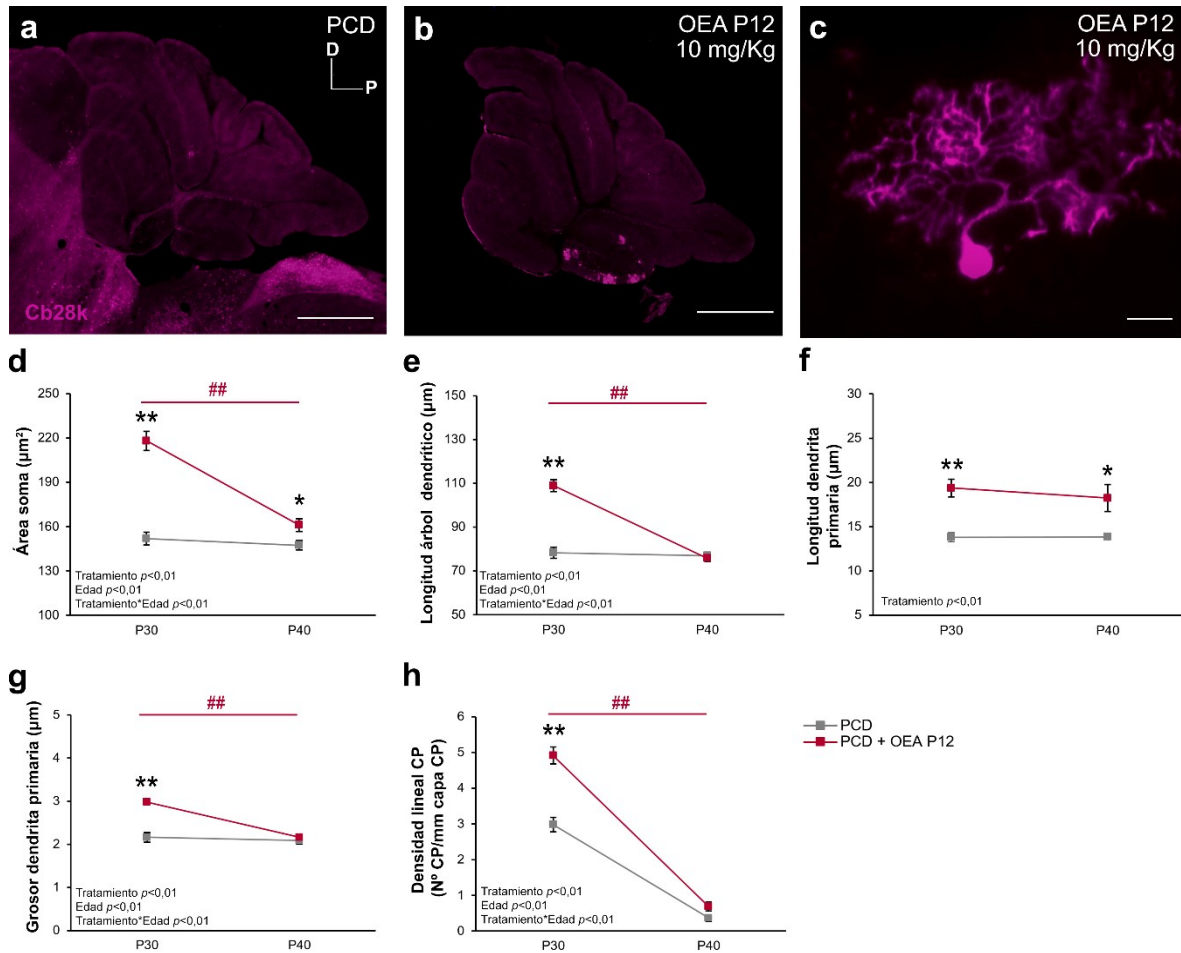


FIGURA 22 | Efecto del tratamiento más efectivo de OEA (10 mg/kg, i.p., P12) a largo plazo a nivel histológico en el ratón PCD. (a-c) Inmunofluorescencia para calbindina (Cb28k, magenta) en secciones sagitales de vermis cerebeloso (a, b) y de una célula de Purkinje (c) de animales PCD sin tratamiento y PCD tratado con OEA (10 mg/kg, i.p., P12), analizados a P40. (d-h) Cuantificación del efecto de la OEA en la morfología (d-g) y la supervivencia (h) de las células de Purkinje a P30 y P40. Obsérvese cómo el efecto neuroprotector de la OEA encontrado a P30 únicamente se mantiene a P40 en dos de las variables morfológicas: área del soma y longitud de la dendrita primaria. **/*** $p < 0,05/0,01$ entre grupos experimentales; ## $p < 0,01$ entre edades analizadas (valores p específicos en Apéndice III, 2). Barra de escala: 500 μm (a, b), 20 μm (c). D, dorsal; P, posterior. Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021.

Efecto de la OEA en el peso corporal de los animales

Debido al efecto anorexigénico de la OEA (Fu *et al.*, 2003, 2005; Fedele *et al.*, 2018), se monitorizó el peso de los animales utilizados para el análisis del efecto neuroprotector

de esta sustancia, tanto a P30 como a P40 (Figura 23). En ambos análisis se empleó la prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni.

A P30 se compararon los pesos corporales de los animales WT, los PCD sin tratar, y los PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p.) a P14, P12 o P10. Tras el análisis estadístico se detectaron diferencias significativas entre el grupo de animales WT y todos los grupos experimentales de PCD (Figura 23 a; valores *p* en Apéndice III, 3). Además, no se observaron diferencias entre los ratones PCD no tratados y los PCD tratados con OEA, independientemente de la pauta de administración (Figura 23 a; Apéndice III, 3).

En cuanto a P40 se compararon los pesos corporales de los animales WT, los PCD sin tratamiento y los PCD tratados con la pauta de OEA óptima (10 mg/kg, i.p., P12). Al igual que en el análisis de P30, únicamente se detectaron diferencias entre el peso corporal de los ratones WT y PCD, independientemente de si habían sido tratados con OEA o no (Figura 23 b; Apéndice III, 3). Por su parte, no se observaron diferencias en el peso de los animales PCD con y sin tratamiento con OEA (Figura 23 b; Apéndice III, 3).

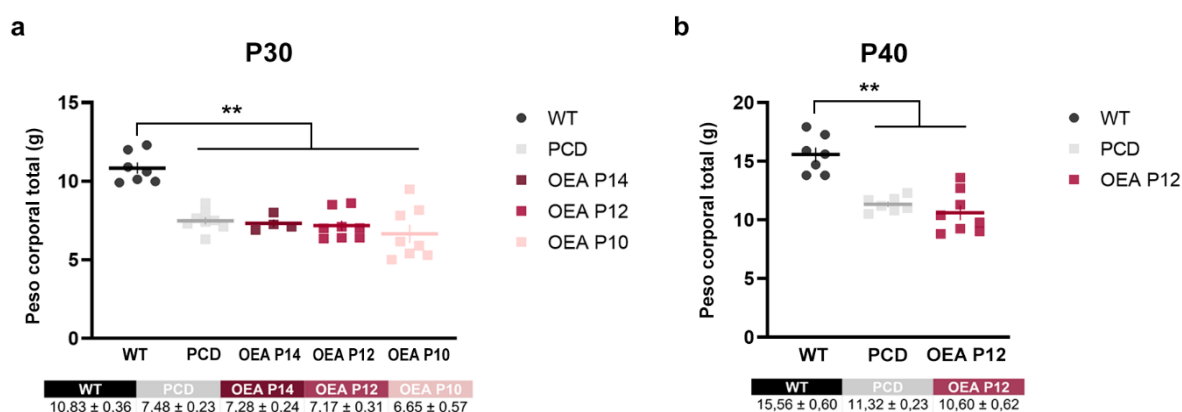


Figura 23 | Efecto de la administración de OEA sobre el peso corporal de los ratones PCD. (a) Análisis y valores medios del peso corporal a P30 de animales WT, PCD sin tratamiento y PCD tratados con diferentes pautas de administración de OEA (10 mg/kg, i.p.; a P14, P12 o P10). (b) Análisis y valores medios del peso corporal a P40 de animales WT, PCD sin tratamiento y PCD tratados con la pauta óptima de OEA (10 mg/kg, i.p., P12). Nótese que las diferentes pautas de OEA empleadas en este trabajo no muestran un efecto anorexigénico en ninguna de las edades analizadas. ** *p* < 0,01 (valores *p* específicos en Apéndice III, 3).

Estos resultados concuerdan con los publicados previamente en los que se demostraba el menor peso corporal de los ratones PCD respecto a los animales WT de la misma edad (Landis y Mullen, 1978), y además demuestran que la dosis y pautas de administración de la OEA empleadas en la presente Tesis Doctoral no tienen un efecto negativo sobre el peso corporal total de los animales tratados.

EFFECTO ANTTINFLAMATORIO E INMUNOMODULADOR DE LA OEA

Una vez comprobado el efecto neuroprotector, quisimos analizar las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la pauta óptima de OEA en el ratón PCD. Para ello, en primer lugar, se analizaron los cambios en la expresión génica de diferentes factores inflamatorios y neurotróficos en el cerebelo tras el tratamiento con OEA. A continuación, se evaluaron los cambios en la densidad y en el fenotipo de las células microgliales. Por último, se cuantificó la infiltración de leucocitos hacia el parénquima cerebeloso.

Cambios en la expresión génica de factores inflamatorios y neurotróficos/neuroprotectores

Se evaluó la expresión génica de diferentes marcadores inflamatorios (*Cox2*, *Ifny*, *Il1 β* , *Il6*, *iNos*, *Nf-kb* y *Tnfa*), factores neurotróficos/neuroprotectores (*Bdfn*, *Gap43*, *Map2*) y del receptor a través del cual la OEA ejerce sus acciones principalmente (*Ppara*). Los cambios se analizaron a corto (3 y 24 horas tras el tratamiento), medio (P20) y largo plazo (P30). En los estudios a corto plazo (P12-P13), se emplearon solamente animales WT ya que no se ha demostrado la existencia de diferencias entre ratones PCD y WT a esta edad (Wang y Morgan, 2007; Li *et al.*, 2010; Baltanás *et al.*, 2011a; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Además, el objetivo principal de este análisis era evaluar los cambios en la expresión génica propiciados por la OEA en condiciones estándar, es decir, en ausencia de un proceso degenerativo. Por su parte, en los estudios a medio (P20) y largo plazo (P30) se emplearon ratones WT, PCD sin tratar y PCD tratados con la pauta óptima de OEA (10 mg/kg, i.p., P12). En todos los análisis moleculares se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a que los datos no cumplían los supuestos de homogeneidad y homocedastidad ($p < 0,05$ en las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene).

Análisis del peso de los hemicerebelos y relación con el peso corporal total

Como se mencionó en la sección de Material y Métodos, antes de la extracción del RNA, los hemicerebelos izquierdos se pesaron y se calculó la relación entre su peso y el peso corporal total del animal (Figura 24).

Atendiendo al peso absoluto del hemicerebelo, en el análisis a corto plazo, únicamente se observó una reducción de peso en los animales tratados y sacrificados 24

horas tras el tratamiento, en comparación con los ratones sin tratar y los sacrificados a las 3 horas postratamiento (todos ellos WT; Figura 24 a; valores p en Apéndice III, 4). En el análisis a medio plazo, sin embargo, se observó una reducción del peso del hemiserebelo izquierdo en los dos grupos de ratones PCD, independientemente del tratamiento, en comparación con los animales WT (Figura 24 a; Apéndice III, 4). Estos mismos resultados se obtuvieron en el análisis a largo plazo (Figura 24 a; Apéndice III, 4). Por lo tanto, esto parece indicar que el efecto de la OEA en el peso encefálico únicamente tiene lugar a corto plazo, mientras que los cambios observados a medio y largo plazo se deberían a la atrofia cerebelosa del modelo PCD.

En cuanto a la proporción del peso del hemiserebelo izquierdo respecto al peso corporal total de los animales, en el análisis a corto plazo únicamente se observaron diferencias entre los animales WT tratados con OEA y sacrificados a las 3 horas y los sacrificados a las 24 horas, siendo menor en estos últimos (Figura 24 b; Apéndice III, 4). A medio plazo, se observaron diferencias entre los animales WT y los PCD, siendo la proporción menor en los mutantes (Figura 24 b; Apéndice III, 4). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los ratones WT y los PCD tratados con OEA (Figura 24 b; Apéndice III, 4). Por último, en el análisis a largo plazo, únicamente se detectaron diferencias entre los animales WT y PCD tratados con OEA, siendo en estos últimos la proporción mayor (Figura 24 b; Apéndice III, 4). Estos resultados indican que, a pesar de la atrofia cerebelosa que tiene lugar en el cerebelo del ratón mutante PCD, la proporción del cerebelo con respecto al peso corporal total del animal no varía respecto a los animales WT. Además, los resultados obtenidos a P30 -donde se observa que la proporción del peso del hemiserebelo respecto al peso corporal en los animales PCD tratados con OEA es mayor incluso que en los animales WT- podrían estar indicando que la atrofia cerebelosa en los ratones tratados es menor a la que cabría esperar en base a su peso corporal o bien que el peso corporal es menor en los animales tratados. Sin embargo, como ya se describió en apartados anteriores, la dosis y pauta de OEA empleadas no mostraron un efecto anorexigénico en ninguna de las edades analizadas, por lo que el fenómeno mencionado previamente en ratones tratados con OEA se debería a una menor atrofia cerebelosa (Figura 24 b).

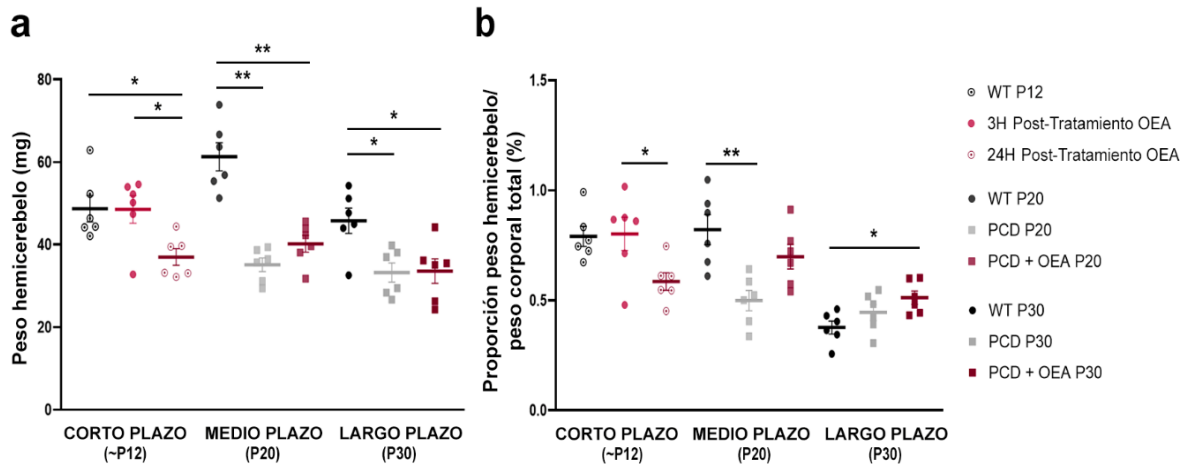


Figura 24 | Análisis del peso de los hemiserebelos usados para los análisis moleculares de la OEA. (a, b) Representaciones gráficas del peso del hemiserebelo izquierdo (a) y de la proporción entre su peso y el peso corporal del animal (b) a corto (~P12), medio (P20) y largo plazo (P30). La administración de OEA disminuye a corto plazo el peso del hemiserebelo izquierdo en animales WT, aunque no se observó un efecto entre animales PCD sin tratamiento y tratados con OEA en ninguna de las edades analizadas. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 4).

Cambios en la expresión génica a corto plazo en condiciones fisiológicas

El objetivo de estos experimentos fue comprobar los cambios que produce la administración aguda de OEA (10 mg/kg, i.p.) a P12 en la expresión génica de diferentes factores proinflamatorios y neurotróficos/neuroprotectores en condiciones no patológicas. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de los diferentes genes 3 y 24 horas tras el tratamiento en los animales WT (Figura 25).

En general, se observó una disminución de los niveles de expresión génica de factores proinflamatorios *Ifn γ* , *Il1 β* , *Tnfa* y un aumento en la expresión de los factores neurotróficos/neuroprotectores *Bdnf*, *Gap43*, *Map2* y *Ppara* (Figura 25 a, b; valores p en Apéndice III, 5). Curiosamente, en el caso de la expresión génica de *Il6* se observó un aumento de la expresión a las 3 horas tras la administración que volvió a condiciones basales pasadas 24 horas (Figura 25 a, b; Apéndice III, 5). Por otro lado, cabe destacar el aumento de la expresión génica de *Map2* y *Ppara* llegando a ser casi cuatro veces la expresión basal observada en los animales WT sin tratar (Figura 25 a, b; Apéndice III, 5).

Estos resultados indican que la administración exógena de OEA en condiciones fisiológicas produce cambios en la expresión génica en el cerebelo, disminuyendo en general la transcripción de factores proinflamatorios y aumentando la de factores neurotróficos/neuroprotectores. Asimismo, la administración de OEA también incrementa la expresión génica de su receptor principal *Ppara*.

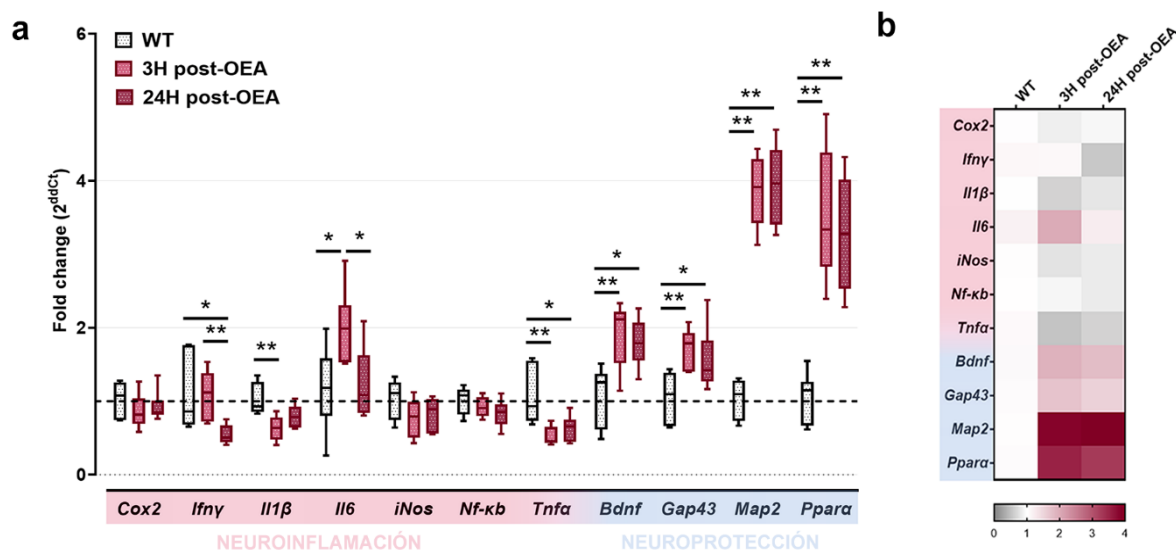


Figura 25 | Cambios en la expresión génica de factores proinflamatorios y neuroprotectores/neurotróficos tras el tratamiento de OEA en el cerebelo en condiciones no patológicas a corto plazo (~P12). (a) Representación gráfica y (b) *heatmap* de los niveles relativos de RNA de los diferentes genes analizados en animales WT y WT tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12), sacrificados a las 3 o 24 horas postratamiento. Nótese que la administración de OEA disminuye la expresión génica de mediadores inflamatorios y aumenta la de factores neurotróficos/neuroprotectores, así como la de su principal receptor. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 5).

Cambios en la expresión génica a medio plazo

El análisis de la expresión génica a P20 -momento en el que la degeneración de las células de Purkinje acaba de comenzar- reveló diferencias estadísticamente significativas en prácticamente todos los genes analizados (Figura 26). En el caso de los ratones PCD, al contrario de lo esperado debido al comienzo del proceso degenerativo a esta edad, no se detectó un aumento general de la expresión génica de factores proinflamatorios, sino que únicamente se observó un incremento muy llamativo en los niveles del gen *Tnfa* comparado con los niveles de los animales WT (Figura 26 a, b; valores p en Apéndice III, 6). Por otro lado, se observó una disminución de los niveles de RNA de *iNos*, *Gap43* y *Ppara* respecto a los niveles de WT (Figura 26 a, b; Apéndice III, 6). Curiosamente, en los ratones PCD tratados con OEA se detectó un aumento a esta edad de la expresión de los genes proinflamatorios *Cox2*, *Ifny*, *Il1β*, *Il6* y *Tnfa* comparado con los niveles basales (Figura 26 a, b; Apéndice III, 6). Además, también se observó un aumento en los factores neurotróficos *Bdnf*, *Gap43* y *Map2* en los ratones PCD tratados con OEA comparado con los que no recibieron tratamiento (Figura 26 a, b; Apéndice III, 6).

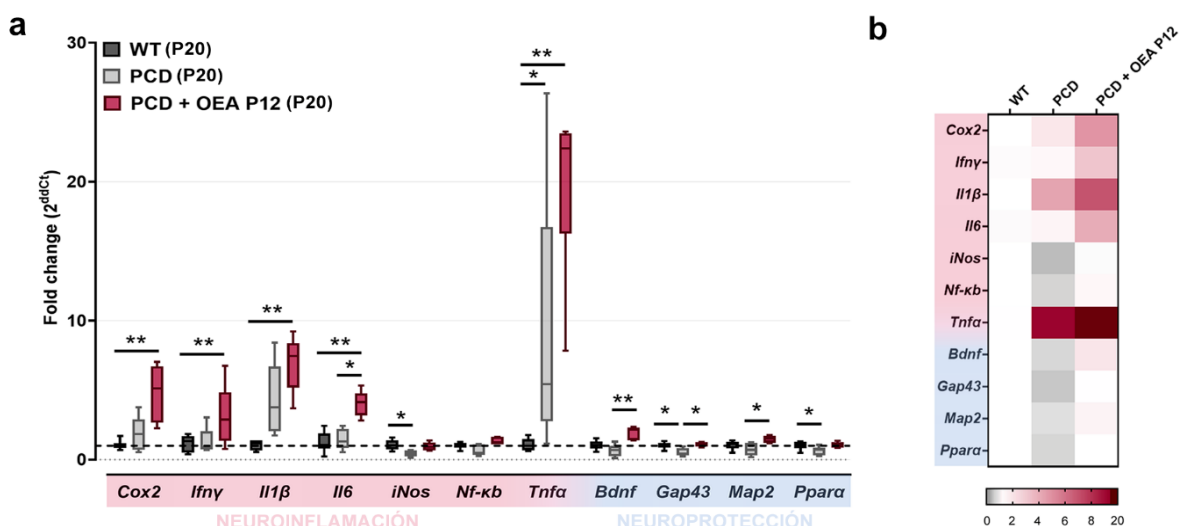


Figura 26 | Cambios en la expresión génica de factores proinflamatorios y neuroprotectores/neurotróficos tras el tratamiento con OEA a medio plazo (P20) en el cerebelo del ratón PCD. (a) Representación gráfica y (b) *heatmap* de los niveles relativos de RNA de los diferentes genes analizados en animales WT, PCD sin tratamiento, y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12). Nótese el aumento llamativo en la expresión de *Tnfa* en ratones PCD independientemente del tratamiento. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 6).

Estos resultados indican que a P20 aún no se detecta un aumento generalizado del estado inflamatorio del cerebelo en el ratón PCD. Sin embargo, cabe destacar el aumento llamativo en la expresión génica de *Tnfa* observado en estos mutantes con respecto a la de los animales WT, siendo este incremento de más de 10 veces la expresión basal (Figura 26 a, b; ver Discusión). Recordemos que, a esta edad, la degeneración de las células de Purkinje acaba de comenzar, de manera que este aumento en la transcripción de *Tnfa* podría considerarse como una señal temprana de la degeneración neuronal. Además, la administración de OEA parece promover un incremento en la expresión génica de casi todos los factores analizados, tanto proinflamatorios como neuroprotectores.

Cambios en la expresión génica a largo plazo

En el análisis de la expresión génica a P30 se detectó un aumento del estado general inflamatorio del cerebelo del ratón PCD y, además, una reducción en la expresión de los factores neurotróficos/neuroprotectores comparado con la de los animales WT (Figura 27). Así, se observó un incremento en los niveles de mRNA de los factores *Ifnγ*, *Il1β*, *Il6*, *Tnfa*, y una disminución en los niveles de *iNos*, *Bdnf*, y del receptor *Ppara* (Figura 27; valores p en Apéndice III, 7). Sin embargo, a esta edad el tratamiento con OEA consiguió revertir en gran parte los cambios en la expresión génica observados en el ratón PCD hasta valores similares a los de los animales WT (Figura 27 a, b; Apéndice III, 7). En el caso concreto de

los factores proinflamatorios, los animales que recibieron el tratamiento con OEA presentaron una menor expresión génica en los genes *Ifny*, *Il1β* e *Il6* (Figura 27 a, b; Apéndice III, 7). Por el contrario, la administración de OEA produjo un aumento en los factores neurotróficos *Bdnf*, *Map2* y del receptor *Ppara* hasta los niveles basales observados en los animales WT o incluso superiores (Figura 27 a, b; Apéndice III, 7).

Por lo tanto, a P30, cuando en el PCD se observa un aumento general en el estado inflamatorio del cerebelo debido a que la degeneración de las células de Purkinje está en su punto máximo, la administración de OEA modula esta neuroinflamación, disminuyendo la expresión génica de algunos mediadores inflamatorios y aumentando la de factores neurotróficos.

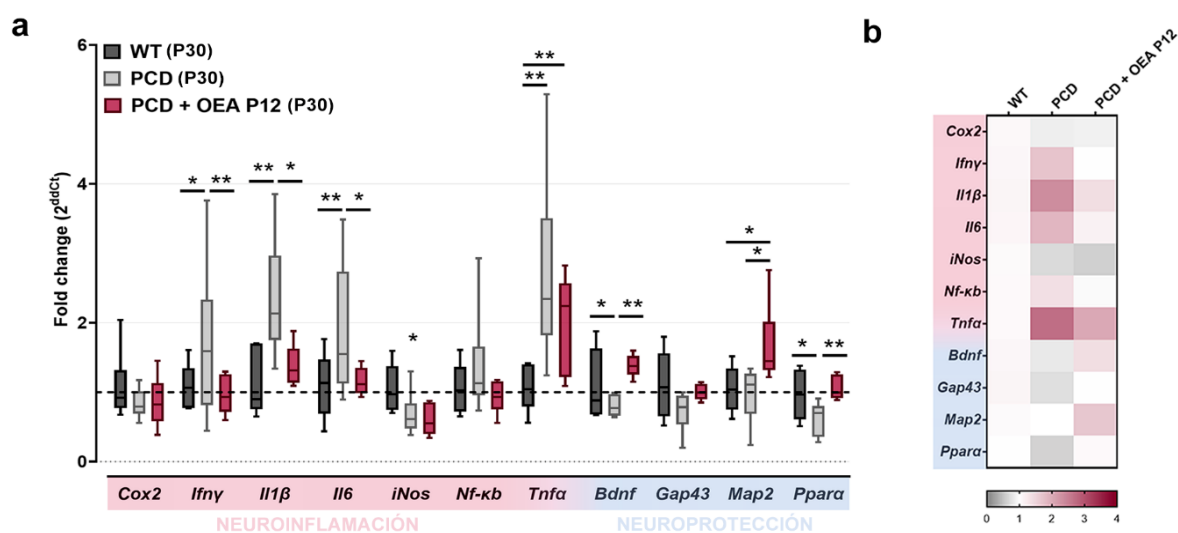


Figura 27 | Cambios en la expresión génica de factores proinflamatorios y neuroprotectores/neurotróficos tras el tratamiento con OEA a largo plazo (P30) en el cerebelo del ratón PCD. (a) Representación gráfica y **(b)** *heatmap* de los niveles relativos de RNA de los diferentes genes analizados en animales WT, PCD sin tratamiento, y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12). Nótese que la OEA disminuye la expresión génica de los mediadores proinflamatorios y aumenta la de factores neurotróficos/neuroprotectores en los ratones PCD. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 7).

Efecto de la OEA en la microgliosis del ratón PCD

Diversos estudios previos ya habían demostrado cualitativamente un aumento en la densidad y un cambio en la distribución de la microglía en el ratón PCD, localizándose esta principalmente en los lóbulos del I al IX y en las capas CM y CCP (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013). Sin embargo, hasta la fecha no existían estudios cuantitativos sobre estas alteraciones en la microglía asociadas a la degeneración cerebelosa del ratón PCD. Por ello, en primer lugar, evaluamos los cambios en la densidad de células Iba1+ en el

cerebelo completo, separado por lóbulos (lóbulo I al IX vs. lóbulo X) y separado por capas (CM + CCP vs. CG). A continuación, analizamos los cambios en la densidad de estas células gliales tras el tratamiento con OEA. Y, por último, se evaluaron los cambios en las diferentes poblaciones de microglía tras el tratamiento con OEA, basándonos en la expresión de diferentes marcadores microgliales. Todos los análisis se realizaron a P30 y para su análisis estadístico se utilizaron las pruebas paramétricas ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni o *t* de Student, en función de la comparación.

Cambios en la densidad de la microglía

El análisis cuantitativo de la densidad total de microglía reveló un aumento en el número de células Iba1+ por mm² en el cerebelo del ratón mutante PCD comparado con los animales WT (Figura 28 a, b; valores *p* en Apéndice III, 8). Sin embargo, el tratamiento con OEA redujo la densidad de microglía a unos valores intermedios entre los anteriores (Figura 28 b; Apéndice III, 8).

Debido a que la degeneración neuronal no ocurre de forma homogénea en todo el vermis cerebeloso del ratón PCD -siendo el lóbulo X la región más resistente- y con el fin de obtener la mayor cantidad de información relevante de estos experimentos, consideramos analizar la densidad de la microglía separada por lóbulos entre los diferentes grupos experimentales y para cada región dentro de cada grupo experimental como se indicó en el apartado de Material y Métodos. Cuando se compararon los valores de la densidad de microglía separados por lóbulos entre los tres grupos experimentales (Figura 28 c), en los lóbulos del I al IX se observaron resultados similares a los obtenidos en el análisis total de la microglía, es decir, un aumento en la densidad en los ratones PCD no tratados, que se redujo parcialmente tras el tratamiento con OEA (Figura 28 c; valores *p* en Apéndice III, 9). Sin embargo, en el caso del lóbulo X únicamente se observaron diferencias entre los animales WT y los dos grupos de animales PCD, sin detectar ningún efecto tras el tratamiento con OEA (Figura 28 c; Apéndice III, 9). En cuanto al análisis específico dentro de cada grupo experimental (Figura 28 d), se observaron diferencias en la distribución de las células Iba1+ entre los lóbulos I al IX y en el X en los dos grupos de los animales PCD, siendo en ambos casos la densidad de microglía mayor en los lóbulos I al IX respecto al lóbulo X (Figura 28 d; Apéndice III, 9). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre lóbulos en el grupo de animales WT (Figura 28 d; Apéndice III, 9).

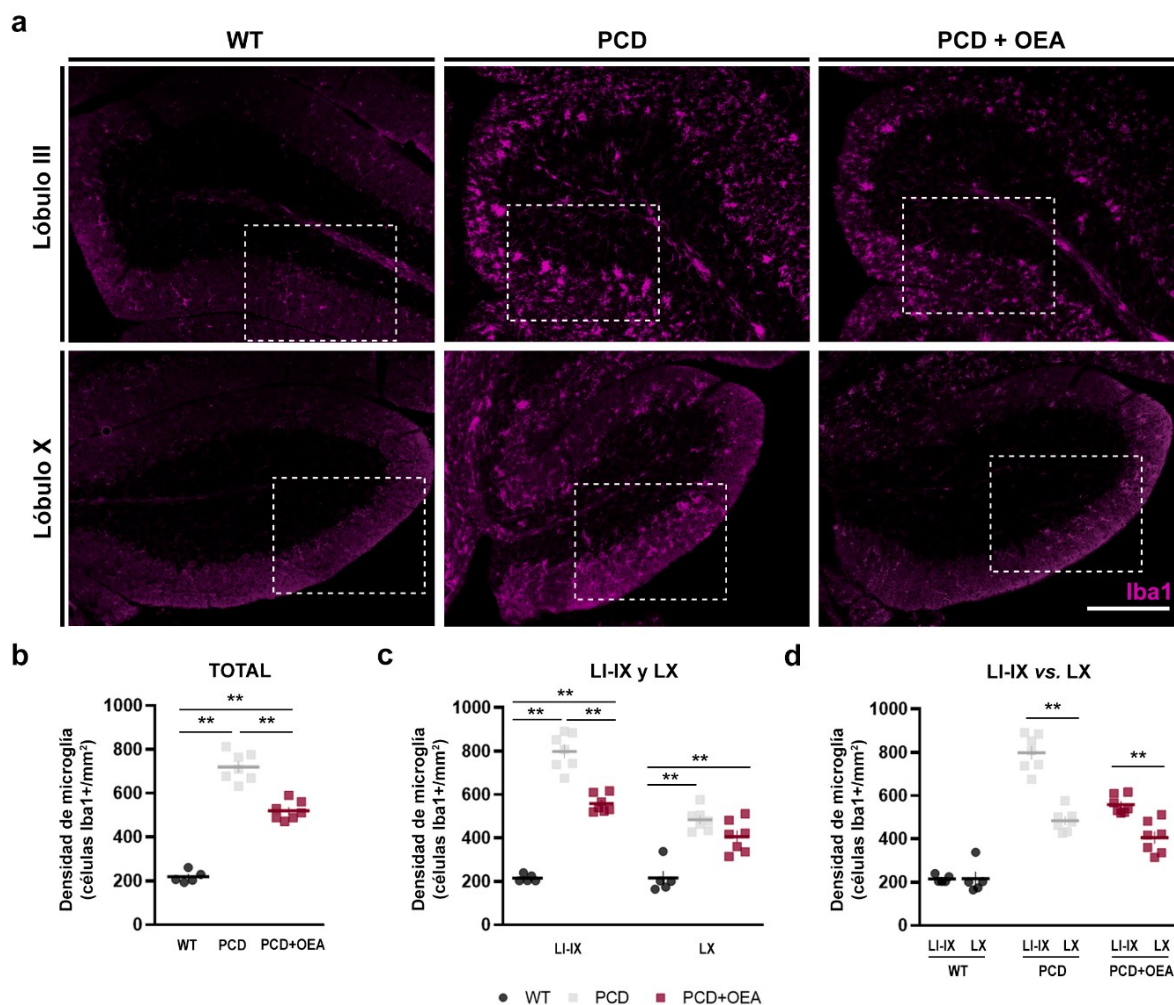


FIGURA 28 | Efecto del tratamiento con OEA en la densidad de microglía en el cerebelo (total y por lóbulos) a P30. (a) Inmunofluorescencia para Iba1 (magenta) de los lóbulos III y lóbulos X del vermis cerebeloso de animales WT, PCD sin tratar y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12). Los recuadros en línea punteada indican el área de las ampliaciones mostradas en la Figura 29. **(b-d)** Cuantificación del efecto de la OEA en la densidad de microglía total (b) y por lóbulos (c-d). Obsérvese que el grupo de animales tratados con OEA muestra valores intermedios entre los animales WT y PCD sin tratamiento para el análisis global y en los lóbulos I al IX. ** $p < 0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 8 y 9). Barra de escala: 100 μm .

Por otro lado, también se analizó la densidad de la microglía separada por capas (Figura 29), ya que en estudios previos se había observado su localización preferente en las capas externas de la corteza cerebelosa, es decir, en la CM y CCP, en el ratón PCD (Baltanás *et al.*, 2013). El análisis entre los diferentes grupos experimentales mostró un aumento en la densidad de células Iba1+ en las CM + CCP y en la CG en los ratones PCD sin tratar comparado con los animales WT tanto en el análisis total del cerebelo (Figura 29 b), como en los lóbulos I al IX (Figura 29 c) y en el lóbulo X (Figura 29 d; valores p en Apéndice III, 10). Además, aquí sí se observó un efecto claro tras el tratamiento con OEA, obteniendo los animales tratados unos valores de densidad de microglía intermedios entre los de WT y PCD sin tratar en las CM + CCP a nivel total (Figura 29 b) y en los lóbulos del I

al IX (Figura 29 c) o incluso valores idénticos a los de los animales WT como en la CG de todos los análisis (Figura 29 b-d; Apéndice III, 10). Al igual que en el análisis por lóbulos, también se analizó el número de células Iba1+ por mm² en las capas CM + CCP frente a la CG dentro de cada grupo experimental. De esta forma, se detectaron diferencias tanto en los animales WT como en los dos grupos de los animales PCD (Figura 29 e-g; Apéndice III, 10). Mientras que en los ratones WT, la microglía se localizaba preferentemente en la CG, en ambos grupos de ratones mutantes la microglía estaba localizaba preferentemente en las capas más externas de la corteza cerebelosa, coincidiendo con la región donde tiene lugar la degeneración de las células de Purkinje (Figura 29 e; Apéndice III, 10). Además, estas diferencias en el patrón de distribución por capas también se observaron cuando se analizaron los distintos lóbulos del cerebelo por separado, excepto en el caso del lóbulo X de los ratones WT (Figura 29 f, g; Apéndice III, 10).

En resumen, la microgliosis del cerebelo del ratón PCD se caracteriza por una localización preferente de las células microgliales en las regiones donde es más agresiva la degeneración neuronal (lóbulos del I al IX) y en las capas donde se localiza el soma y el árbol dendrítico de las células de Purkinje en degeneración (la CM y la CCP). Curiosamente, la administración de OEA de forma general disminuyó esta microgliosis hasta valores intermedios entre los animales WT y los PCD sin tratamiento, tanto en su análisis de forma global como cuando se evaluó diferencialmente por lóbulos y por capas.

Cambios en el fenotipo de la microglía

Con el fin de evaluar una posible modulación del fenotipo de la microglía por parte de la OEA, se analizó el porcentaje de tres poblaciones microgliales (Iba1+) en función de la expresión de tres marcadores diferentes adicionales: CD45 (marcador de microglía reactiva), CD16/32 (marcador proinflamatorio) y CD206 (marcador antiinflamatorio o reparador de tejido; Figuras 30-32; (Mecha *et al.*, 2016). Al igual que en el apartado anterior, este análisis se realizó de forma global en el vermis completo y también separado por lóbulos y por capas de la corteza cerebelosa, debido a las diferencias en la distribución de la microglía descritas previamente.

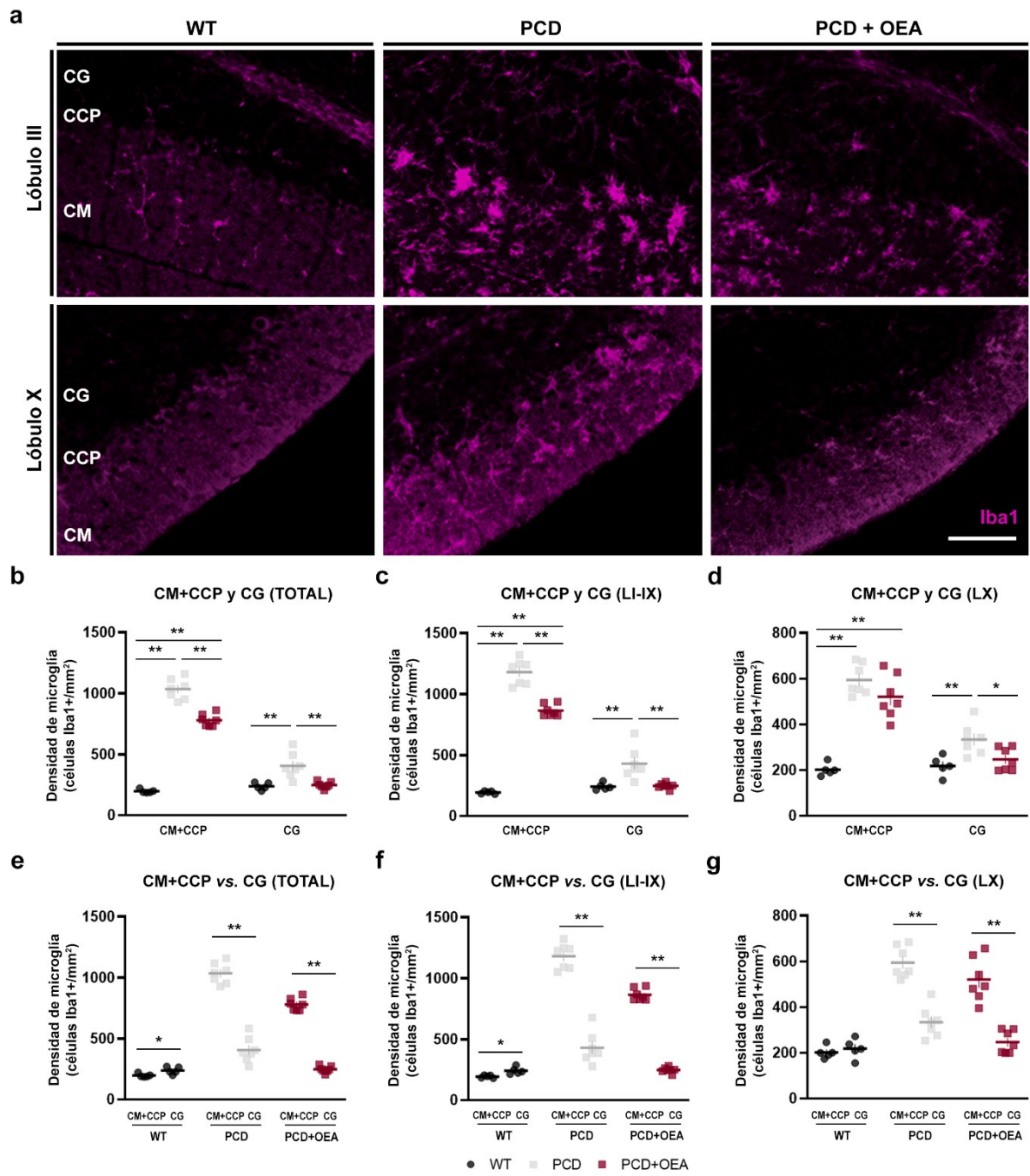


FIGURA 29 | Efecto del tratamiento con OEA en la densidad de microglía por capas de la corteza cerebelosa a P30. (a) Ampliaciones de la Figura 28 donde se observa la microglía (Iba1, magenta) en las tres capas de la corteza cerebelosa de animales WT, PCD sin tratar y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12). (b-d) Cuantificación de la densidad de microglía por capas de forma total (b), en los lóbulos del I al IX (c) y en el lóbulo X (d), comparándola entre los tres grupos experimentales. (e-g) Cuantificación de la microglía y comparación por capas de forma total (e), en los lóbulos del I al IX (f) y en el lóbulo X (g) para cada uno de los tres grupos experimentales. Nótese la distribución preferente de la microglía en las capas más externas de la corteza cerebelosa en los ratones mutantes tanto a nivel global como en los lóbulos del I al IX, así como el efecto de la OEA, que la asemeja a la de los animales WT. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 10). Barra de escala: 50 μ m. CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular.

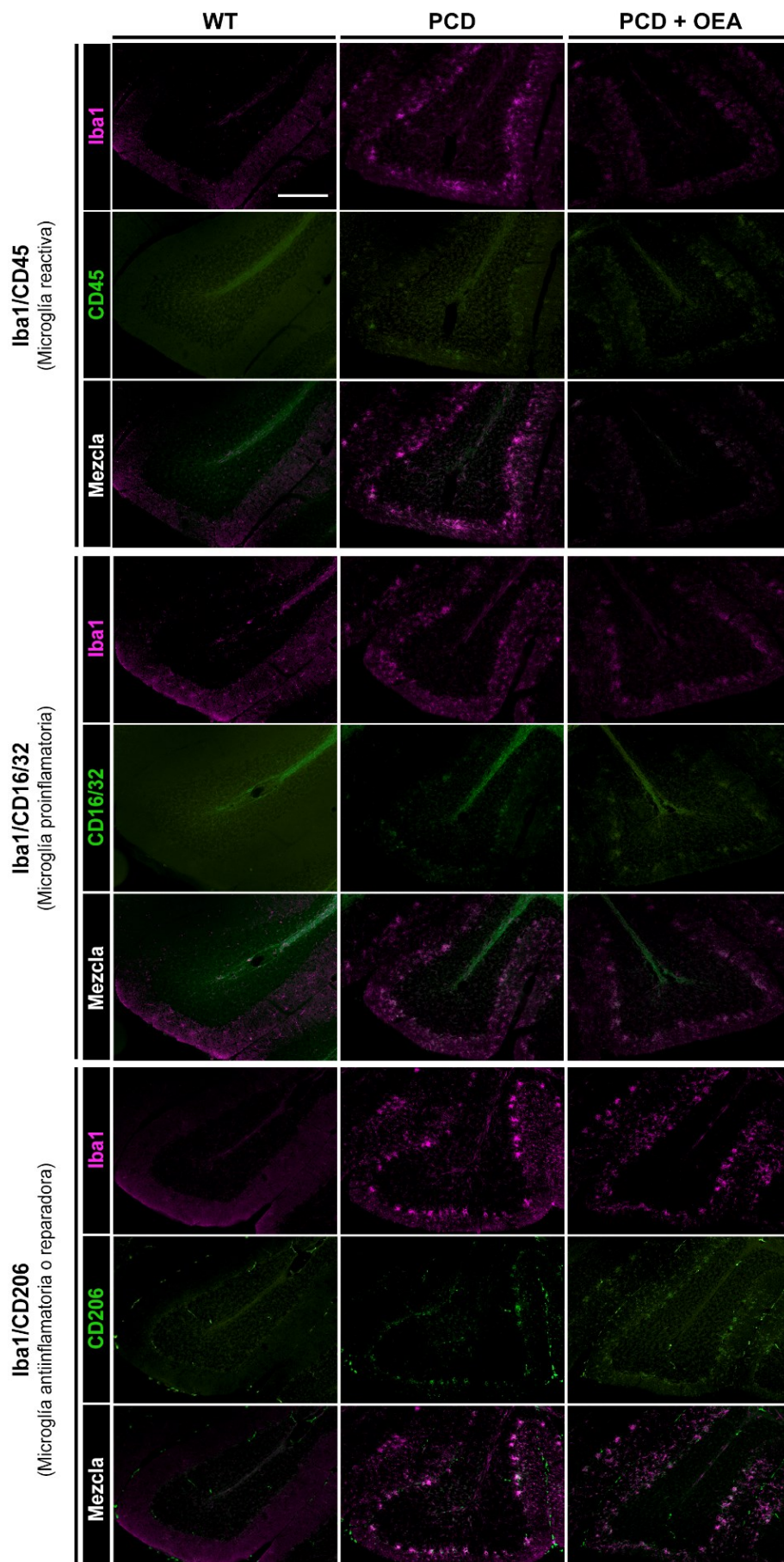


FIGURA 30 (Pie de figura en la siguiente página)

◀ **FIGURA 30 | Inmunofluorescencia para las diferentes poblaciones microgliales** (Iba1, magenta) caracterizadas por la expresión de marcadores de microglía reactiva (CD45, verde), microglía inflamatoria (CD16/32, verde) y microglía reparadora o antiinflamatoria (CD206, verde) en el cerebelo de animales WT, PCD sin tratamiento y PCD tratados con OEA. Barra de escala: 100 μ m.

Para una visualización general de los resultados, se han elaborado unas gráficas tipo prisma donde se ha representado de forma global el porcentaje de las diferentes poblaciones microgliales analizadas para cada grupo experimental por separado (Figura 31). En ellas podemos observar a simple vista que en el grupo de animales WT el porcentaje de células microgliales que expresan los diferentes marcadores es mucho menor en todos los casos, comparado con los de los grupos de los animales PCD (Figura 31). Además, en el caso de los ratones PCD tratados con OEA, se aprecia un aumento en el porcentaje de células microgliales CD206+, correspondientes a microglía de tipo antiinflamatorio (Figura 31 c).

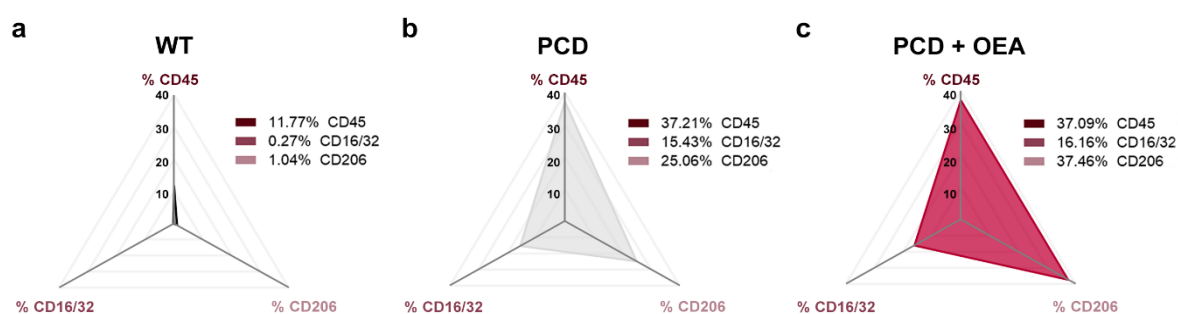


FIGURA 31 | Representación global del efecto del tratamiento con OEA en el porcentaje de las diferentes poblaciones microgliales del cerebelo a P30. (a-c) Gráficos en forma de prisma en cuyos vértices están representados los porcentajes totales de las poblaciones CD45/Iba1+, CD16/32/Iba1+ y CD206/Iba1+ en el cerebelo de animales WT (a), PCD sin tratar (b) y PCD tratados con OEA (c).

Los análisis específicos para cada población microglial se explicarán por separado para cada marcador para facilitar la comprensión de los resultados. En todos ellos se describirán en primer lugar las comparaciones entre los tres grupos experimentales de forma global, separado por lóbulos y separado por capas. A continuación, se detallarán las diferencias observadas en el análisis por lóbulos y por capas dentro de cada grupo experimental.

En el análisis global del porcentaje de células **CD45+** dentro de la población de células Iba1+ del vermis cerebeloso (Figura 32 a-e), se observó un aumento en los dos grupos PCD comparado con el grupo de animales WT, pero no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales mutantes (Figura 32 a; valores *p* en Apéndice III, 11). Estos resultados también se observaron en el análisis diferencial por

lóbulos (lóbulos I al IX y lóbulo X por separado; Figura 32 b) y en las capas CM+CCP del análisis por capas (Figura 32 c; Apéndice III, 11), mostrando los dos grupos de ratones PCD un mayor porcentaje de células CD45+ con respecto a los animales WT en todos los casos (Figura 32 b, c). Curiosamente, en el caso concreto de la CG del análisis por capas, el tratamiento con OEA consiguió reducir el porcentaje de microglía reactiva en los animales PCD tratados hasta valores similares a los de los animales WT (Figura 32 c; Apéndice III, 11). A continuación, se evaluaron las posibles diferencias en el porcentaje de microglía reactiva (CD45/Iba1+) entre los lóbulos I al IX y lóbulo X para cada grupo experimental (Figura 32 d). Únicamente se detectaron diferencias entre los lóbulos en el grupo de animales WT, siendo mayor el porcentaje en los lóbulos I al IX (Figura 32 d, Apéndice III, 11). Por último, también se analizó de forma diferencial la distribución de la microglía reactiva en las diferentes capas de la corteza cerebelosa (Figura 32 e). En este caso, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos experimentales (Figura 32 e, Apéndice III, 10). Curiosamente, a diferencia de los animales WT donde esta población microglial se localizó preferentemente en la capa más interna de la corteza cerebelosa (la CG), en los dos grupos de ratones mutantes se observó mayor presencia en las capas más externas (la CM y la CCP; Figura 32 e).

En relación con el análisis global de la población microglial positiva para **CD16/32** (Figura 32 f-j), al igual que en el caso anterior, no se observó un claro efecto tras el tratamiento con OEA (Figura 32 f), siendo el porcentaje de esta población de microglía mayor en los dos grupos de animales PCD en comparación con el grupo WT, pero sin detectar diferencias entre el grupo PCD tratado y sin tratar (Figura 32 f; valores *p* en Apéndice III, 12). De nuevo, este mismo resultado se observó en los lóbulos del I al IX del análisis diferencial por lóbulos (Figura 32 g), y en las CM + CCP y CG del análisis diferencial por capas (Figura 32 h; Apéndice III, 12). Únicamente se detectó un efecto parcial del tratamiento con OEA en el LX del análisis por lóbulos, donde el tratamiento con OEA consiguió reducir el aumento del porcentaje que se había observado en el ratón mutante PCD hasta valores similares a los de los animales WT (Figura 32 g; Apéndice III, 12). Al igual que en el análisis del marcador anterior, también se evaluó la distribución de esta población microglial proinflamatoria separada por lóbulos y por capas dentro de cada grupo experimental (Figura 32 i, j). En el análisis por lóbulos (Figura 32 i), se observó un aumento de la población CD16/32+ en los lóbulos del I al IX en comparación con el lóbulo X en ambos grupos animales mutantes, coincidiendo de nuevo con los lóbulos en los que la degeneración es más agresiva (Figura 32 i; Apéndice III, 12). Sin embargo, no se detectaron

diferencias entre lóbulos para el grupo WT, localizándose esta población de microglía proinflamatoria de forma homogénea en todos los lóbulos del vermis cerebeloso (Figura 32 i). Por último, cuando se analizó la distribución de las células microgliales CD16/32+ en las diferentes capas de la corteza cerebelosa (Figura 32 j), únicamente se detectaron diferencias en el grupo de animales PCD tratados con OEA, siendo mayor el porcentaje en las capas externas de la corteza cerebelosa (la CM y la CCP) que en la CG (Figura 32 j; Apéndice III, 12).

En cuanto a la población de células microgliales **CD206+** (Figura 32 k-o), sí que se observó un efecto evidente tras el tratamiento con OEA tanto en el análisis global (Figura 32 k), como en los lóbulos I al IX del análisis diferencial por lóbulos (Figura 32 l) y en las CM y CCP del análisis diferencial por capas (Figura 32 m; valores p en Apéndice III, 13). En todos estos análisis, se observó un incremento en el porcentaje de esta población microglial en los dos grupos de ratones PCD en comparación con el grupo WT (Figura 32 k-m), siguiendo el mismo patrón que los marcadores anteriores. En este caso, además, se detectaron diferencias entre los dos grupos de animales PCD, siendo mayor el porcentaje de células microgliales antiinflamatorias en los mutantes tratados con OEA respecto al de los animales PCD sin tratar (Figura 32 k-m; Apéndice III, 13). Únicamente no se observó un efecto tras el tratamiento en el LX del análisis diferencial por lóbulos (Figura 32 l) y en la GL del análisis separado por capas (Figura 32 m; Apéndice III, 13). Finalmente, al igual que con los marcadores descritos previamente, también se evaluaron las diferencias en la distribución de esta población de microglía, de forma separada por lóbulos y por capas para cada grupo experimental (Figura 32 n, o). En este caso, la microglía antiinflamatoria se distribuyó de forma homogénea en todos los lóbulos del vermis en los tres grupos experimentales (Figura 32 n; Apéndice III, 13). En relación a la distribución por capas, se detectaron diferencias en los grupos de animales mutantes, donde el porcentaje de microglía positiva para CC206 fue mayor en las capas externas de la corteza cerebelosa (la CM y la CCP) en comparación con la CG (Figura 32 o; Apéndice III, 13).

En resumen, de forma general en el ratón mutante PCD, independientemente del tratamiento, observamos un mayor porcentaje de las poblaciones microgliales CD45, CD16/32 y CD206 en comparación con los animales WT. Además, algunas de estas poblaciones presentan cierto tropismo hacia los lóbulos donde la degeneración es más agresiva (como ocurre con la microglía proinflamatoria CD16/32+) o hacia las capas externas de la corteza cerebelosa, que es donde tiene lugar la degeneración de las células

de Purkinje (como ocurre con la microglía reactiva CD45+ y la antiinflamatoria CD206+). Por último, el tratamiento con OEA no produjo ningún efecto notable en el porcentaje de las poblaciones microgliales CD45+ y CD16/32+, mientras que incrementó el de microglía antiinflamatoria CD206+. Esto indicaría que el tratamiento con OEA es capaz de modular parcialmente la respuesta de la microglía, aumentando el porcentaje de las poblaciones con un fenotipo neuroprotector o reparador.

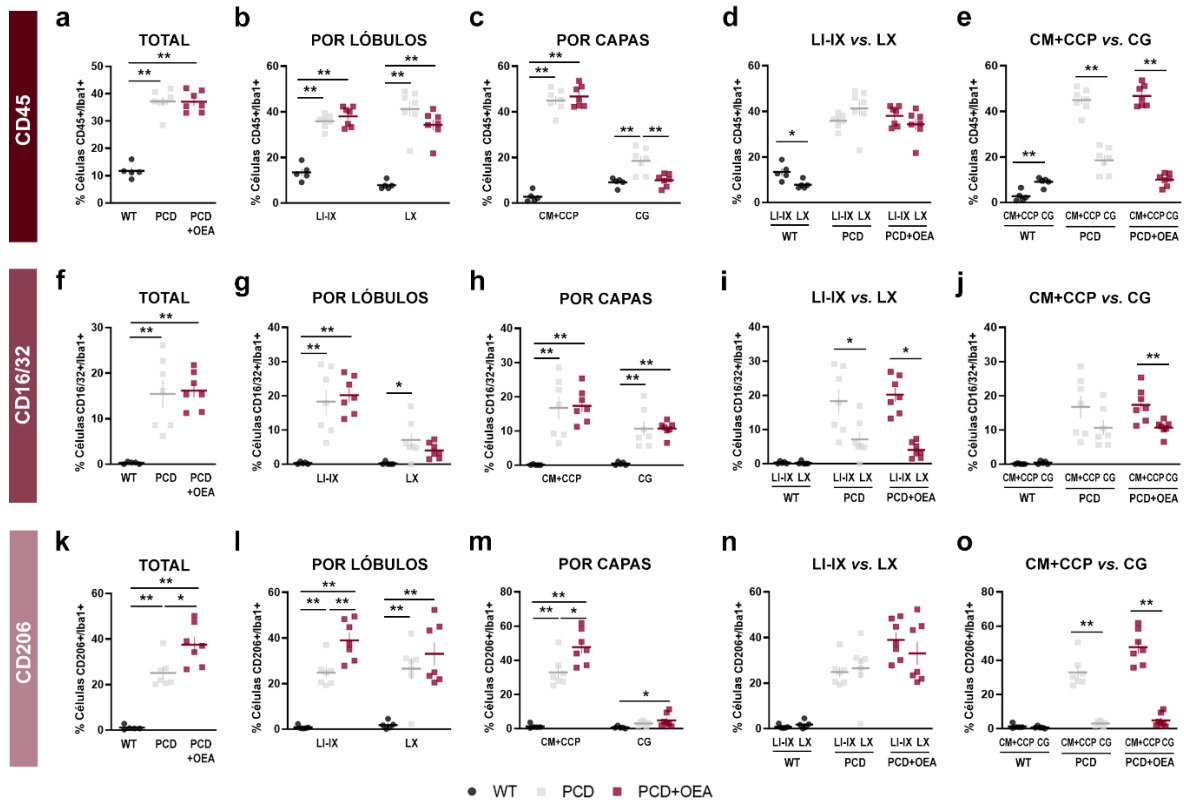


FIGURA 32 | Efecto del tratamiento con OEA en el porcentaje de las diferentes poblaciones microgliales del cerebelo a P30. (a-c) Cuantificación y comparación entre los tres grupos experimentales del porcentaje de microglía reactiva CD45+ de forma global (a), separado por lóbulos (b) y separado por capas (c). (d, e) Distribución de la microglía CD45+ por lóbulos (d) y por capas de la corteza cerebelosa (e) dentro de cada grupo experimental. (f-h) Cuantificación y comparación entre los tres grupos experimentales del porcentaje de microglía proinflamatoria CD16/32+ de forma global (f), separado por lóbulos (g) y separado por capas (h). (i, j) Distribución de la microglía CD16/32+ por lóbulos (i) y por capas de la corteza cerebelosa (j) dentro de cada grupo experimental. (k-m) Cuantificación y comparación entre los tres grupos experimentales del porcentaje de microglía antiinflamatoria CD206+ de forma global (k), separado por lóbulos (l) y separado por capas (m). (n, o) Distribución de la microglía CD206+ en los ratones PCD tratados con OEA tanto en el análisis global como en el diferencial por lóbulos y por capas. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 11-13).

Efecto de la OEA en el reclutamiento de leucocitos

Como se detalló en la Introducción, un estado neuroinflamatorio mantenido puede aumentar el reclutamiento de células del sistema inmunitario periférico hacia el parénquima cerebral (Schwartz y Baruch, 2014), y el cerebelo del ratón mutante PCD no es una excepción (Kyuhou *et al.*, 2006; Del Pilar *et al.*, 2021). Por ello, decidimos evaluar si la disminución del estado inflamatorio tras el tratamiento con OEA también afectaba al grado de infiltración de leucocitos hacia el parénquima cerebeloso. Además, también se realizó el análisis separado por lóbulos (Figura 33). En este caso, se empleó la prueba paramétrica ANOVA de una vía seguida del test *post hoc* de Bonferroni o la prueba *t* de Student (según correspondiese), ya que se obtuvo una $p > 0,05$ en las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, lo que indica homocedasticidad y normalidad.

Los leucocitos se detectaron en todas las capas, lóbulos y grupos experimentales (Figura 33 a). En el caso del vermis completo, se detectó un aumento notable de la densidad de estas células en los animales PCD sin tratar en comparación con los animales WT (Figura 33 b; valores *p* en Apéndice III, 14), coincidiendo con los resultados publicados previamente (Del Pilar *et al.*, 2021). Por su parte, el tratamiento con OEA no solamente redujo la infiltración de leucocitos, sino que determinó valores similares a los observados en los animales WT (Figura 33 b; Apéndice III, 14). Este mismo patrón se observó cuando se comparó la densidad de leucocitos infiltrados en los lóbulos I al IX, y en el lóbulo X, entre los tres grupos experimentales (Figura 33 b; Apéndice III, 14). De esta forma, se detectó un aumento en la densidad de leucocitos en los animales PCD que revirtió a valores similares a los de animales WT tras el tratamiento con OEA (Figura 33 b; Apéndice III, 14).

De forma análoga al estudio de la distribución de la microglía, también se realizó un análisis comparativo de la densidad de leucocitos infiltrados en los lóbulos I al IX y el lóbulo X dentro de cada grupo experimental (Figura 33 c, Apéndice III, 14). En este caso, no se detectaron diferencias en la distribución en ninguno de los grupos experimentales (Figura 33 c; Apéndice III, 14).

Por lo tanto, el tratamiento con OEA disminuye el reclutamiento de leucocitos del sistema inmunitario periférico hacia el cerebelo del ratón PCD.

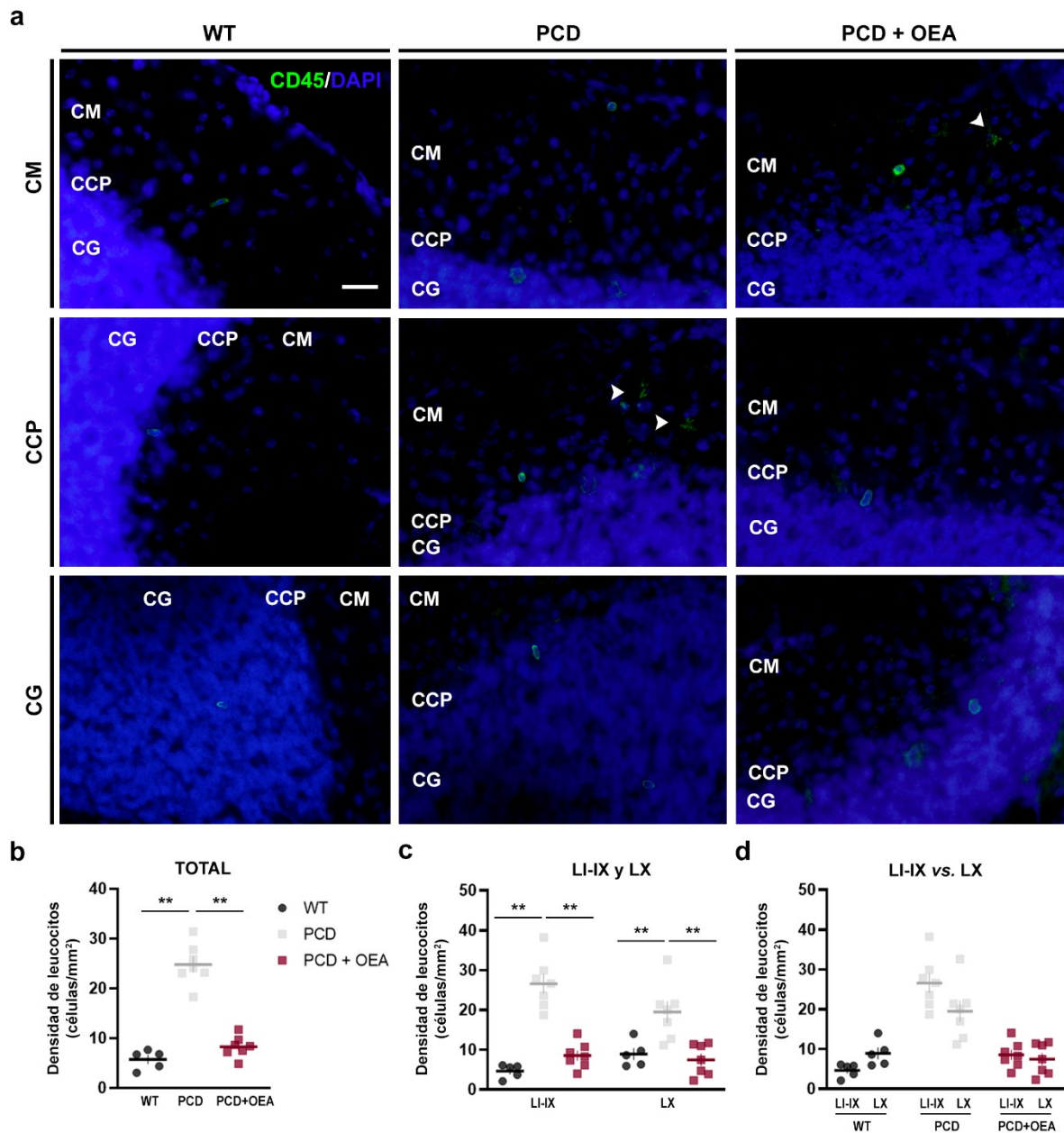


FIGURA 33 | Efecto de la OEA en la infiltración de leucocitos hacia el parénquima cerebeloso a P30. (a) Inmunofluorescencia para CD45 (verde) de las diferentes regiones del vermis cerebeloso donde se observan leucocitos infiltrados en animales WT, PCD y PCD tratados con OEA. Los núcleos están contrateñidos con DAPI (azul). Las puntas de flechas indican microglía (no cuantificada en este análisis). **(b-d)** Comparación de la densidad de leucocitos a nivel global (b), por lóbulos entre grupos experimentales (c) y por lóbulos dentro de cada grupo experimental (d). Como se puede apreciar, el tratamiento con OEA redujo la infiltración leucocitaria en los ratones PCD asemejándola a los WT. ****** $p < 0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 14). Barra de escala: 20 μm . CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular.

EFFECTO DE LA OEA EN LA ACTIVIDAD ELECTROFISIOLÓGICA DEL CEREBELO

Con el fin de evaluar una posible mejora tras el tratamiento con OEA en el ratón PCD no solamente a nivel morfológico sino también a nivel funcional, se analizó la actividad electrofisiológica de las células de Purkinje y de los NCP en los días P25 y P30 en los animales WT, los PCD sin tratar y los PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12). Para ello, en primer lugar, fue necesario adaptar las coordenadas estereotácticas del cerebelo y los NCP para esos ratones jóvenes, antes de realizar los registros electrofisiológicos como tal. Debido al número reducido de animales utilizados en estos experimentos (n=1-2 por grupo experimental), en este apartado únicamente se describirán los resultados obtenidos sin realizar ningún tipo de tratamiento estadístico de los datos.

Ajuste de coordenadas estereotácticas y localización de los NCP

Para comprobar la aproximación del ajuste de las coordenadas estereotácticas utilizado para ratones jóvenes de aproximadamente 10 g de peso corporal, como se explicó en el apartado de Material y Métodos, se realizaron inyecciones intracerebelosas de trazador CTB conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 555 en las coordenadas específicas calculadas en base a la distancia real entre *bregma* y *lambda* (Figura 34 a-d). Como se observa en la Figura 34 c y d, ya a nivel macroscópico se pudo comprobar si la inyección se había realizado correctamente y si se encontraba en la localización deseada en el eje anteroposterior (Figura 34 c, d).

En todas las inyecciones realizadas, las coordenadas estereotácticas calculadas colocalizaron con los NCP en los ejes anteroposterior y mediolateral (Figura 34 e). Sin embargo, en el eje dorsoventral, la localización real de los NCP siempre fue en un valor de Z más profundo al calculado (Figura 34 e). Por ello, cuando se realizaron los registros electrofisiológicos se emplearon siempre las coordenadas estereotácticas ajustadas para los ejes anteroposterior y mediolateral, pero en el eje dorsoventral se pudo avanzar con el electrodo a un valor más profundo sin riesgo de dañar el tronco encefálico.

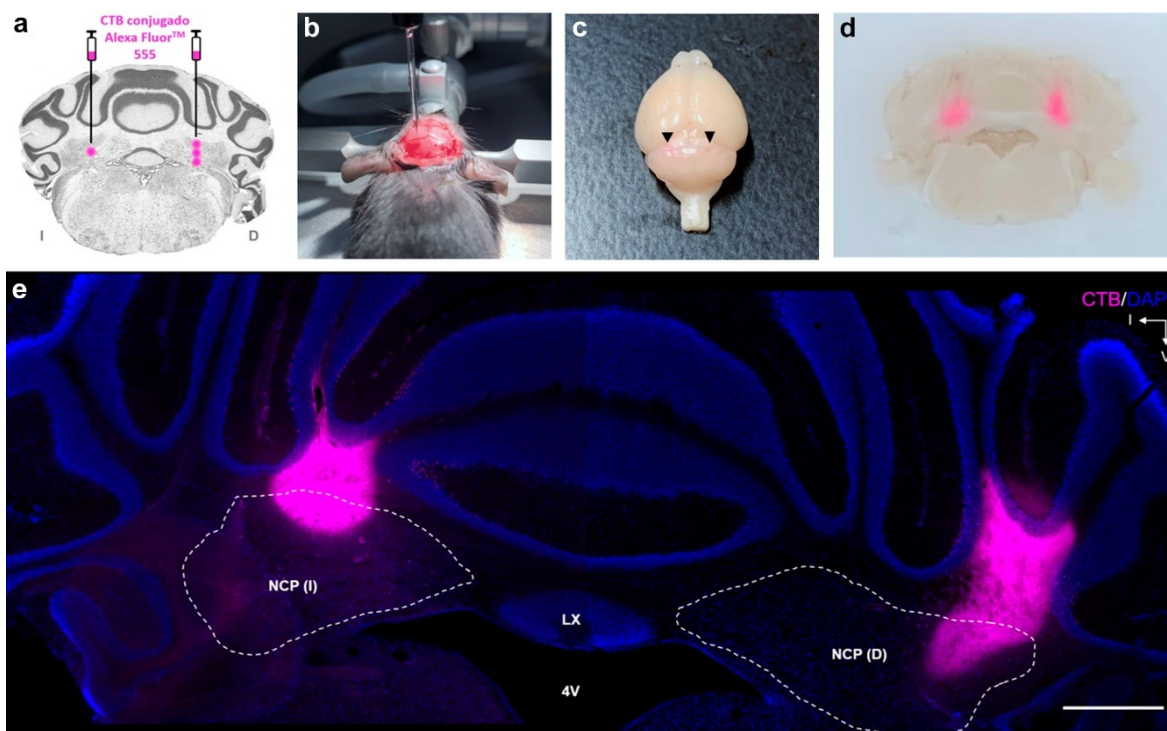


FIGURA 34 | Comprobación del ajuste de coordenadas estereotácticas. (a, b) Diseño experimental (a) y vista dorsal (b) de la cirugía estereotáctica para las inyecciones intracerebelosas con CTB. (c) Vista dorsal de un encefalo de ratón (~10 g de peso corporal) donde están indicadas con puntas de flecha las regiones en las que se realizaron las inyecciones del trazador. (d) Corte coronal del cerebelo de un ratón embebido en Tissue-Teck OCT donde se observan macroscópicamente las dos inyecciones intracerebelosas y el cuarto ventrículo. (e) Microfotografía de una sección coronal de cerebelo de ratón donde se observa el trazador CTB (magenta) y los núcleos celulares contrateñidos con DAPI (azul). La línea punteada delimita los NCP. Obsérvese cómo la inyección del trazador CTB en las coordenadas estereotácticas ajustadas colocaliza en el eje anteroposterior y mediolateral. Barra de escala: 1000 μ m. 4V, cuarto ventrículo; CTB, subunidad B de la toxina del cólera (del inglés Cholera Toxin Subunit B); D, derecha; I, izquierda; LX, lóbulo X; NCP, núcleos cerebelosos profundos; V, ventral.

Análisis electrofisiológico

A $P25 \pm 1$ día, se obtuvieron resultados preliminares sobre la actividad electrofisiológica de las células de Purkinje y los NCP (Figura 35) de animales WT (n=2), PCD sin tratamiento (n=2) y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12; n=1). En relación con los registros electrofisiológicos de las células de Purkinje (Figura 35 a-d), en primer lugar, cabe destacar la gran dificultad para localizar estas neuronas no solamente en los ratones PCD donde la densidad es menor, sino también en los animales WT. Por ello, el número de células de Purkinje registradas es mucho menor que el de las neuronas de los NCP. De forma general, parece que el ratón mutante PCD presenta una menor media y moda en la frecuencia de disparo (Figura 35 b, c) y, tras el tratamiento con OEA, estos valores serían incluso menores (Figura 35 b, c). En el análisis del ISI CV, parámetro que mide la irregularidad del disparo de la célula registrada, los ratones PCD presentarían una

gran variabilidad de valores, indicando la existencia de células que disparan de forma regular y otras que disparan de forma más irregular (Figura 35 d). Tras el tratamiento con OEA parece que se reduce la variabilidad del ISI CV, pero no podemos extraer ningún tipo de conclusión al respecto (Figura 35 d). Por otro lado, en relación con el registro de actividad electrofisiológica de los NCP (Figura 35 e-i), se obtuvo un mayor número de células registradas, como se muestra en los gráficos de la Figura 35 g-i. En general, parece que las células de los NCP del ratón mutante PCD también presentarían unas frecuencias de disparo más bajas que los animales WT, pero en este caso el tratamiento con OEA aumentaría ligeramente esos valores (Figura 35 g, h). Finalmente, en cuanto al análisis del ISI CV (Figura 35 i), no parecen existir diferencias entre ninguno de los tres grupos experimentales, aunque es necesario aumentar el tamaño muestral y el número de neuronas registradas para obtener resultados concluyentes (Figura 35 i).

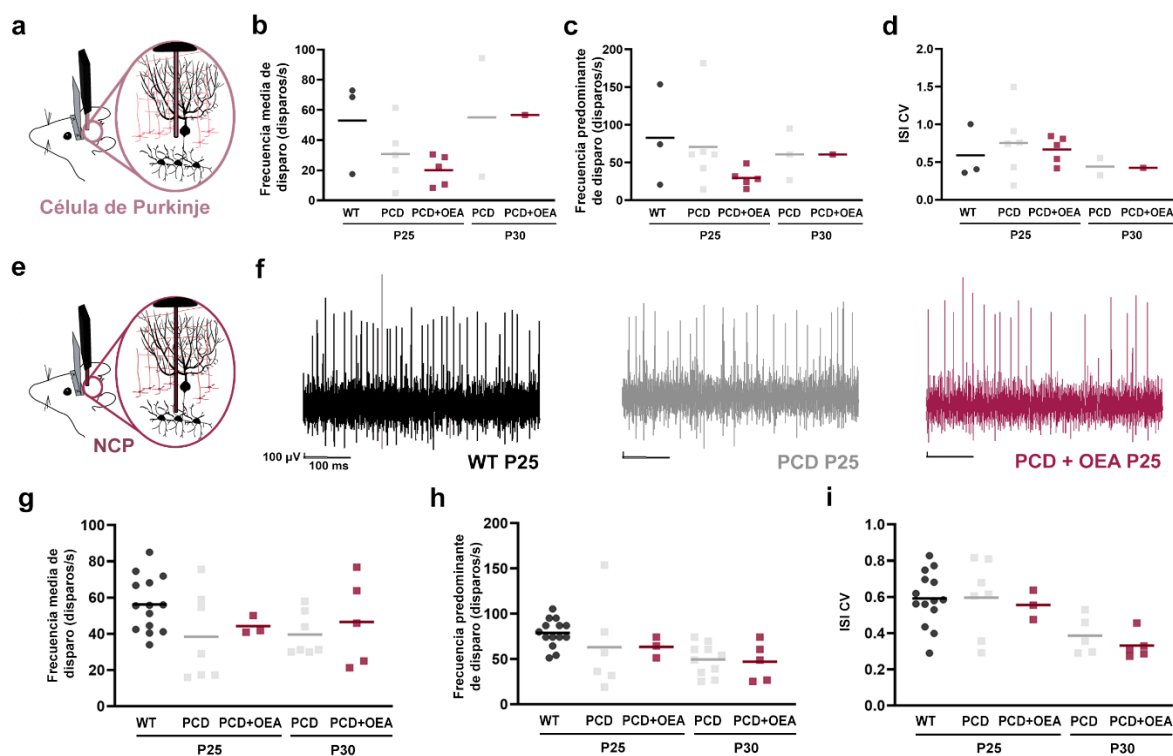


FIGURA 35 | Efecto del tratamiento con OEA en la actividad electrofisiológica del cerebelo del ratón PCD a P25 y P30. (a) Representación esquemática del registro electrofisiológico de células de Purkinje en animal despierto con la cabeza fija. (b-d) Propiedades electrofisiológicas de la actividad neuronal de células de Purkinje: frecuencia de disparo media (b), frecuencia de disparo predominante (c) y parámetro de irregularidad ISI CV (d). (e-f) Representación esquemática del registro electrofisiológico de NCP en animal despierto con la cabeza fija (e) y ejemplos de trazos de la actividad neuronal de NCP a P25 de un animal WT (negro), un animal PCD sin tratamiento (gris) y un animal PCD tratado con OEA (granate; f). (g-i) Propiedades electrofisiológicas de la actividad de neuronas de los NCP: frecuencia de disparo media (g), frecuencia de disparo predominante (h) y parámetro de irregularidad ISI CV (i). Barra de escala: 100 μ m (vertical), 100 ms (horizontal).

Con respecto al análisis de la actividad electrofisiológica de las células de Purkinje y los NCP a $P30 \pm 1$ día, únicamente se pudieron realizar registros en un animal PCD sin tratamiento y un animal PCD tratado; además, el número de células fue muy limitado. Como se observa en los gráficos, solamente se localizaron tres células de Purkinje en ambos animales, y por ello este análisis no se tendrá en cuenta (Figura 35 a-d). En cuanto a los NCP, se obtuvo un mayor número de registros, pero con los datos disponibles no parece existir diferencias entre los animales PCD sin tratar y los tratados con OEA (Figura 35 e-i).

A pesar de que los resultados obtenidos no pueden ser utilizados para extraer unas conclusiones sobre la actividad electrofisiológica del cerebelo del ratón PCD ni el posible efecto de la OEA sobre la misma, el ajuste de la técnica y de las cirugías estereotácticas ha supuesto los primeros pasos hacia el estudio de la fisiología cerebelosa en este modelo.

EFFECTO DE LA OEA EN EL COMPORTAMIENTO DEL RATÓN PCD

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron alteraciones en el comportamiento motor, cognitivo y social asociados a la degeneración cerebelosa a partir de la tercera semana de desarrollo postnatal en el ratón PCD (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por este motivo, teniendo en cuenta los efectos neuroprotectores de la OEA observados en la citoarquitectura y supervivencia de las células de Purkinje, quisimos comprobar si existía también una mejora en las funciones relacionadas con el cerebelo. Para ello, evaluamos el comportamiento general, motor, cognitivo y social a lo largo del proceso neurodegenerativo (P15, P17, P22, P30 y P40) en animales WT, PCD sin tratamiento y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12). En general, se empleó el test ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni o *t* de Student en función de las comparaciones, excepto en la prueba de comportamiento motor donde se aplicó un ANOVA de una vía de medidas repetidas debido a las características del experimento.

Comportamiento motor

La habilidad y coordinación motora de los ratones se evaluó mediante la prueba de la varilla giratoria o *Rotarod* teniendo en cuenta únicamente el parámetro de latencia a la caída; es decir, tiempo en el que el animal se mantuvo en la varilla antes de caer (Figura 36 a; (Schönfeld *et al.*, 2017; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Tras el análisis estadístico ANOVA de una vía con medidas repetidas se detectaron diferencias estadísticamente

significativas dentro de los factores “edad de la prueba” y “grupo experimental” por separado, y una interacción entre ambos factores (Figura 36 b; valores p en Apéndice III, 15). En general, se puede observar cómo el comportamiento motor de los diferentes grupos experimentales diverge con el tiempo (Figura 36 b; Apéndice III, 15). En concreto, las diferencias globales más evidentes se encuentran entre el grupo de animales WT y los dos grupos de animales PCD (Figura 36 b). La interacción entre la “edad de la prueba” y el “grupo experimental” indica que ambos factores están influyendo en los resultados observados y, por lo tanto, estrictamente no debería realizarse un análisis estadístico individual de cada variable. Sin embargo, por sugerencia de revisores externos y con el fin de obtener la mayor cantidad de información relevante en relación con estos experimentos, se analizaron las diferencias entre los tres grupos experimentales para cada edad en la que se realizó la prueba del *Rotarod*. A medida que se repitió la prueba en los diferentes días en los que se evaluó el comportamiento motor, los animales WT presentaron mejores resultados en la realización de la misma hasta P30 donde su ejecución se estabilizó, probablemente debido a un proceso de aprendizaje (Figura 36 b). Sin embargo, en el grupo de animales PCD se observó una trayectoria similar a la de los animales WT hasta P17, pero a partir de esta edad el comportamiento motor se vio afectado mostrando diferencias estadísticamente significativas en todas las edades analizadas comparado con los animales WT (Figura 36 b; Apéndice III, 15). Curiosamente, la trayectoria de los animales PCD tratados con OEA fue similar a la de los animales WT hasta P22, pero a partir de esta edad, también se observó una disminución en la capacidad motora respecto a los animales WT (Figura 36 b; Apéndice III, 15). Sin embargo, a pesar de ello, los animales PCD tratados con OEA mejoraron en la realización de la prueba *Rotarod* a P22 y P30 con respecto a los que no recibieron tratamiento (Figura 36 b; Apéndice III, 15). Por último, a P40 no se detectaron diferencias entre el comportamiento motor de los dos grupos de los animales PCD (Figura 36 b; Apéndice III, 15), coincidiendo con los resultados obtenidos en el análisis histológico (Figura 22).

Por lo tanto, el tratamiento con OEA mejora parcialmente el comportamiento motor del ratón PCD, de manera que los animales en los que se administró el fármaco mostraron un comportamiento intermedio entre los animales WT y los animales PCD sin tratar hasta P30.

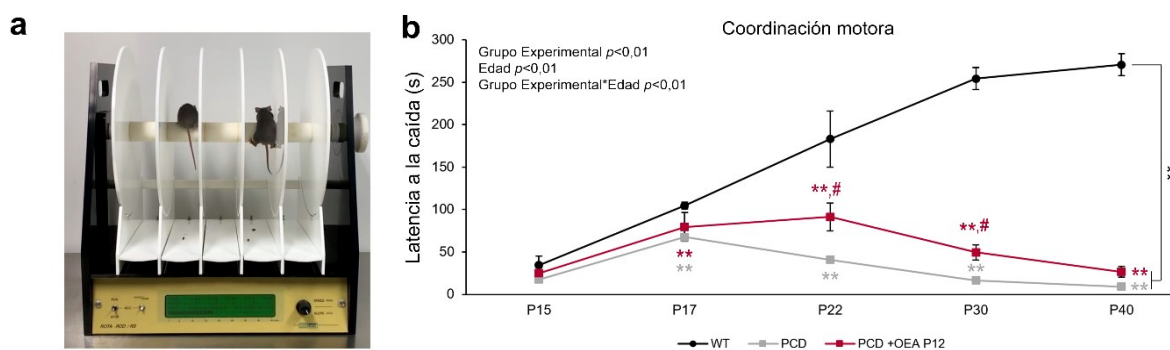


FIGURA 36 | Efecto del tratamiento con OEA en el comportamiento motor del ratón PCD a lo largo del proceso neurodegenerativo. (a) Aparato donde se realizó la prueba del *Rotarod*. **(b)** Representación gráfica de la latencia a la caída en la prueba del *Rotarod* de animales WT, PCD sin tratamiento y PCD tratados con OEA (10 mg/kg, i.p., P12) a P15, P17, P22, P30 y P40. Observese que los ratones PCD tratados con OEA presentan un comportamiento motor intermedio entre los animales WT y los PCD sin tratamiento a P22 y P30. */** $p < 0,05/0,01$ para diferencias entre los grupos de animales PCD y el grupo WT; # $p < 0,05$ para diferencias entre los grupos experimentales de animales PCD (valores p específicos en Apéndice III, 15). Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021.

Comportamiento general

El comportamiento general de los animales se evaluó a través del análisis del tiempo que pasaron realizando limpiezas, exploraciones o alzadas, y desplazándose (Figura 37 a). En general, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales para ninguna de estas medidas a P15 y P17 (Figura 37 b, c; valores p en Apéndice III, 16). Sin embargo, a P22 y P30 los animales PCD sin tratar mostraron siempre un menor tiempo empleado en limpiezas, alzadas o desplazamiento comparado con el tiempo dedicado por los animales WT (Figura 37 d, e; Apéndice III, 16). Por el contrario, los animales PCD tratados con OEA aumentaron el tiempo dedicado a los comportamientos evaluados, mostrando en general valores intermedios entre los observados en los animales WT y PCD sin tratar tanto a P22 (Figura 37 d) como a P30 (Figura 37 e; Apéndice III, 16). Más aún, en algunos casos los ratones PCD tratados con OEA obtuvieron resultados similares a los de los animales WT, como en el desplazamiento a P22 (Figura 37 d; Apéndice III, 16). Por último, a P40 únicamente se detectaron diferencias entre los animales WT y los dos grupos ratones PCD, sin observar cambios entre los tratados con OEA y los no tratados (Figura 37 f; Apéndice III, 16).

En resumen, el tratamiento con OEA normaliza parcialmente el comportamiento general de los ratones PCD a P22 y P30, aunque este efecto no se mantiene a P40. Esto puede observarse gráficamente en la Figura 37 g donde cada triángulo representa una edad de estudio y cada vértice uno de los comportamientos analizados (limpiezas,

exploraciones y desplazamiento). A P15 y P17, no observamos diferencias entre los prismas de cada grupo experimental. A P22, los prismas del grupo WT y PCD + OEA son prácticamente idénticos, mientras que el correspondiente al grupo PCD sin tratar difiere de ambos. A P30, los tres prismas son diferentes, encontrándose el correspondiente a los mutantes tratados con OEA en una posición intermedia entre el de los animales WT y los PCD. Por último, a P40 observamos que esta vez son los prismas de los grupos PCD los que son idénticos, independientemente del tratamiento, y difieren completamente del de los animales WT (Figura 37 g).

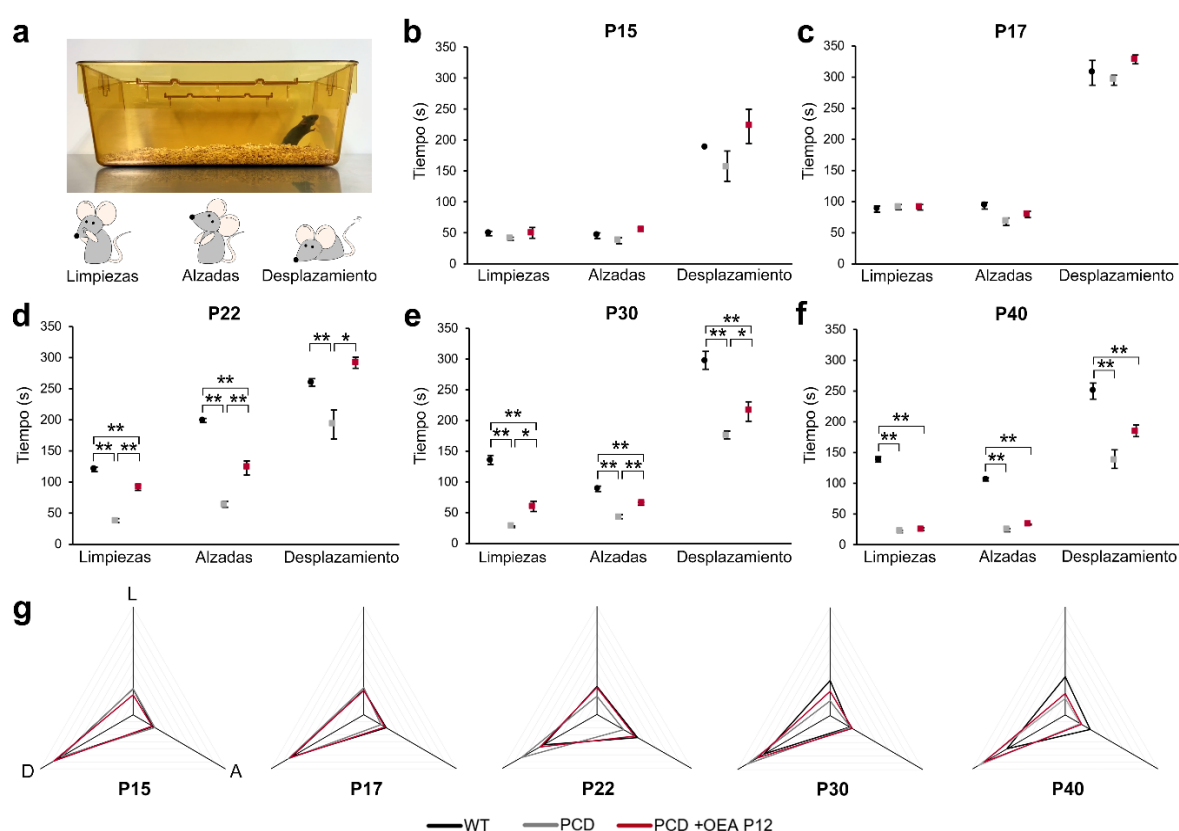


FIGURA 37 | Efecto del tratamiento con OEA en el comportamiento general del ratón PCD a lo largo del proceso neurodegenerativo. (a) En la parte superior, ejemplo de jaula de mantenimiento en la que se realizó el análisis del comportamiento motor; en la parte inferior representaciones de los comportamientos analizados: limpiezas, exploraciones o alzadas y desplazamiento. (b-f) Cuantificación del tiempo dedicado a la realización de limpiezas, exploraciones o alzadas en animales WT, PCD sin tratamiento y PCD tratados con OEA a P15 (b), P17 (c), P22 (d), P30 (e) y P40 (f). (g) Prismas del comportamiento general observado en los diferentes grupos experimentales a las diferentes edades analizadas; cada vértice indica uno de los comportamientos analizados: A, alzadas, D, desplazamiento, L, limpiezas. Nótese que el comportamiento general de los ratones PCD tratados con OEA es similar al de animales WT a P22 y P30. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 16). Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021.

Memoria de reconocimiento

Para la evaluación de la memoria de reconocimiento, se empleó el test NOR (Figura 38 a) y se analizó tanto el porcentaje de tiempo dedicado a la interacción con un objeto

conocido y un objeto novedoso, como el índice DI (ver Material y Métodos). Esta prueba detecta alteraciones en la memoria de reconocimiento, ya que los ratones, como animales exploradores, tienden a dedicar más tiempo a la exploración de objetos novedosos. Cuando hay una alteración en la memoria se pierde la capacidad de discriminar entre lo conocido y lo novedoso, y los animales pasan el mismo tiempo con ambos objetos o incluso más con los conocidos (Ennaceur y Delacour, 1988; Ennaceur, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Así, en relación al porcentaje de tiempo interaccionando con uno u otro objeto, los resultados obtenidos a P17 y P22 mostraron que los tres grupos experimentales dedicaron mayor tiempo al objeto novedoso respecto al objeto conocido (Figura 38 b, c; valores *p* en Apéndice III, 17). A P30 y P40, los animales WT mantuvieron el comportamiento descrito anteriormente (Figura 38 d, e), mientras que en los animales PCD sin tratamiento no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo dedicado al objeto novedoso respecto al conocido (Figura 38 d, e; Apéndice III, 17). Sin embargo, la memoria de reconocimiento fue parcialmente preservada hasta P30 en los ratones PCD que recibieron el tratamiento con OEA (Figura 38 d) aunque este efecto no se observó a P40 (Figura 38 e; Apéndice III, 17).

Los resultados anteriores también se pueden comprobar mediante el análisis del DI. A P17, P22 y P30 todos los grupos experimentales presentaron un DI positivo, lo que significa una capacidad de discriminación entre objetos novedosos y familiares, es decir, un correcto funcionamiento de la memoria de reconocimiento (Figura 38 f). En el caso de los animales PCD sin tratamiento, el DI fue próximo a 0 a P30 lo que indica una ausencia de discriminación. A pesar de ello, se observaron diferencias en el valor de DI a estas edades entre el grupo de animales PCD y los grupos WT y PCD + OEA, siendo en estos últimos el valor de DI más alto comparado con los animales PCD sin tratar (Figura 38 f; Apéndice III, 17). Por último, a P40 se detectaron diferencias entre los tres grupos experimentales, mostrando valores próximos a 0 los dos grupos de ratones PCD y valores positivos los animales WT (Figura 38 f; Apéndice III, 17).

Además, también se analizó el número de visitas totales a ambos objetos en los tres grupos experimentales a P30 y P40 con el fin de detectar algún tipo de influencia de la ataxia en la realización de la prueba y la obtención de los resultados detallados previamente (Figura 38 g). A P30 no se detectó ninguna diferencia significativa entre los tres grupos experimentales, a pesar de que a esta edad los ratones PCD ya muestran una

ataxia moderada debido a la degeneración del cerebelo (Figura 38 g; Apéndice III, 17). Sin embargo, a P40 los animales PCD sin tratamiento mostraron un menor número de visitas comparado con los animales WT y los PCD tratados con OEA, lo que podría estar condicionando los resultados obtenidos a esa edad. En cualquier caso, este resultado también indicaría un efecto positivo de la OEA (Figura 38 g; Apéndice III, 17).

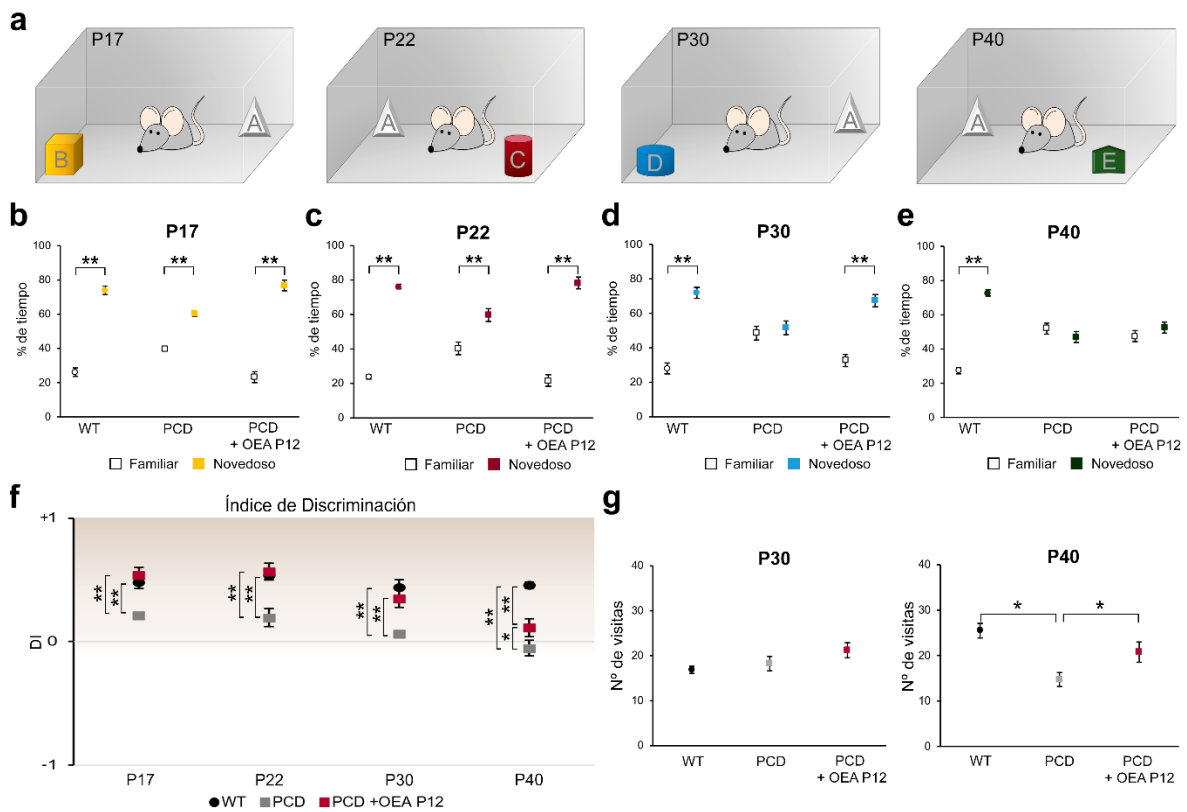


FIGURA 38 | Efecto del tratamiento con OEA en la memoria de reconocimiento a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD. (a) Ilustraciones de la prueba de comportamiento NOR en el que se representa la disposición del objeto familiar (A) y los objetos novedosos (B-E) en las diferentes edades analizadas. (b-e) Cuantificación del porcentaje de tiempo dedicado a interactuar con el objeto novedoso y el familiar de los grupos experimentales WT, PCD y PCD tratados con OEA a P17 (b), P22 (c), P30 (d) y P40 (e). (f) Representación gráfica del índice de discriminación para los grupos experimentales y edades de análisis mencionadas anteriormente. (g) Número total de visitas a ambos objetos a P30 y P40. Como se puede apreciar en la figura, el tratamiento con OEA mejora la memoria de reconocimiento en los ratones PCD al menos hasta P30. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 17). Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021.

De nuevo, con estos resultados observamos que el tratamiento con OEA preserva la memoria de reconocimiento en los ratones mutantes PCD hasta P30, aunque no consigue mantenerla a P40, coincidiendo con los resultados descritos anteriormente tanto a nivel histológico (Figura 22) como en el comportamiento motor y general (Figuras 36 y 37).

Comportamiento social

El comportamiento social se evaluó mediante la prueba de preferencia social y, al igual que en la prueba anterior, se analizó el porcentaje de tiempo que el animal dedicó a la interacción con el animal y con el objeto, y el índice SI (Figura 39 a; Ver Material y Métodos). Los animales WT mostraron una preferencia social en todas las edades analizadas (Figura 39 b-f; valores *p* en Apéndice III, 18). Sin embargo, en los animales PCD sin tratamiento únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas a P15 (Figura 39 b) no observándose diferencias en el resto de edades analizadas (Figura 39 c-f; Apéndice III, 18). Curiosamente, los animales PCD tratados con OEA mantuvieron la preferencia social hasta P30, observándose un mayor tiempo dedicado a la interacción con el animal respecto al objeto (Figura 39 b-e). Sin embargo, este comportamiento no se mantuvo hasta P40 (Figura 39 f; Apéndice III, 18).

En cuanto al análisis del SI, los tres grupos experimentales obtuvieron una puntuación positiva a P15, P17 y P22 indicando una cierta preferencia social (Figura 39 g), aunque se detectaron diferencias en los valores de este índice entre el grupo de animales PCD sin tratar y los grupos de ratones WT y PCD + OEA (Figura 39 g; Apéndice III, 18). A P30 y P40, los ratones PCD mostraron una ausencia total de preferencia social con valores del $SI \leq 0$, mientras que los ratones PCD tratados con OEA presentaron un valor de SI intermedio entre el de los animales WT y PCD sin tratar, siendo este especialmente bajo a P40 (Figura 39 g; Apéndice III, 18).

Por último, también analizamos el número de visitas totales tanto al animal como al objeto a P30 y P40, pero en este caso únicamente se detectó una reducción en el número de visitas en el grupo de animales PCD sin tratar a P40 respecto a los animales WT, reflejándose así un cierto efecto positivo de la OEA también en el número de visitas (Figura 39 h; Apéndice III, 18).

De esta forma, al igual que en el resto de funciones cerebelosas evaluadas, el tratamiento con OEA consiguió prevenir las alteraciones sociales observadas en el ratón mutante PCD a P17, P22 y P30, pero no se mantuvo hasta P40.

Por lo tanto, el tratamiento con OEA no solamente produce un efecto neuroprotector en la supervivencia y citoarquitectura de las células de Purkinje, sino que además esto se traduce en una mejora en las funciones cerebelosas, al menos hasta P30.

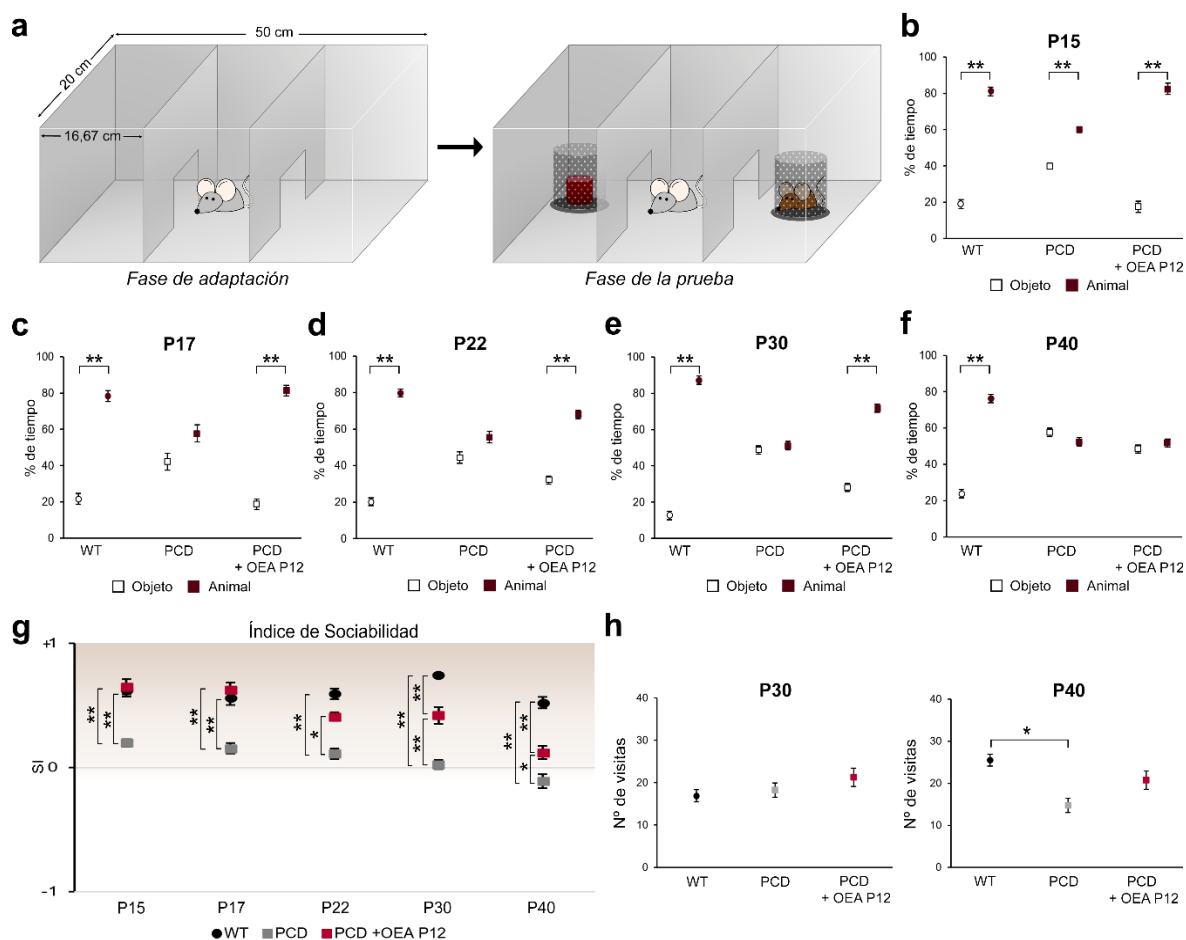


FIGURA 39 | Efecto del tratamiento con OEA en el comportamiento social a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD. (a) Ilustraciones de la prueba de preferencia social. (b-f) Cuantificación del porcentaje de tiempo dedicado a interactuar con el animal y el objeto en los grupos experimentales WT, PCD y PCD tratados con OEA a P15 (b), P17 (c), P22 (d), P30 (e) y P40 (f). (g) Representación gráfica del índice de sociabilidad para los grupos experimentales y edades de análisis mencionadas anteriormente. (h) Número total de visitas al animal y objeto a P30 y P40. Como se puede apreciar, el tratamiento con OEA mejora el comportamiento social de los ratones PCD, al menos hasta P30. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 18). Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021.

IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR PPAR α EN LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON OEA

Con el fin de evaluar la participación del receptor principal de la OEA en los efectos observados a nivel histológico y del comportamiento en el ratón PCD, empleamos un inhibidor del receptor PPAR α , el GW6471, previamente al tratamiento con OEA y realizamos los mismos análisis sobre su posible efecto en la morfología y densidad de las células de Purkinje y sobre el comportamiento motor, cognitivo y social a P30 (Figura 40). En este caso, los grupos experimentales fueron PCD sin tratamiento, PCD tratado con OEA (10 mg/kg, i.p., P12) y PCD tratado con GW6471 (2,5 mg/kg, i.p. 15 min antes del

tratamiento con OEA) y OEA (10 mg/kg, i.p., P12). Los análisis estadísticos realizados en estos experimentos fueron el ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni o *t* de Student, en función de la comparación.

Análisis histológico

Cuando se empleó el inhibidor de los receptores PPAR α se produjo una eliminación completa de los efectos que previamente se habían observado tras el tratamiento con OEA en todas las variables relacionadas con la densidad y morfología de las células de Purkinje (Figura 40 a-g; valores *p* en Apéndice III, 19). Curiosamente, en algunas de las variables como en la longitud del árbol dendrítico (Figura 40 d) y la supervivencia de las células de Purkinje (Figura 40 g), incluso se obtuvieron valores inferiores a los del PCD sin tratar (ver Discusión; Apéndice III, 19).

Análisis del comportamiento

En cuanto a la evaluación del comportamiento motor, cognitivo y social, cuando se inhibía el receptor PPAR α antes del tratamiento con OEA, no se detectaron los efectos propios del fármaco en el comportamiento a P30 (Figura 40 h-k; valores *p* en Apéndice III, 20). Este fenómeno se observó en la prueba de habilidad motora *Rotarod* (Figura 40 h), en el comportamiento general (Figura 40 i), en la prueba NOR (Figura 40 j) y en el test de preferencia social (Figura 40 k; Apéndice III, 20).

Por lo tanto, el efecto neuroprotector del tratamiento con OEA en la supervivencia y morfología de las células de Purkinje y en el mantenimiento de las funciones cerebelosas en el ratón PCD parece estar mediado principalmente por los receptores PPAR α .

FIGURA 40 | Papel de los receptores PPAR α en el efecto neuroprotector del tratamiento con OEA en el ratón PCD a P30. (a, b) Inmunofluorescencia para calbindina (Cb28k, magenta) de una sección sagital de vermis cerebeloso (a) y de una célula de Purkinje (b) de un animal tratado con el inhibidor del receptor PPAR α GW6471 (2,5 mg/kg, i.p.) y OEA (10 mg/kg, i.p., P12). (c-g) Análisis de las variables morfológicas y de supervivencia de las células de Purkinje en animales PCD sin tratar, PCD tratados con OEA y PCD tratados con GW6471 y OEA a P30. (h-k) Resultados de las pruebas de comportamiento motor (h), general (i), memoria de reconocimiento (j) y preferencia social (k) a P30. Nótese que la inhibición de los receptores PPAR α elimina los efectos observados de la OEA a nivel histológico y del comportamiento. */** *p* < 0,05/0,01 (valores *p* específicos en Apéndice III, 19 y 20). Barra de escala: 500 μ m (a), 20 μ m (b). D, dorsal; P, posterior. Modificado de Pérez-Martín *et al.*, 2021. ►

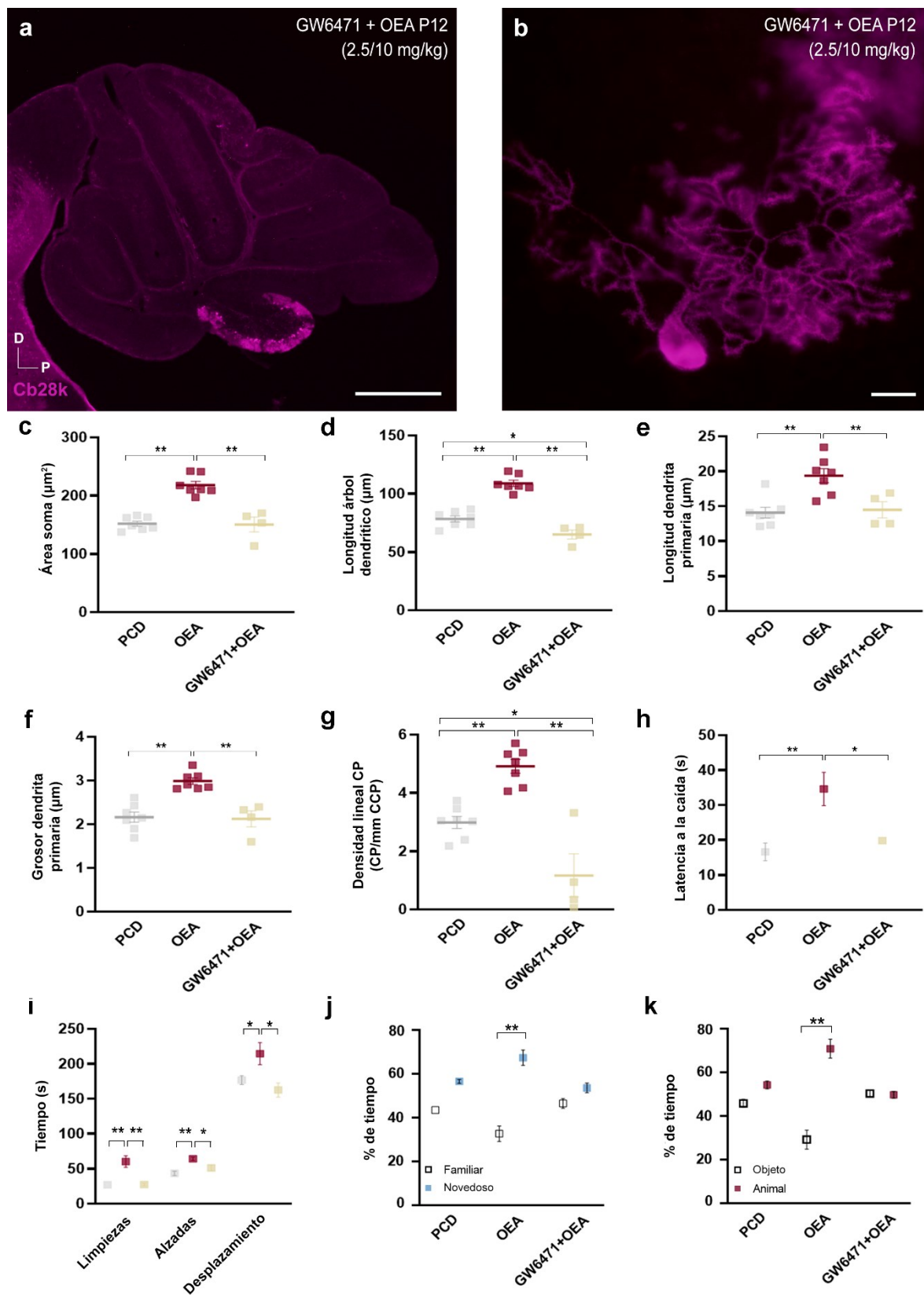


FIGURA 40 (Pie de figura en la página anterior)

ESTRATEGIA TERAPÉUTICA II

TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y BMSC

En este apartado se detallarán los resultados observados tras el tratamiento combinado de OEA a P12 (10 mg/kg, i.p.) y el trasplante completo de médula ósea con BMSC vía r.o. a P20 en el ratón PCD.

En primer lugar, se analizó la capacidad de las BMSC trasplantadas para reconstituir la médula ósea de los animales receptores. A continuación, se evaluó su efecto neuroprotector en el comportamiento motor a P22, P30 y P40, y a nivel histológico a P30 y P40. En todos los casos se comparó el efecto de esta nueva estrategia terapéutica con el observado tras el tratamiento exclusivo con OEA (estrategia terapéutica I de la presente Tesis Doctoral).

RECONSTITUCIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA

Con el fin de evaluar la capacidad de integración de las BMSC en el nicho desprovisto de células madre tras la ablación de la médula ósea en los animales receptores y realizar un seguimiento de la eficacia del trasplante, se analizó el porcentaje de células GFP+ en la sangre periférica mediante citometría de flujo a P30, P35 y P40 (Figura 41). Para cada edad se emplearon animales diferentes debido a que estos eran sacrificados inmediatamente para analizar el efecto neuroprotector del tratamiento a nivel histológico en el cerebelo.

Como se muestra en la Figura 41, diez días después del trasplante (P30) se observó un $41,62 \pm 1,53$ % de células GFP+ derivadas del trasplante en la sangre periférica de los animales receptores. Este porcentaje aumentó progresivamente a $56,25 \pm 5,20$ % a P35 y hasta casi un 60 % del total de las células en sangre periférica a P40 ($58,6 \pm 7,35$; Figura 41 a, b). Sin embargo, cuando se compararon estos valores con la prueba de ANOVA de una vía, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células GFP+ entre ninguna de las edades analizadas (Figura 41 b; valores *p* en Apéndice III, 21).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente empleando el mismo tipo de trasplante en el modelo PCD (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018, 2019), y demuestran que el tratamiento combinado de OEA y BMSC es efectivo a la hora de reconstituir la médula ósea de los animales previamente irradiados, incluso diez días tras el trasplante.

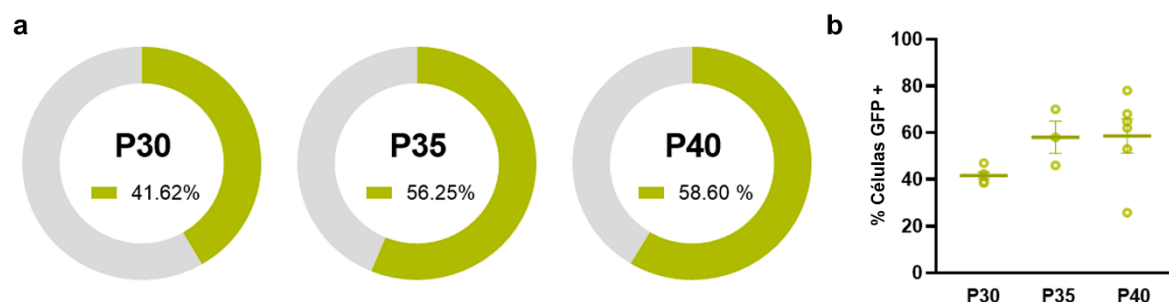


FIGURA 41 | Análisis de la eficacia del tratamiento combinado de OEA y BMSC en la reconstitución de la médula ósea del receptor. (a) Representación gráfica en forma de anillo, y (b) cuantificación del porcentaje total de células GFP+ detectadas en sangre periférica a P30, P35 y P40 de animales PCD tratados con OEA y BMSC. Nótese el aumento progresivo de células GFP+ derivadas del trasplante en la sangre periférica de los animales trasplantados (valores p específicos en Apéndice III, 21).

EFFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y BMSC EN EL COMPORTAMIENTO MOTOR DEL RATÓN PCD

A continuación, se analizó el efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en la función motora de los animales a P22, P30 y P40 (Figura 42). Tras el análisis estadístico ANOVA con medidas repetidas, se detectó una interacción de los factores “edad” y “tratamiento” (Figura 42 b; valores p en Apéndice III, 22). Al igual que con la estrategia terapéutica anterior, de forma general se observó una diferencia global en la realización de la prueba entre el grupo de animales WT y los animales PCD, independientemente del tratamiento (Figura 42 b). También se detectaron diferencias generales en la realización de la prueba *Rotarod* entre los ratones PCD no tratados respecto a los que recibieron algún tipo de tratamiento (Figura 42 b; Apéndice III, 22), siendo el comportamiento motor de estos últimos ligeramente mejor (Figura 42 b; Apéndice III, 22). Además, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis global entre los dos tratamientos realizados (Figura 42 b; Apéndice III, 22).

A pesar de la interacción mencionada anteriormente, probablemente debida a las grandes diferencias en la trayectoria de los grupos experimentales, decidimos evaluar el comportamiento motor separado para cada edad teniendo en cuenta exclusivamente a los ratones mutantes (Figura 42 c). El objetivo de este segundo análisis era encontrar posibles diferencias enmascaradas en la comparación anterior con unos grupos tan dispares, así como realizar un estudio similar al equivalente en la primera estrategia terapéutica. En primer lugar, a P22, se observó una cierta mejora en el comportamiento motor de los animales tratados con OEA y BMSC al igual que ocurría con los animales que únicamente

recibieron OEA (Figura 42 c), mientras que no se observaron diferencias entre los dos grupos de animales tratados (Figura 42 c; Apéndice III, 22). A P30, ambos grupos tratados siguieron mostrando una mejoría respecto al grupo de animales PCD sin tratamiento (Figura 42 c; Apéndice III, 22). Además, los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC obtuvieron mejores resultados incluso que los tratados exclusivamente con OEA (Figura 42 c; Apéndice III, 22). Finalmente, a P40, al no incluir el grupo de animales WT en el análisis, sí se detectaron diferencias entre ambos grupos de PCD tratados respecto al grupo PCD no tratado, mostrando los que recibieron alguno de los dos tratamientos una cierta mejora en el comportamiento motor respecto a los no tratados (Figura 42 c; Apéndice III, 22). En este caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de animales tratados (Figura 42 c; Apéndice III, 22).

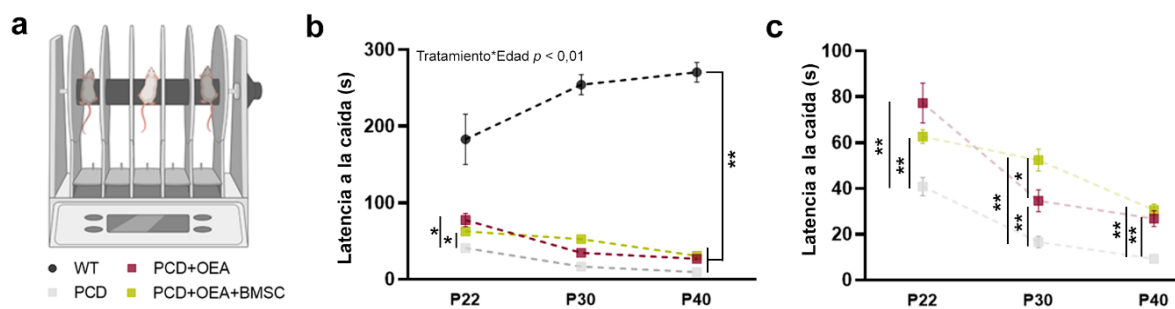


FIGURA 42 | Efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en el comportamiento motor del ratón PCD a lo largo del proceso neurodegenerativo. (a) Representación esquemática del aparato donde se realizó la prueba del *Rotarod*. **(b)** Representación gráfica de la latencia a la caída en la prueba del *Rotarod* de animales WT, PCD sin tratamiento, PCD tratados con OEA y PCD tratados con OEA y BMSC a P22, P30 y P40. Únicamente se representan las diferencias estadísticas generales de la prueba de ANOVA de medidas repetidas. **(c)** Comparación de la latencia a la caída en la prueba *Rotarod* entre los grupos experimentales de ratones PCD. Como se puede apreciar, el efecto sinérgico resultante de la combinación del tratamiento de OEA y el trasplante de BMSC solo es evidente a P30. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 22).

Por lo tanto, a nivel de comportamiento motor, el tratamiento combinado de OEA y BMSC tampoco produjo una mejora global claramente distinguible de los efectos observados con el tratamiento exclusivo de OEA. Aún así, a P30 sí se observó una mejora parcial en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC.

LLEGADA DE CÉLULAS DERIVADAS DEL TRASPLANTE AL CEREBELO

El análisis de la presencia de células derivadas del trasplante en el cerebelo de los animales receptores se realizó a P30 y P40 en secciones sagitales de esta estructura (Figura 43). En ambas edades se observaron células GFP+ en todos los lóbulos y capas del cerebelo, aunque localizadas de forma preferente en la región próxima a las meninges

(Figura 43 a, b). Además, según su morfología, se observaron principalmente tres tipos diferentes de células derivadas del trasplante: células ramificadas similares a la microglía o macrófagos (Figura 43 b-e) y células redondas o en bastón, similares a la morfología de leucocitos (Figura 43 f, g).

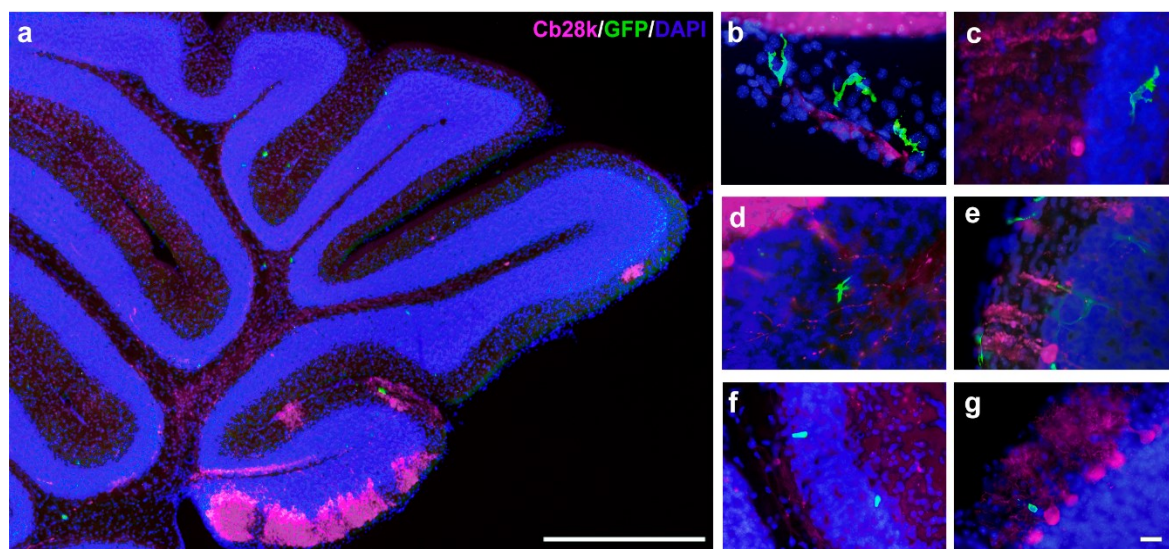


FIGURA 43 | Análisis de la llegada de células derivadas del trasplante de BMSC al cerebelo. (a-g) Microfotografías de secciones de cerebelo de ratones PCD tratados con OEA y BMSC donde se observan las células derivadas del trasplante GFP+ (verdes) y células de Purkinje marcadas con calbindina (Cb28k, magenta); los núcleos están contrateñidos con DAPI (azul). Se pueden apreciar células ramificadas (b-e), con forma de bastón (f) o redondeadas (g). Barra de escala: 500 μm (a), 20 μm (b-g).

Cuando se realizó una doble inmunofluorescencia para GFP e Iba1 se comprobó que, la mayor parte de las células derivadas del trasplante correspondían a células microgliales tanto a P30 como a P40 (Figura 44). Sin embargo, a ninguna de las edades analizadas se consiguieron observar células de Purkinje calbindina y GFP+ (Figura 44).

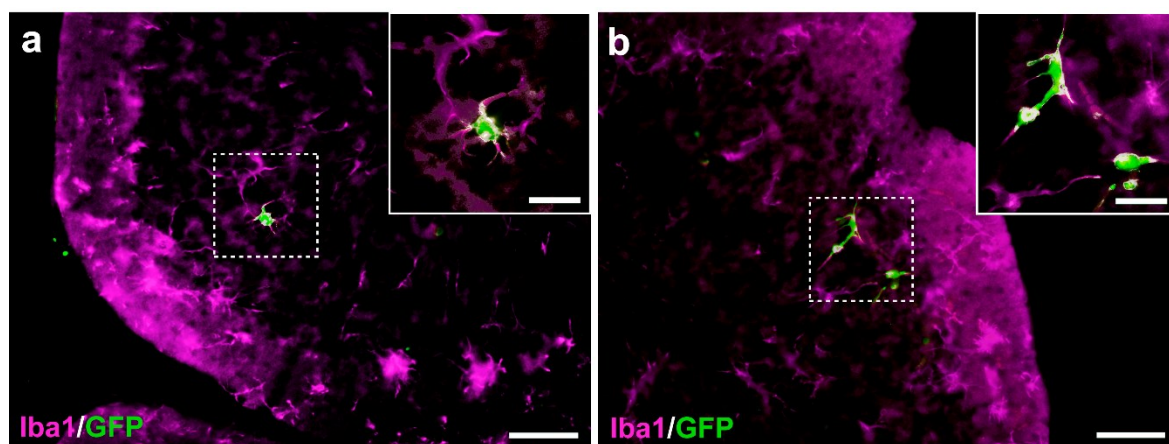


FIGURA 44 | Células microgliales derivadas del trasplante en el cerebelo del ratón PCD. (a,b) Microfotografías en las que se observan células de microglía (Iba1, magenta) derivadas del trasplante (GFP, verde) en el cerebelo de un animal PCD tratado con OEA y BMSC. Los recuadros punteados indican las ampliaciones de las imágenes mostradas en las esquinas superiores. Barra de escala: 50 μm (a, b), 20 μm (ampliaciones).

EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y BMSC A NIVEL HISTOLÓGICO

Con el objetivo de analizar si la mejora parcial en el comportamiento de los animales tratados con OEA y BMSC se debía a un efecto a nivel histológico y compararlo con los resultados observados tras el tratamiento exclusivo con OEA, se evaluaron los cambios en la morfología y la densidad de las células de Purkinje como en la estrategia terapéutica I a P30 y P40 (Figura 45).

Análisis histológico a P30

La prueba ANOVA de una vía seguida del test *post hoc* de Bonferroni revelaron diferencias estadísticamente significativas en todas las variables analizadas (Figura 45 c-h; valores *p* en Apéndice III, 23).

En cuanto a las variables relacionadas con la morfología (Figura 45 c-g), el nuevo tratamiento combinado de OEA y BMSC mostró un efecto neuroprotector únicamente en dos de las variables analizadas comparado con los animales PCD sin tratar: área del soma (Figura 45 d) y grosor de la dendrita primaria (Figura 45 g; Apéndice III, 23). Sin embargo, en comparación con el tratamiento exclusivo con OEA, el tratamiento combinado no mostró un mayor efecto neuroprotector, presentando ambos valores similares en las dos variables anteriores (Figura 45 d, g; Apéndice III, 23). Sorprendentemente, el tratamiento combinado de OEA y BMSC mostró un efecto nulo o deletéreo en las variables de la longitud del árbol dendrítico y la longitud de la dendrita primaria, respectivamente, en comparación con el efecto observado con OEA (Figura 45 e, f; Apéndice III, 23).

En cuanto a la densidad lineal de las células de Purkinje, tampoco se detectó una mejora en la supervivencia de estas neuronas tras el tratamiento combinado de OEA y BMSC en comparación con el tratamiento exclusivo con OEA (Figura 45 h), mostrando ambos tratamientos el mismo efecto protector respecto a los animales PCD sin tratar (Figura 45 h; Apéndice III, 23).

Estos resultados indican que el tratamiento combinado de OEA y BMSC presenta un efecto neuroprotector parcial a P30. Sin embargo, no solo no se observa una clara mejora a nivel histológico con respecto al tratamiento exclusivo con OEA, sino que para algunas de las variables analizadas el tratamiento combinado de OEA y BMSC resulta incluso peor.

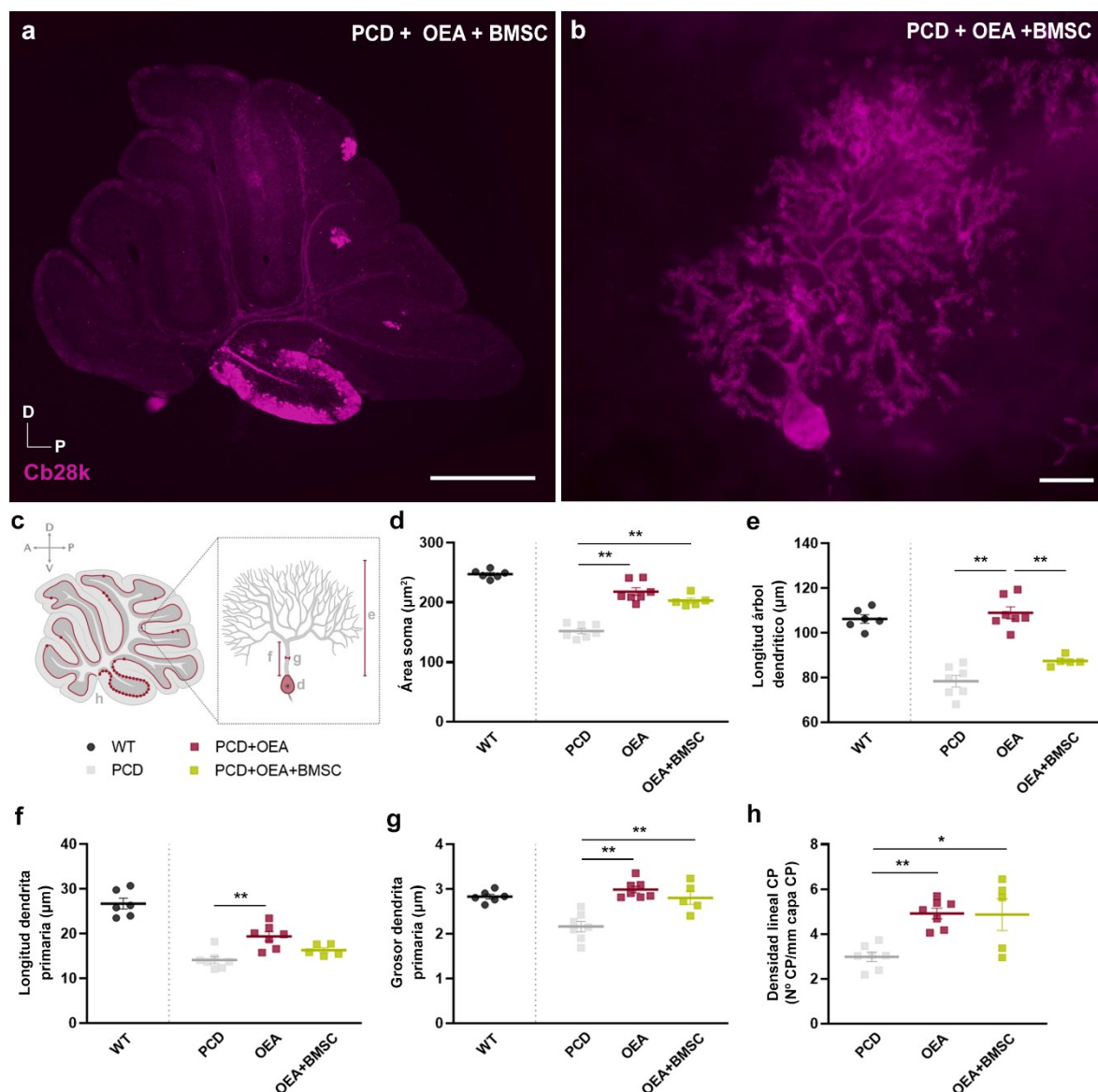


Figura 45 | Efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y BMSC a nivel histológico en el cerebelo del ratón PCD a P30. (a, b) Inmunofluorescencia de calbindina (Cb28k, magenta) de secciones sagitales de vermis cerebeloso (a) y de una célula de Purkinje (b) de animales PCD tratados con OEA y trasplantados con BMSC. (c) Representación de las variables analizadas sobre la morfología y densidad de las células de Purkinje. (d-g) Cuantificación del efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en la morfología de las células de Purkinje: área del soma (d), longitud del árbol dendrítico (e), grosor (f) y longitud (g) de la dendrita primaria. (h) Cuantificación del efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en la supervivencia de las células de Purkinje. Se puede comprobar cómo el tratamiento combinado de OEA y BMSC ejerce un efecto neuroprotector parcial, pero no supone una mejora evidente respecto al tratamiento exclusivo con OEA. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 23). Barra de escala: 500 μm (a), 20 μm (b). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral.

Análisis histológico a P40

Con el fin de estudiar la evolución del tratamiento combinado de OEA y BMSC y comparar su efecto a largo plazo con el tratamiento exclusivo de OEA, se analizaron las mismas variables relacionados con la morfología y la densidad de las células de Purkinje a

P40 (Figura 46). En este caso se empleó la prueba de ANOVA de dos factores (tratamiento y edad de análisis). Además, con el fin de obtener la mayor cantidad de información relevante relacionada con estos experimentos, se empleó la prueba ANOVA de una vía seguida del test *post hoc* de Bonferroni para cada edad de análisis por separado en su caso. Debido a que el efecto de ambos tratamientos a P30 ya se ha detallado en los correspondientes apartados, en este momento, únicamente haremos referencia a los resultados obtenidos a nivel global en la comparación P30 vs. P40 y a P40 en particular.

A modo de recordatorio, en el análisis a largo plazo del tratamiento exclusivo con OEA únicamente se mantuvo un efecto neuroprotector en dos de las variables analizadas a P40: el área del soma y la longitud de la dendrita primaria (Figura 22). Estos mismos resultados también se obtuvieron tras incluir el nuevo grupo experimental de OEA y BMSC (Figura 46 b, d; valores *p* en Apéndice III, 24).

En el análisis de la morfología de las células de Purkinje se observaron diferencias debidas tanto al “tratamiento” como a la “edad de análisis” en las variables área del soma, longitud del árbol dendrítico y grosor de la dendrita primaria (Figura 46 b, c, e; Apéndice III, 24), mientras que en el caso de la longitud de la dendrita primaria únicamente se detectaron diferencias debidas al “tratamiento” (Figura 46 d; Apéndice III, 24). Por su parte, también se detectó una interacción entre ambos factores en las variables área del soma, longitud del árbol dendrítico y grosor de la dendrita primaria (Apéndice III, 24), lo que significa que tanto el tratamiento farmacológico como la edad del análisis están influyendo en los resultados observados como ya se había indicado en la estrategia terapéutica I (Figura 22). En este caso, el análisis global mostró que, en general, el grupo de animales PCD no tratados fue diferente a los animales PCD que recibieron alguno de los dos tratamientos -siendo ambos beneficiosos- excepto en el parámetro de la longitud del árbol dendrítico (Figura 46 b-e; Apéndice III, 24). Por su parte, en el caso de los grupos de los animales que recibieron alguno de los tratamientos, no se observó una diferencia clara en el análisis global, detectándose únicamente diferencias estadísticamente significativas entre ambos en las variables de la longitud del árbol y en la longitud de la dendrita primaria (Figura 46 c, d; Apéndice III, 24). Finalmente, en el análisis particular a P40, además de los efectos debidos al tratamiento exclusivo con OEA descritos en apartados previos, se detectaron diferencias entre el grupo de animales PCD sin tratar y el grupo que recibió el tratamiento combinado en tres de las variables analizadas: área del soma (Figura 46 b), longitud del árbol dendrítico (Figura 46 c) y grosor de la dendrita primaria (Figura 46 e;

valores p en Apéndice III, 25). En este sentido, se observó un efecto sinérgico, es decir, una mejora en estos animales en el área del soma y en el grosor de la dendrita primaria con respecto a los animales PCD sin tratar o tratados exclusivamente con OEA (Figura 46 b, e). Sin embargo, de nuevo se detectó un empeoramiento en la longitud del árbol dendrítico en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC comparado tanto con los animales PCD sin tratar como con los animales tratados exclusivamente con OEA (Figura 46 c; Apéndice III, 25).

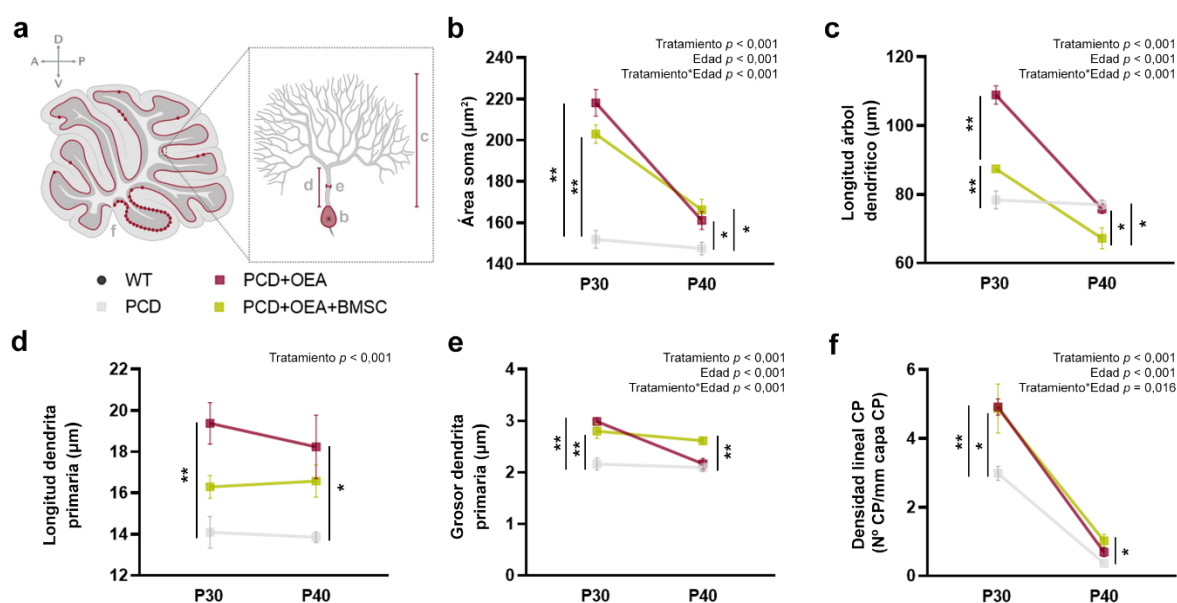


FIGURA 46 | Efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC a largo plazo a nivel histológico en el cerebelo del ratón PCD. (a) Representación de las variables analizadas sobre la morfología y densidad de las células de Purkinje. (b-f) Cuantificación del efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en la morfología (b-e) y la supervivencia (f) de las células de Purkinje a P30 y P40. En general, no se observa una mejora evidente tras el tratamiento combinado de OEA y BMSC a lo largo del tiempo. En las gráficas se indican los resultados generales del ANOVA de dos vías y los particulares (asteriscos) para cada edad analizada. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 24 y 25). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral.

En cuanto a la supervivencia de las células de Purkinje, también se observó un efecto debido al tratamiento y a la edad de análisis, y una interacción entre ambos factores como en el análisis anterior (Figura 46 f; Apéndice III, 24). En el análisis global únicamente se detectaron diferencias entre el grupo de animales PCD sin tratar y los dos grupos de los animales tratados, independientemente del tratamiento (Figura 46 f; Apéndice III, 24). Sin embargo, no se observaron diferencias globales en este parámetro entre los dos grupos de los animales tratados (Figura 46 f; Apéndice III, 24). Curiosamente, cuando se analizó de forma particular la densidad de células de Purkinje a P40 (Apéndice III, 25), se observó un ligero aumento en el grupo de animales tratados con OEA y BMSC respecto a los animales

PCD sin tratamiento (Figura 46 f) aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos (Figura 46 f; Apéndice III, 25).

En base a los resultados obtenidos en el análisis histológico, parece que el tratamiento combinado de OEA y BMSC presenta un mayor efecto neuroprotector a P40 en algunas de las variables analizadas respecto a los resultados observados a P30. Sin embargo, no se observa una mejora evidente tras este tratamiento combinado respecto a los resultados obtenidos tras el tratamiento exclusivo con OEA.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y BMSC EN EL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES

Diversos estudios previos habían demostrado que tanto la administración de OEA como la irradiación del cuerpo completo disminuyen el peso corporal de los animales (Fu *et al.*, 2003, 2005; Koch *et al.*, 2016; Fedele *et al.*, 2018). Por ello, al igual que con la estrategia terapéutica I, se monitorizó el peso de los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC a lo largo del tiempo que duraron los procedimientos experimentales hasta el momento de su sacrificio, P30 o P40. En ambos análisis se empleó la prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Bonferroni para comparar el peso corporal total de los animales WT, los PCD sin tratar, los PCD tratados con OEA, y los PCD tratados con OEA y trasplantados con BMSC (Figura 47).

A P30 se detectó una disminución del peso corporal en todos los grupos experimentales de ratones PCD, independientemente del tratamiento, respecto a los animales WT (Figura 47 a; valores *p* en Apéndice III, 26). En cuanto a los diferentes grupos de animales mutantes, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los no tratados y los que recibieron el tratamiento exclusivo con OEA, como ya se había descrito anteriormente con la estrategia terapéutica I (Figura 23 y 47 a; Apéndice III, 26). Sin embargo, se observó una reducción en el peso corporal de los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC comparado con el resto de animales PCD (Figura 47 a; Apéndice III, 26).

Por su parte, a P40 se observaron las mismas diferencias que a P30 en relación con el peso corporal de los animales WT y los PCD (Figura 47 b; Apéndice III, 26). También se mantuvo la disminución de peso corporal de los animales PCD que recibieron el doble tratamiento OEA y BMSC (Figura 47 b; Apéndice III, 26). Además, en este caso, la diferencia en el peso fue más notable (Figura 47 b).

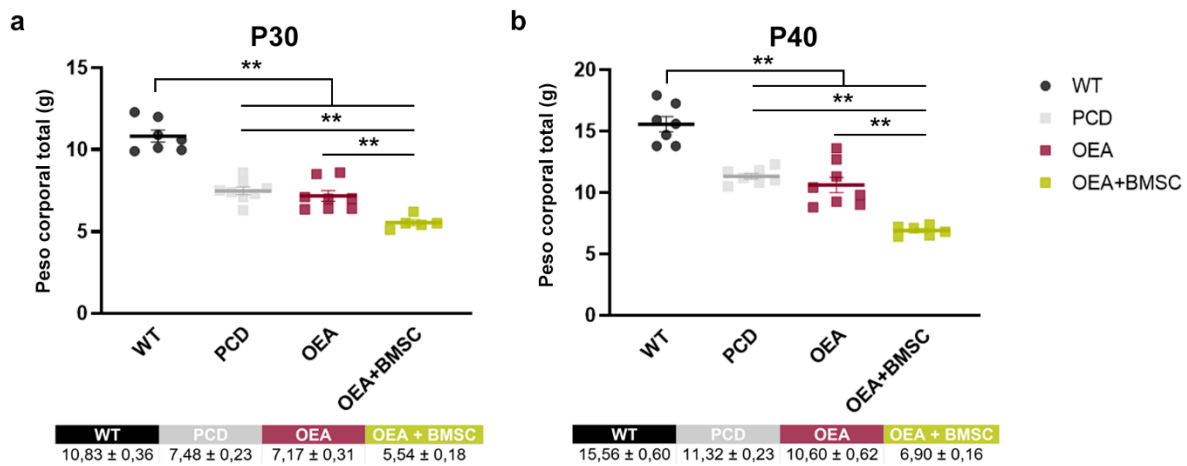


Figura 47 | Efecto del tratamiento combinado de OEA y BMSC en el peso corporal de los animales PCD. (a) Análisis y valores medios del peso corporal a P30 de animales WT, PCD sin tratamiento, PCD tratados exclusivamente con OEA y PCD tratados con OEA y BMSC. **(b)** Análisis y valores medios del peso corporal a P40 de los grupos experimentales mencionados anteriormente. Nótese la disminución de peso corporal de los ratones PCD tratados con OEA y BMSC tanto a P30 como a P40. ** $p < 0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 26).

Estos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento combinado de OEA y BMSC produce una disminución del peso corporal de los animales tratados tanto a P30 como a P40, a diferencia del tratamiento exclusivo con OEA en el que no se observaron diferencias. La principal causa de esta disminución de peso corporal podría deberse a la irradiación corporal del organismo, al tratarse de uno de los efectos secundarios más comunes tanto en animales como en humanos (Koch *et al.*, 2016).

ESTRATEGIA TERAPÉUTICA III

TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y MSCs

Uno de los requerimientos imprescindibles para el trasplante completo de médula ósea es la irradiación completa del organismo con el fin de eliminar la médula ósea propia del receptor y que este nicho quede disponible para las células trasplantadas (Whetton y Graham, 1999; Fuchs *et al.*, 2004; Hidalgo, 2008; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2015, 2018). Sin embargo, como se ha demostrado en estudios previos y hemos comprobado en el apartado anterior de la presente Tesis Doctoral, la irradiación de cuerpo completo produce una disminución del peso corporal, entre otras consecuencias deletéreas, que puede estar afectando al bienestar del animal (Koch *et al.*, 2016). Por ello, con el fin de aumentar los posibles beneficios y minimizar los riesgos de una terapia celular, decidimos evaluar otra estrategia que implicase un aporte continuo de células madre desde el comienzo del proceso neurodegenerativo, sin la necesidad de eliminar la médula ósea del animal, evitando así la irradiación y sus posibles efectos contraproducentes. Así, en este apartado se expondrán los resultados obtenidos a P30 tras el tratamiento combinado de OEA a P12 (10 mg/kg, i.p.) y el trasplante continuo de MSCs cada 48 horas (a P15, P17, P19, P21, P23, P25, P27 y P29). Al igual que con las estrategias terapéuticas anteriores, se analizó tanto su efecto neuroprotector en el comportamiento, como la llegada de las células derivadas del trasplante al cerebelo y su efecto a nivel histológico.

ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS DERIVADAS DEL TRASPLANTE EN SANGRE

En primer lugar, se analizó el porcentaje total de células GFP+ en la sangre periférica mediante citometría de flujo a P30. En la estrategia terapéutica II el objetivo de este análisis era conocer el grado de quimerismo de los animales receptores del trasplante a lo largo del tiempo, como se describió en el apartado correspondiente. En este caso, el objetivo principal fue proporcionarnos información sobre la presencia de las células MSCs trasplantadas en el animal receptor que podrían estar ejerciendo algún efecto en el mismo. El valor medio que se obtuvo fue del $0,43 \pm 0,08$ %. A pesar de ser un dato muy inferior a los obtenidos con el trasplante completo de BMSC, estos resultados nos indican que las células MSCs trasplantadas son capaces de mantenerse en el sistema circulatorio y escapar del sistema inmunitario del animal trasplantado.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y MSCs EN EL COMPORTAMIENTO MOTOR DEL RATÓN PCD

El posible efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y MSCs se evaluó en el comportamiento motor de los animales a P22 y P30 (Figura 48). Al igual que en con las estrategias terapéuticas I y II, se empleó la prueba de ANOVA de una vía con medidas repetidas seguida del test *post hoc* de Bonferroni para detectar diferencias en el análisis global de la realización de la prueba (Figura 48 b). En este apartado únicamente haremos referencia a las diferencias observadas respecto al grupo PCD tratado con OEA y MSCs puesto que el resto ya se han descrito anteriormente en los apartados de resultados correspondientes.

Tras el análisis estadístico, se detectaron diferencias en los factores “edad” y “tratamiento” como ocurrió en el análisis del comportamiento motor de la estrategia terapéutica II (Figura 48 b; valores *p* en Apéndice III, 27). Además, la prueba *post hoc* de Bonferroni mostró que el comportamiento motor general del grupo PCD tratado con OEA y MSCs fue similar al observado en los animales PCD, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratones mutantes (Figura 48 b; Apéndice III, 27).

Al igual que en la estrategia terapéutica II, debido a las grandes diferencias en la trayectoria de los grupos experimentales, decidimos evaluar el comportamiento motor por separado para cada edad teniendo en cuenta exclusivamente a los ratones mutantes (Figura 48 c). A P22, los animales PCD tratados con OEA y MSCs mostraron unos resultados en la prueba del *Rotarod* idénticos a los de los ratones PCD sin tratar e inferiores a los de los mutantes que recibieron el tratamiento exclusivo con OEA o el tratamiento combinado de OEA y BMSC (Figura 48 c; Apéndice III, 27). En cuanto al análisis a P30, curiosamente, los animales que recibieron el tratamiento OEA y MSCs mantuvieron una habilidad motora similar a la observada a P22 (Figura 48 c; Apéndice III, 27). Sin embargo, a pesar de no reflejarse un empeoramiento gradual, este resultado a P30 no mostró una mejora con respecto al resto de tratamientos analizados, siendo los valores de latencia a la caída de estos animales menores que los de los que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC o iguales a los de los animales que recibieron el tratamiento exclusivo con OEA (Figura 48 c; Apéndice III, 27).

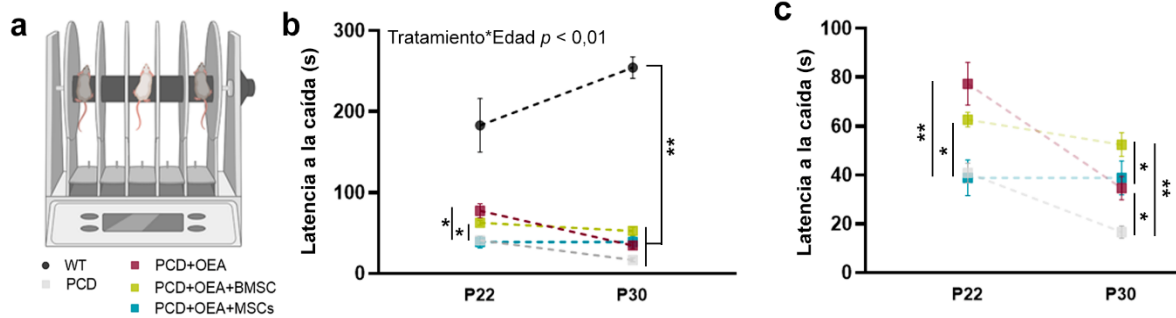


FIGURA 48 | Efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en el comportamiento motor del ratón PCD a P22 y P30. (a) Representación esquemática del aparato donde se realiza la prueba del *Rotarod*. (b) Representación gráfica de la latencia a la caída en la prueba del *Rotarod* de animales WT, PCD sin tratamiento, PCD tratados con OEA, PCD tratados con OEA y BMSC, y PCD tratados con OEA y MSCs a P22 y P30. Únicamente se representan las diferencias estadísticas generales de la prueba de ANOVA de medidas repetidas. (c) Comparación de la latencia a la caída en la prueba *Rotarod* entre los grupos experimentales de ratones PCD. */** $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 27).

LLEGADA DE CÉLULAS DERIVADAS DEL TRASPLANTE AL CEREBELO

El análisis histológico del cerebelo de los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y MSCs reveló una gran escasez de células derivadas del trasplante en el parénquima cerebeloso (Figura 49). Únicamente se detectaron células de morfología más o menos redondeada, y en uno de los tres animales analizados se observaron dos células GFP+ que colocalizaron con el soma positivo para calbindina de células de Purkinje (Figura 49). Como se aprecia en la Figura 49, estas células de Purkinje presentaban una morfología aberrante y un árbol dendrítico dañado.

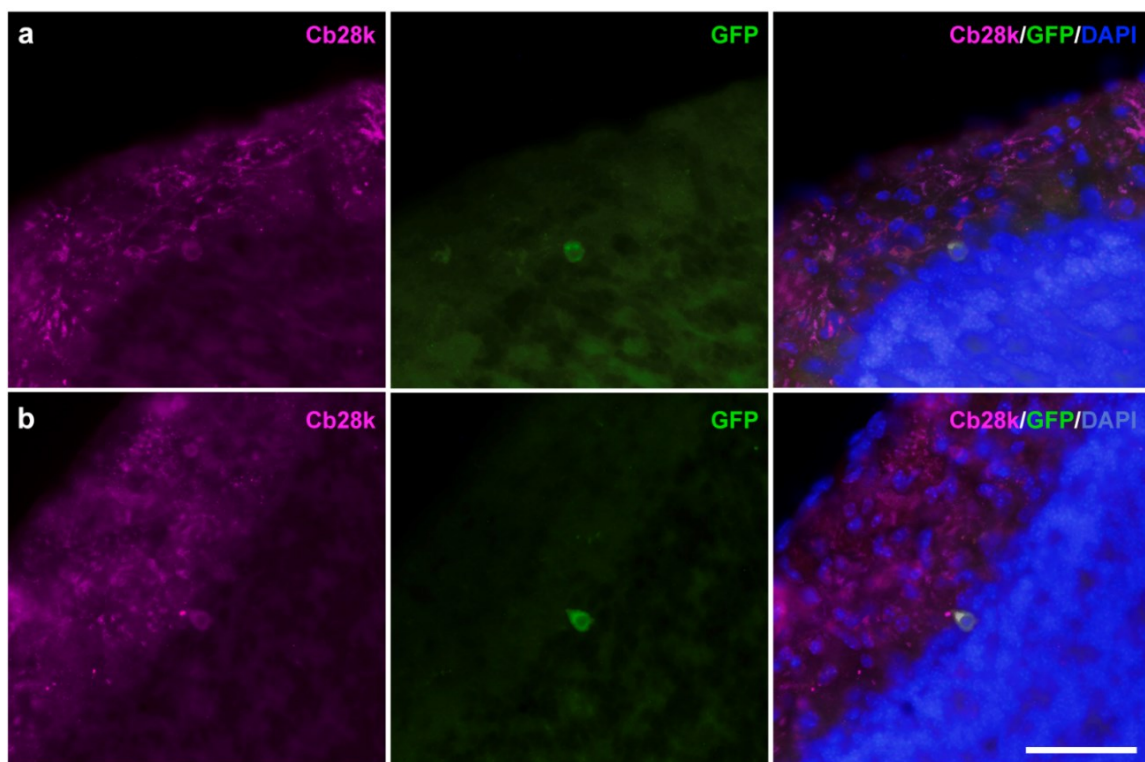


FIGURA 49 (Pie de figura en la siguiente página)

◀ **FIGURA 49 | Llegada de células derivadas del trasplante continuo de MSCs al cerebelo.** (a, b) Microfotografías de secciones sagitales de cerebelo de un animal PCD tratado con OEA y trasplante de MSCs, en las que se observan células derivadas del trasplante GFP+ (verde) que colocalizan con el soma de células de Purkinje marcadas con calbindina (Cb28k, magenta); los núcleos están contrateñidos con DAPI (azul). Barra de escala: 50 μ m.

Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que el posible efecto que pudieran ejercer las MSCs sería de tipo paracrino o indirecto, ya que apenas se observaron células derivadas del trasplante en el cerebelo de los animales tratados con OEA y MSCs.

EFFECTO NEUROPROTECTOR DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y MSCs A NIVEL HISTOLÓGICO

Análisis histológico a P30

Al igual que con las estrategias terapéuticas I y II, en el análisis del efecto neuroprotector combinado de OEA y MSC a nivel histológico se evaluaron los cambios en la morfología y la densidad de las células de Purkinje. Esta estrategia terapéutica únicamente se evaluó a P30 como un primer estudio piloto para comparar su efecto con los dos tratamientos detallados previamente en los apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral. Para ello se empleó la prueba de ANOVA de un factor seguida del test *post hoc* de Bonferroni, y los grupos experimentales comparados fueron: animales PCD sin tratamiento, PCD tratados exclusivamente con OEA, PCD tratados con OEA y BMSC y PCD tratados con OEA y MSCs (Figura 50).

El test ANOVA mostró diferencias en todas las variables morfológicas evaluadas (Figura 50 c-g; valores *p* específicos en Apéndice III, 28). De forma general, las principales diferencias significativas se observaron entre el grupo de animales PCD sin tratar y los mutantes que recibieron algún tipo de tratamiento, independientemente del mismo, como ocurrió en las variables área del soma (Figura 50 d) y grosor de la dendrita primaria (Figura 50 g; Apéndice III, 28). En ambas variables, todos los ratones mutantes tratados mostraron valores superiores a los de ratones PCD sin tratar, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados (Figura 50 d, g; Apéndice III, 28). Por otro lado, en la variable longitud de la dendrita primaria, únicamente se observó una mejora debida al tratamiento exclusivo con OEA mientras que el resto de los tratamientos no mostraron ningún efecto (Figura 50 f; Apéndice III, 28). Finalmente, en el caso concreto de la variable correspondiente a la longitud del árbol dendrítico, de nuevo en los animales trasplantados e independientemente del tipo de trasplante, no solamente no

se detectó una mejora respecto a los animales que no recibieron ningún tipo de tratamiento, sino que además el efecto fue incluso menor que el observado en los animales tratados exclusivamente con OEA (Figura 50 e; Apéndice III, 28).

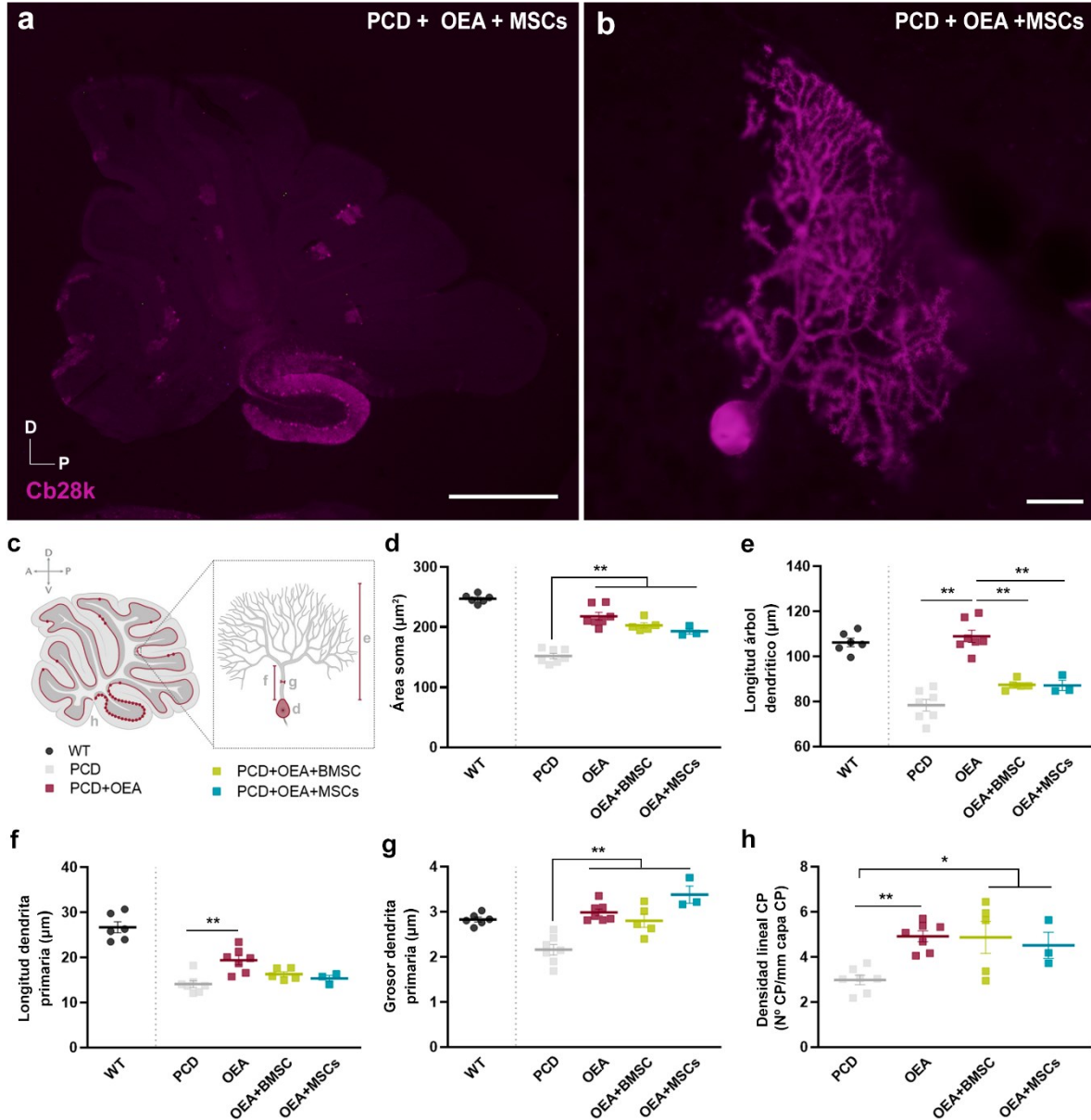


Figura 50 | Efecto neuroprotector del tratamiento combinado de OEA y MSCs a nivel histológico en el cerebelo del ratón PCD a P30. (a, b) Inmunofluorescencia de calbindina (Cb28k, magenta) de una sección sagital de vermis cerebeloso (a) y de una célula de Purkinje (b) de animales PCD tratados con OEA y MSCs. **(c)** Representación de las variables analizadas sobre la morfología y densidad de las células de Purkinje. **(d-g)** Cuantificación del efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en la morfología de las células de Purkinje: área del soma (d), longitud del árbol dendrítico (e), grosor (f) y longitud (g) de la dendrita primaria. **(h)** Cuantificación del efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en la supervivencia de las células de Purkinje. Nótese que ninguno de los tratamientos combinados de OEA con algún tipo de trasplante presenta un efecto sinérgico mayor que el tratamiento exclusivo con OEA. $^{*}/^{**}$ $p < 0,05/0,01$ (valores p específicos en Apéndice III, 28). Barra de escala: 500 μm (a), 20 μm (b). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral.

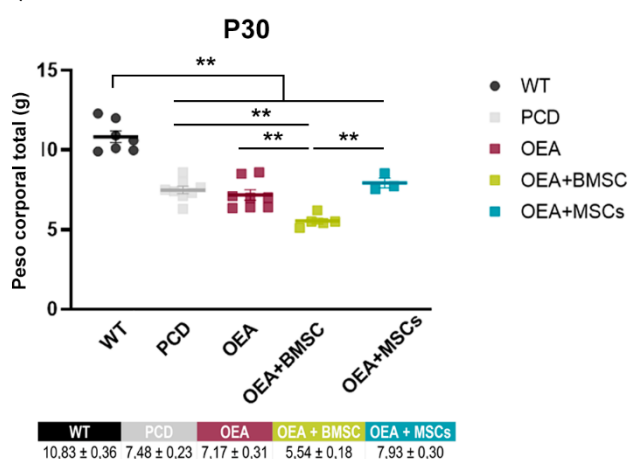
En cuanto a la supervivencia de las células de Purkinje (Figura 50 h), todos los animales que recibieron algún tratamiento, independientemente del tipo, mostraron una mayor densidad lineal de células de Purkinje respecto a los ratones PCD estándar (Figura 50 h; Apéndice III, 28). Sin embargo, al igual que en otras variables relacionadas con la morfología de las células de Purkinje, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de esta población neuronal entre las diferentes estrategias terapéuticas (Figura 50 h; Apéndice III, 28).

Teniendo en cuenta estos resultados, el tratamiento combinado de OEA y trasplante continuo de MSCs no presenta un mayor efecto neuroprotector sinérgico a nivel histológico en las células de Purkinje respecto a los dos tratamientos anteriores, incluso llegando a observarse un efecto deletéreo en alguno de los factores analizados, como ocurría con la estrategia terapéutica II.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE OEA Y MSCs EN EL PESO CORPORAL DE LOS ANIMALES

Al igual que en las fases previas, se monitorizó el peso de los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y MSCs a lo largo de los experimentos (Figura 51). En este caso, el test ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni a P30, reveló que los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y MSCs no presentaron una variación de peso corporal estadísticamente significativa respecto a los ratones PCD sin tratar o a los que recibieron el tratamiento exclusivo de OEA (Figura 51; valores *p* específicos en Apéndice III, 29). Además, con esta estrategia terapéutica que no requiere la irradiación previa al trasplante de los animales receptores, se evitó la disminución de peso corporal que se había observado en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC (Figura 51; Apéndice III, 29).

Figura 51 | Efecto del tratamiento combinado de OEA y MSCs en el peso corporal de los animales PCD. Análisis y valores medios del peso corporal a P30 de animales WT, PCD sin tratamiento, PCD tratados exclusivamente con OEA, PCD tratados con OEA y BMSC, y PCD tratados con OEA y MSCs. Este tratamiento combinado no supone ningún efecto deletéreo en el peso de los animales tratados. ** $p < 0,01$ (valores *p* específicos en Apéndice III, 29). ►



Así, estos resultados apoyarían la idea de que la disminución del peso corporal observada en la estrategia terapéutica II estaría principalmente causada por la irradiación del organismo y no por la técnica del trasplante como tal. De esta manera, que al eliminar el proceso de irradiación conseguiríamos valores de peso corporal como los observados en los animales PCD sin tratamiento y PCD tratados exclusivamente con OEA.

En resumen, a pesar de que se observó un efecto neuroprotector parcial a nivel histológico, los tratamientos combinados de OEA junto con BMSC o MSCs no mostraron una mejora evidente con respecto a los efectos en el comportamiento motor y a nivel histológico observados tras la administración exclusiva de OEA en el ratón mutante PCD. Con el fin de sintetizar y comparar fácilmente todos estos resultados obtenidos se ha elaborado la tabla siguiente (Tabla 8).

TABLA 8 | Comparación de los efectos terapéuticos observados tras las diferentes estrategias analizadas.

	Mejoras observadas con OEA	OEA y BMSC	OEA y MSCs
Morfología y supervivencia de las células de Purkinje	Área del soma a P30	=	=
	Longitud del árbol dendrítico a P30	▼	▼
	Longitud de la dendrita primaria a P30	▼	▼
	Grosor de la dendrita primaria a P30	=	=
	Densidad de las células de Purkinje a P30	=	=
	Área del soma a P40	=	NA
	Longitud de la dendrita primaria a P40	▼	NA
Comportamiento motor	Comportamiento motor a P22	=	▼
	Comportamiento motor a P30	▲	=
	Comportamiento motor a P40	=	NA
Peso corporal	Peso corporal a P30	▼▼	=
	Peso corporal a P40	▼▼	NA

Nota. En la primera columna se enumeran los efectos beneficiosos observados tras el tratamiento con OEA comparables con el resto de los tratamientos evaluados. En la segunda y tercera columnas, se representan las comparaciones entre las estrategias terapéuticas combinadas de OEA con células madre respecto al tratamiento exclusivo con OEA: =, no se observaron diferencias; ▲, efecto sinérgico; ▼, perjuicio (igual que el mutante PCD sin tratamiento); ▼▼, gran perjuicio (efectos deletéreos, peor que el mutante PCD sin tratamiento). NA, no analizado.



Discusión

En el apartado anterior se ha evaluado la capacidad neuroprotectora de diferentes estrategias terapéuticas en el modelo de degeneración neuronal PCD. Así, se ha comprobado, por una parte, la eficacia del tratamiento farmacológico con OEA y, por otra, que su combinación con la terapia celular no ofrece, en general, un efecto neuroprotector sinérgico mayor que la suma de los beneficios de cada uno de los tratamientos por separado. A pesar de que en algunas variables no se detectaron diferencias entre los tratamientos estudiados, la administración exclusiva de OEA mostró de forma global una mayor neuroprotección, tanto a nivel histológico como en el comportamiento del ratón mutante, respecto a las estrategias combinadas de OEA y BMSC y de OEA y MSCs. A continuación, se discutirán estos resultados en el mismo orden cronológico que el expuesto en el apartado anterior, excepto para las estrategias terapéuticas II y III cuya discusión se realizará conjuntamente.

LA OEA EJERCE UN EFECTO NEUROPROTECTOR EN EL RATÓN PCD

Las propiedades neuroprotectoras de la OEA frente a la degeneración cerebelosa del ratón PCD ya se habían demostrado previamente en nuestro laboratorio (Muñoz-Castañeda, 2015). El efecto de la OEA es evidente cuando se administra de forma preventiva, es decir, antes de que se inicie la muerte neuronal. Sin embargo, tanto la duración de este efecto neuroprotector como el momento óptimo de administración del fármaco no estaban claros. Por ello, el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral consistió en optimizar la ventana temporal terapéutica en la que el endocannabinoide OEA ejerce una mayor neuroprotección. Para ello, se analizaron diferentes pautas de administración de la dosis más efectiva de OEA (10 mg/kg, i.p., Muñoz-Castañeda, 2015) en diferentes puntos temporales antes del comienzo de la predegeneración, momento estimado a P15. Una vez establecida la pauta óptima, se evaluó el efecto neuroprotector en las células de Purkinje a largo plazo. A continuación, se analizaron sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, así como su efecto en la actividad electrofisiológica del cerebelo y en el comportamiento motor, cognitivo y social del ratón PCD. Por último, se evaluó la implicación de los receptores PPAR α en las acciones observadas de la OEA en este modelo animal.

Optimización del tratamiento con OEA y efecto neuroprotector a largo plazo

En primer lugar, los experimentos relacionados con la evaluación de la ventana temporal de la administración de OEA pusieron de manifiesto que todas las pautas

analizadas (10 mg/kg, i.p., a P14, P12 o P10) ejercían un efecto neuroprotector a nivel histológico en el ratón mutante PCD. Estos resultados confirman que el efecto de la OEA en este modelo es preventivo y concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Tales resultados indicaban que las pautas de administración de OEA que mayor efecto presentaban eran aquellas en las que el fármaco se inyectaba antes del comienzo de la predegeneración (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Por otro lado, en todas las variables analizadas correspondientes a la morfología y supervivencia de las células de Purkinje, la relación entre la pauta de administración y el efecto mostró siempre una curva en forma de campana o U invertida, como se había demostrado previamente en estudios farmacodinámicos de la OEA (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; González-Aparicio y Moratalla, 2014; González-Aparicio *et al.*, 2014; Holubiec *et al.*, 2018). Atendiendo a esta curva, el punto de eficacia máxima se observó con el tratamiento a P12, es decir, tres días antes del comienzo del periodo predegenerativo. Este hecho podría estar indicando que, a pesar de que el comienzo de la predegeneración se estima a P15, otras alteraciones aún no descritas podrían estar ocurriendo en el cerebelo del ratón PCD previas a esa edad. De hecho, un estudio en el que se analizó el perfil transcripcional del cerebelo del ratón mutante *pcd^{3J}* a P14 demostró un aumento en la expresión de *Bad* y una disminución en *Cdk5*, genes relacionados con la apoptosis y con el desarrollo y migración neuronal, respectivamente (Ford *et al.*, 2008). Es muy complicado determinar un momento exacto e inamovible para el inicio de un proceso biológico. Probablemente, el inicio de la predegeneración del ratón PCD presente cierta variación en cada animal, y muy posiblemente sea un proceso multifactorial con rasgos más o menos aparentes. Además, el parámetro morfológico de las células de Purkinje en el que se observó un mayor efecto tras el tratamiento con OEA fue la longitud del árbol dendrítico. Cabe destacar que varios estudios respaldan que el comienzo de la degeneración de estas neuronas comience precisamente en las dendritas (Chakrabarti *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), y que la causa de ello pueda estar relacionada con la inestabilidad de los microtúbulos hiperglutamilados del ratón PCD (Rogowski *et al.*, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020).

A pesar de que aún no se conoce el mecanismo exacto por el cual la OEA previene las alteraciones morfológicas y la muerte de las células de Purkinje del ratón PCD (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), este podría estar relacionado con el mantenimiento de la citoarquitectura interna debido a un efecto directo o indirecto de la OEA sobre los microtúbulos (Pérez-Martín *et al.*, 2021) y a una disminución de la apoptosis (Zhou *et al.*,

2017). Sabemos que la administración de OEA aumenta la expresión génica de proteínas relacionadas con la diferenciación dendrítica (GAP43 y SYN), proteínas de unión a microtúbulos (MAP2) y factores neurotróficos (BDNF), como se ha demostrado en estudios previos y en la presente Tesis Doctoral (Bento-Abreu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019). Además, la OEA como ligando del receptor PPAR α (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003, 2005) también podría estar regulando la expresión génica de factores relacionados con la plasticidad y la supervivencia neuronal a través del factor de transcripción CREB (Sakamoto *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2013; Amidfar *et al.*, 2020), y atenuando la apoptosis a través de la vía NF κ B (Zhou *et al.*, 2017). Todos estos factores podrían estar contribuyendo al mantenimiento de la citoarquitectura de las células de Purkinje -caracterizada principalmente por la complejidad de su árbol dendrítico- y al aumento de su supervivencia. Finalmente, el efecto protector de la OEA también podría estar mediado por una regulación de la inflamación asociada al proceso degenerativo, tal y como desarrollaremos en el apartado siguiente.

Por último, como se mencionó anteriormente, el efecto de la OEA es preventivo, aunque este no se mantiene de forma completa a lo largo del tiempo. De esta manera, a P40 únicamente se observó un efecto parcial en dos de las variables analizadas: el área del soma y la longitud de la dendrita primaria. De esta forma, el tratamiento agudo con OEA retrasaría la pérdida neuronal y la aparición de las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje en el ratón PCD, aunque no conseguiría frenar completamente la degeneración neuronal. En la mayoría de estudios previos donde se empleó el endocannabinoide OEA como fármaco neuroprotector se utilizaron tratamientos con administraciones continuas del mismo, con una duración variable (Plaza-Zabala *et al.*, 2010; González-Aparicio y Moratalla, 2014; Yang *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2018; Rani *et al.*, 2021) y/o combinado con otros fármacos (González-Aparicio y Moratalla, 2014). Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento continuo de OEA desde P7 a P21, independientemente de la dosis empleada (1, 5 y 10 mg/kg, i.p.) no mostró una mayor neuroprotección en el modelo PCD que la obtenida con una dosis puntual preventiva (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Considerando también el posible efecto anorexigénico de la OEA, no se contempló esta pauta de administración continua como posible refinamiento del tratamiento (Fu *et al.*, 2005; Fedele *et al.*, 2018). Además, en los estudios mencionados anteriormente, las propiedades del fármaco se analizaron en las horas o días próximos a su última administración, mientras que en nuestro trabajo los análisis se realizaron a los 18 y 28 días tras la administración aguda y única de OEA. De

esta forma, nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez el efecto neuroprotector temporal y limitado de este fármaco, al menos en el modelo PCD. En este sentido, y sin desmerecer las propiedades beneficiosas de la OEA, consideramos el análisis a largo plazo de cualquier tratamiento como un factor muy relevante a tener en cuenta, sobre todo en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, cuya progresión tiende a ser continuada y prolongada en el tiempo.

Propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la OEA

Varios estudios previos habían demostrado que la degeneración agresiva de las células de Purkinje en el ratón PCD estaba acompañada de una inflamación y una reacción glial exacerbada en el cerebelo (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013). Además, sabemos que una respuesta neuroinflamatoria desmesurada y crónica puede empeorar el daño neuronal en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Baltanás *et al.*, 2013; Salter y Stevens, 2017; Subhramanyam *et al.*, 2019; Kwon y Koh, 2020). Teniendo en cuenta las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la OEA (Zhou *et al.*, 2012; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020), quisimos comprobar si la reducción de la neuroinflamación asociada a la degeneración podría estar contribuyendo a la neuroprotección observada en el cerebelo del ratón PCD. Para ello, en primer lugar, evaluamos los cambios en la expresión génica de diferentes factores proinflamatorios y neuroprotectores tras la administración de OEA en condiciones no patológicas a corto plazo (~P12). En segundo lugar, se analizaron los cambios en la expresión génica de los mismos factores tras la administración de OEA al comienzo de la degeneración neuronal (P20) y en pleno proceso neurodegenerativo (P30). Por último, se evaluó el efecto de la administración de OEA en la modulación de la microgliosis del cerebelo del ratón PCD y en el reclutamiento de leucocitos del sistema inmunitario periférico hacia el parénquima cerebeloso, como iremos discutiendo a continuación.

La OEA produce cambios en la expresión génica en condiciones fisiológicas

La OEA es capaz de cruzar rápidamente la BHE tras su administración sistémica, observándose un aumento de los niveles de esta molécula en diferentes regiones del encéfalo -incluido el cerebelo- 15 minutos tras el tratamiento (Campolongo *et al.*, 2009; Plaza-Zabala *et al.*, 2010; González-Aparicio *et al.*, 2014). Además, se han detectado cambios en la expresión génica del receptor PPAR α desde las 3 horas tras el tratamiento,

hasta un día después del mismo (Zhou *et al.*, 2012). Basándonos en estos estudios, quisimos comprobar los cambios que producía la administración de OEA en la expresión génica de diferentes factores inflamatorios y neuroprotectores/neurotróficos en el cerebelo en condiciones fisiológicas a corto plazo (3 y 24 horas postratamiento) antes de evaluar su efecto en el modelo de degeneración PCD.

En general, la administración exógena de OEA produjo una disminución de los niveles de expresión génica de mediadores proinflamatorios como *Ifn γ* , *Il1 β* , *Tnfa*, y un aumento de la expresión de factores neurotróficos o neuroprotectores como *Bdnf*, *Gap43* y *Map2*, tanto 3 como 24 horas tras el tratamiento. Así pues, todo indica que *a priori* la OEA predispone hacia un estadio menos inflamatorio y más neuroprotector. Estos cambios en la expresión génica ya habían sido descritos a largo plazo *in vitro* e *in vivo* en diferentes modelos de inflamación tras el tratamiento con OEA (Zhou *et al.*, 2012, 2017; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020). Sin embargo, este estudio es el primero en el que se demuestra un efecto a corto plazo en condiciones estándar no patológicas, poniendo de manifiesto que los cambios génicos producidos por la OEA son independientes de la presencia o no de un proceso inflamatorio o daño cerebral. Curiosamente, en el caso concreto de la molécula proinflamatoria *Il6* se produjo un aumento en los niveles de mRNA a las 3 horas, que disminuyó hasta niveles basales 24 horas después de la administración. Este aumento temporal tras la administración vía i.p. de OEA podría ser una señal global de alerta de la presencia de una sustancia exógena en el organismo, como ha sido descrito en otros modelos tras una lesión infecciosa o un daño en un tejido (Tanaka *et al.*, 2014). Por último, también se observó un aumento en los niveles de expresión del receptor PPAR α a las 3 y 24 horas tras la administración. Este resultado apoya la idea de que los efectos de la OEA podrían estar mediados por este tipo de receptor cannabinoide coincidiendo con estudios previos (Zhou *et al.*, 2012; Muñoz-Castañeda, 2015; Yang *et al.*, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2019; Pérez-Martín *et al.*, 2021). La implicación los receptores PPAR α en las acciones de la OEA observadas en el modelo PCD se discutirá más adelante.

La OEA modula la respuesta inflamatoria del ratón PCD a largo plazo

Diversos estudios previos han demostrado que la degeneración rápida y agresiva de las células de Purkinje promueve un aumento en la expresión de genes que codifican para factores proinflamatorios, una fuerte gliosis reactiva -principalmente de la microglía- y un

aumento en la infiltración de leucocitos periféricos hacia el cerebelo (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013; Del Pilar *et al.*, 2021). En cuanto a los factores proinflamatorios, en el cerebelo de los ratones PCD se ha observado una sobreexpresión de genes que codifican proteínas proinflamatorias como IL1 β , Il6, iNOS y MMP9 a partir de la edad de P20 (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013). En nuestro caso, para evaluar el efecto del tratamiento con OEA en el ratón PCD se analizaron los cambios en la expresión génica de estas moléculas a medio (P20) y largo plazo (P30), es decir, al principio del proceso degenerativo y en el momento en el que prácticamente todas las células de Purkinje han degenerado (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Para facilitar la discusión de los resultados obtenidos, en primer lugar, abordaremos los cambios observados en el ratón mutante PCD respecto a los animales WT y, en segundo lugar, discutiremos los resultados obtenidos tras el tratamiento con OEA.

A P20 -cuando la degeneración de las células de Purkinje acaba de comenzar- no se observaron grandes cambios en la expresión de los genes analizados en el cerebelo del ratón PCD respecto a la de los animales WT. Únicamente se detectó una ligera disminución de los niveles de mRNA de *iNos*, *Gap43* y *Ppara*, y un aumento muy significativo del factor proinflamatorio *Tnfa*. Estos resultados concuerdan con la reacción microglial del ratón PCD a esta edad que, aunque ya está presente, no se encuentra exacerbada (Baltanás *et al.*, 2013). Además, el aumento tan llamativo de la expresión génica de *Tnfa* detectado en etapas tempranas de la degeneración concuerda con lo descrito en otras enfermedades neurodegenerativas (Holmes *et al.*, 2009; Gezen-Ak *et al.*, 2013; Majbour *et al.*, 2020) y apoyaría el posible uso de *Tnfa* como un biomarcador temprano de degeneración neuronal, como han sugerido algunos autores (Janelins *et al.*, 2005; Gezen-Ak *et al.*, 2013). Sin embargo, nuestros resultados difieren de los publicados previamente en los que se observó un aumento global de genes relacionados con la activación microglial a P20 en el ratón PCD, encontrándose entre ellos los genes *Nfkb*, *Il6* e *Ifny* (Baltanás *et al.*, 2013). Estas diferencias en los resultados podrían deberse tanto a las muestras a partir de las cuales se extrajo el mRNA, como a la propia técnica para la cuantificación de los cambios en la cantidad de mRNA. Por un lado, en esta Tesis Doctoral se han utilizado los hemis cerebelos izquierdos, los cuales contienen tanto vermis como hemisferio cerebeloso, mientras que en el estudio publicado por Baltanás *et al.* (2013) se empleó exclusivamente el vermis. De esta forma, el uso del vermis y de los hemisferios en conjunto podría estar enmascarando los cambios en la expresión génica observados exclusivamente en el vermis (Baltanás *et al.*, 2013). Por otro lado, en esta Tesis Doctoral se ha empleado como método de detección de

los cambios de los niveles de mRNA la técnica de la qPCR, mientras que en el estudio de Baltanás *et al.* (2013) el análisis se realizó mediante hibridación en *microarray*. Aunque de forma general ambas técnicas suelen coincidir en los resultados obtenidos, existen limitaciones en el uso de *microarrays* y siempre es aconsejable comprobar los resultados obtenidos posteriormente mediante qPCR debido a que la sensibilidad y especificidad de esta última técnica es mayor (Etienne *et al.*, 2004; Morey *et al.*, 2006). En todo caso, estas diferencias concretas pueden considerarse poco relevantes, si tenemos en cuenta que los resultados globales de ambos trabajos son comparables.

A P30 -cuando prácticamente todas las células de Purkinje han degenerado en el cerebelo del ratón PCD- sí se detectó un aumento general de la expresión génica de los factores *Ifny*, *Il1 β* , *Il6*, *iNos* y *Tnfa*. Esta progresión en la expresión de genes relacionados con la inflamación entre P20 y P30 concuerda con un estudio previo en el que a P23 tampoco se observó un cambio significativo en la expresión de genes que codificaban para factores proinflamatorios, mientras que estos cambios se hicieron evidentes a partir de P26 (Kyuhou *et al.*, 2006). Esta tormenta de mediadores proinflamatorios, producidos principalmente por la microglía y los macrófagos, estaría promoviendo un ambiente neurotóxico que contribuiría a la degeneración de las células de Purkinje, como se ha descrito en otros modelos de neurodegeneración (Song y Suk, 2017; Stephenson *et al.*, 2018; Singh-Bains *et al.*, 2019; Subhramanyam *et al.*, 2019; Kwon y Koh, 2020). Curiosamente, no se observaron diferencias en la expresión génica de otros factores y enzimas proinflamatorias como COX2 y NF κ B. A pesar de que en algunos modelos de daño cerebral se ha detectado un aumento en estos mediadores (para revisión Minghetti, 2007), no parecen ser un rasgo común para todas las enfermedades que conllevan algún tipo de inflamación, como sí lo son las citocinas IL1 β , IFN γ , IL6 y TNF α (Minghetti, 2007; Wang *et al.*, 2015). Además, algunos autores sugieren la existencia de diferentes cascadas y perfiles inflamatorios, así como la activación de inflamomas específicos en función del daño cerebral particular (Heneka *et al.*, 2018; Liberman *et al.*, 2018; Voet *et al.*, 2019; Brahadeeswaran *et al.*, 2022). Por otro lado, a P30 también se observó una disminución de la expresión génica del factor neurotrófico *Bdnf*, como ya había sido demostrado en el cerebelo de animales PCD de cuatro meses de edad y en otros modelos de enfermedades neurológicas (Salomova *et al.*, 2020; para revisión Lima Giacobbo *et al.*, 2019). Sin embargo, el motivo exacto por el que se produce una reducción en la expresión génica de *Bdnf* aún se desconoce, aunque se sabe que las citocinas proinflamatorias, particularmente IL1 β , producen una disminución en la expresión génica de este factor neurotrófico (Lapchak *et*

al., 1993; Guan y Fang, 2006). Así, el aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias observado en el cerebelo del ratón PCD podría ser una de las causas de la disminución en los niveles de mRNA de *Bdnf*. En cuanto a los genes de las proteínas GAP43 y MAP2, no se observaron cambios en el cerebelo del ratón PCD. Esta estabilidad génica no es sorprendente, dado que la expresión de estas proteínas se localiza principalmente en los granos del cerebelo (Triarhou *et al.*, 1998; Casoli *et al.*, 2001), y a la edad analizada estos no se encuentran afectados (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Sin embargo, estos resultados contrastan con los publicados previamente por Li *et al.* en 2010 donde se observó una reducción en los niveles de mRNA de *Map1* y *Map2* en las células de Purkinje del ratón *pcd^{Sid}* (Li *et al.*, 2010). Estas diferencias podrían deberse a variaciones de la mutación específica del modelo (*pcd^{1J}* y *pcd^{Sid}*), o bien a que en nuestro estudio se analizó la expresión génica del hemiserebelo izquierdo completo, incluyéndose todos los elementos neurales y gliales del cerebelo, mientras que en trabajo de Li *et al.* (2010) se realizó exclusivamente en las células de Purkinje (Li *et al.*, 2010).

En cuanto al efecto del tratamiento con OEA, los análisis de expresión génica a medio plazo (P20) resultaron, en cierto modo, sorprendentes. Así, en los ratones PCD inyectados con OEA se observó un aumento de la expresión génica de los factores inflamatorios *Cox2*, *Ifny*, *Il1 β* , *Il6* y *Tnfa*, y -únicamente- del factor neurotrófico *Bdnf*, comparado con los mutantes sin tratamiento o con los animales WT. Es decir, a medio plazo la OEA parecía estar promoviendo la inflamación ante un proceso degenerativo. Curiosamente, a P30 este escenario cambió completamente. A esta edad, los animales PCD tratados con OEA presentaron una disminución general de la expresión génica de los factores proinflamatorios *Ifny*, *Il1 β* , *Il6*, *Tnfa* respecto a los animales PCD sin tratar asemejándose al de animales WT. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente tanto *in vitro* como *in vivo* en otros modelos experimentales de neuroinflamación cuya causa primaria no era la degeneración neuronal (Zhou *et al.*, 2012, 2017; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020). Además, la administración de OEA también incrementó a P30 los niveles de mRNA de *Bdnf* y *Map2*, como se había demostrado previamente (Bento-Abreu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019). BDNF y MAP2 están involucrados en fenómenos de supervivencia neuronal y estabilidad de los microtúbulos, respectivamente (Illenberger *et al.*, 1996; para revisión Bodakuntla *et al.*, 2020). Este aumento en la expresión de ambos factores podría estar

contribuyendo a la prevención de la muerte de las células de Purkinje y al re-establecimiento de la dinámica y estabilidad de los microtúbulos, alterada en el ratón PCD como indicamos en el apartado anterior (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un posible efecto dual de la OEA, al menos en el modelo PCD de neurodegeneración y neuroinflamación. De este modo, al comienzo de la degeneración, cuando una respuesta neuroinflamatoria aguda es beneficiosa para limitar el daño y la región afectada en el SNC (Schwartz y Baruch, 2014), la OEA actuaría incrementando esta respuesta. Además, hay que tener en cuenta que alrededor de P20 tiene lugar un fuerte proceso de remodelación sináptica en el cerebelo de los ratones protagonizado por la microglía, leucocitos y la presencia de diferentes citocinas y factores reguladores (White y Sillitoe, 2013; Kano y Watanabe, 2019; Ferro *et al.*, 2021). Precisamente, los endocannabinoides ejercen un efecto sobre estas poblaciones celulares (para revisión Tanaka *et al.*, 2020). Por ello, la administración de OEA podría estar ejerciendo un efecto indirecto en estos procesos de plasticidad y remodelación sináptica que contribuiría al aumento en las citocinas observadas, tal y como se discutirá más adelante. A largo plazo, sin embargo, la OEA modularía la expresión génica de mediadores proinflamatorios y aumentaría la de factores neurotróficos, generando un ambiente menos neurotóxico en el que el estado neuroinflamatorio no fuera tan exacerbado, agresivo y perjudicial para las neuronas del cerebelo del ratón PCD. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primero en describir la acción dual de la OEA a la hora de regular la inflamación ante un proceso de degeneración neuronal.

Por último, también quisimos evaluar la expresión génica de los receptores PPAR α , puesto que se consideran los principales receptores a través de los cuales la OEA ejerce su acción (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003, 2005). En los animales PCD, se observó una reducción en los niveles de expresión génica de *Ppara* tanto a P20 como a P30. Sin embargo, la administración de OEA, produjo un aumento en los niveles de mRNA de este receptor a P30. Estos resultados concuerdan con estudios previos (Zhou *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2019) y con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio donde, mediante inmunohistoquímica, se detectó una reducción de la expresión del receptor PPAR α en las células de Purkinje del ratón PCD que aumentó tras el tratamiento con OEA (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Aunque no se puede descartar la implicación de otros receptores o una acción directa o indirecta de la OEA sobre la supervivencia neuronal, estos resultados parecen indicar que los efectos antiinflamatorios de la OEA están mediados principalmente por receptores

PPAR α . De hecho, cuando estos receptores se silencian o se bloquean farmacológicamente, no se observan las propiedades antiinflamatorias de la OEA mencionadas previamente (Bilbao *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020).

En resumen, el efecto neuroprotector de la OEA se debe -al menos en gran parte- a una regulación de la inflamación. Dicha regulación parece ejercerse de una forma dual y estar mediada por los receptores PPAR α .

La OEA disminuye la microgliosis y modula su fenotipo hacia un estado antiinflamatorio

Una de las consecuencias de la degeneración de las células de Purkinje en el ratón PCD es una gliosis reactiva en el cerebelo, caracterizada principalmente por la hipertrofia y los cambios morfológicos de las células microgliales, la modificación de su distribución hacia las capas externas de la corteza cerebelosa y el aumento en la producción de moléculas proinflamatorias (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2018). En la presente Tesis Doctoral se han analizado cuantitativamente estos cambios de densidad, distribución y fenotipo de la microglía en el cerebelo del ratón PCD, así como su modulación mediante el tratamiento con OEA.

En primer lugar, nuestra investigación corrobora los cambios ya descritos cualitativamente referidos a la hipertrofia y la distribución de la microglía en el cerebelo del ratón PCD (Baltanás *et al.*, 2013), ofreciendo, además, datos más minuciosos y cuantitativos. Así, a P30 se detectó un aumento general de la densidad de estas células respecto a los animales WT, además de un cambio en su distribución. En los animales WT, la microglía se observó en todos los lóbulos del vermis, aunque preferentemente localizada en la capa más interna de la corteza cerebelosa (la CG), como se había descrito previamente (Vela *et al.*, 1995; Baltanás *et al.*, 2013). En cambio, en los ratones PCD la microglía se localizó preferentemente en los lóbulos del I al IX del vermis y en las capas más externas de la corteza cerebelosa (la CM y la CCP). Estas regiones coinciden precisamente con los lóbulos donde la degeneración es más agresiva, y con las capas de la corteza cerebelosa donde se localiza el soma y el árbol dendrítico de las células de Purkinje, es decir, donde está teniendo lugar la degeneración (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2013). Por el contrario, se observó una menor densidad de células microgliales en el lóbulo X, el cual muestra cierta resistencia a la neurodegeneración

(Wang y Morgan, 2007; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por otro lado, el análisis de la expresión de diferentes marcadores fenotípicos pro- y antiinflamatorios de la microglía demostró un incremento general en la actividad microglial en todos los ratones PCD respecto a los WT. Estos resultados concuerdan con los observados en otros modelos animales, en los que la activación de la microglía ante un daño en el SNC promovió cambios en la expresión de marcadores de superficie tanto proinflamatorios como antiinflamatorios (Mecha *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016; Salter y Stevens, 2017; Muzio *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2021). Además, en estos trabajos previos también se demuestra la coexistencia de poblaciones microgliales con diferente perfil de activación ante un daño neuronal, poniendo de manifiesto que la respuesta de la microglía es más compleja que la tradicional clasificación dicotómica M1 y M2 (Yang *et al.*, 2016; Salter y Stevens, 2017; Sun *et al.*, 2021).

En segundo lugar, el tratamiento con OEA redujo la microgliosis en el cerebelo del ratón PCD. Aunque no produjo un cambio en la distribución de las células microgliales -siendo mayoritarias en los lóbulos I al IX y en las capas CM y CCP- sí que disminuyó la densidad total de las mismas, como se había descrito en otros modelos de neuroinflamación (Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019). Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos donde se demostró la capacidad de los agonistas del receptor PPAR α para disminuir la respuesta microglial exacerbada (Herrera *et al.*, 2014; Guida *et al.*, 2017; entre otros). En el caso concreto de la OEA, esta propiedad se observó en modelos *in vitro* e *in vivo* de diversa etiología (Holubiec *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019), aunque en ninguno de ellos la causa primaria de la neuroinflamación y gliosis reactiva era la muerte neuronal. Al mismo tiempo, también se detectó un cambio en el porcentaje de las diferentes poblaciones microgliales en función de su fenotipo. Así, la OEA consiguió aumentar el porcentaje de microglía de tipo antiinflamatorio o reparador en el ratón PCD, a pesar de no mostrar ningún efecto en el porcentaje de microglía reactiva y proinflamatoria. Este fenómeno de polarización de la microglía desde un estado más proinflamatorio hacia uno más reparador o antiinflamatorio ya había sido descrito en diferentes modelos animales de neuroinflamación tras la administración de endocannabinoides agonistas de los receptores CB2, PPAR γ y TRPV1 (revisión en Mecha *et al.*, 2016; Song y Suk, 2017; Tanaka *et al.*, 2020). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto a través del cual la OEA ejerce estas acciones sobre la microglía. Hay que tener en cuenta que la presencia de diferentes mediadores inflamatorios en el microambiente en el que se encuentran las células microgliales

condiciona su perfil de activación (David y Kroner, 2011; Mecha *et al.*, 2016; Song y Suk, 2017). Así, de forma general, los mediadores inflamatorios IFN γ , LPS o la activación de receptores TLR4 promueven la activación de la microglía proinflamatoria, caracterizada por la expresión de marcadores de superficie como CD16/32, CD86, MHC-II e iNOS, y por la secreción de citocinas y quimiocinas como IL1 β , IL6, TNF α , entre otras (Mecha *et al.*, 2016). Por el contrario, mediadores como IL4, IL10, IL13, IL1 β desencadenan la activación de microglía reparadora o antiinflamatoria, caracterizada por la expresión de marcadores fenotípicos CD163, CD204, CD206 y Arginasa 1, entre otros (Mecha *et al.*, 2016). Pero, además, diversas moléculas de señalización intracelulares y receptores nucleares -entre ellos PPAR, RXR, NF κ B- también se han relacionado con el proceso de polarización del fenotipo de la microglía (Song y Suk, 2017). Teniendo en cuenta que la microglía expresa los receptores PPAR α (Kim *et al.*, 2006; Warden *et al.*, 2016), la administración de OEA podría estar modulando estas células de forma directa a través de estos receptores, pero también de forma indirecta, mediante la regulación de los mediadores inflamatorios de su microambiente, como se ha discutido previamente. Por último, hay que aclarar que en este trabajo únicamente se han evaluado los cambios en los porcentajes de tres poblaciones microgliales muy específicas (CD45+, CD16/32+ y CD206+). Si se considera que la activación de la microglía consiste en un amplio espectro de expresión de moléculas de superficie y secreción de factores pro- y antiinflamatorios, sería recomendable analizar un mayor número de marcadores para conocer de forma holística el efecto de la OEA sobre el fenotipo de la microglía.

En resumen, la administración de OEA reduce la microgliosis y modula el fenotipo microglial hacia un estado antiinflamatorio y neuroprotector en el cerebelo del ratón PCD a P30. Teniendo en cuenta que dos aspectos comunes en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son un estado inflamatorio crónico en el SNC y una activación exacerbada de la microglía, los hallazgos descritos en este estudio son realmente prometedores y apoyan el uso de la OEA en la clínica para reducir la neuroinflamación, y con ello mejorar la evolución de ciertas enfermedades neurodegenerativas.

La OEA reduce el reclutamiento de leucocitos periféricos

Un estado neuroinflamatorio exacerbado puede alterar la estructura y permeabilidad de la BHE, y promover la infiltración masiva de leucocitos desde el sistema inmunitario periférico hacia la región encefálica afectada (Schwartz y Baruch, 2014; Sweeney *et al.*, 2018; Profaci *et al.*, 2020). Recientemente en nuestro laboratorio se ha descubierto que la

degeneración de las células de Purkinje en el ratón PCD promueve la atracción e infiltración de leucocitos periféricos desde el torrente sanguíneo hacia el parénquima cerebeloso (Del Pilar *et al.*, 2021), al igual que ocurre en otros modelos de neurodegeneración (Schwartz y Baruch, 2014; Kwon y Koh, 2020). Además, en el estudio publicado por Del Pilar *et al.* (2021) se evidenció un aumento del número de leucocitos en las capas más externas de la corteza cerebelosa, donde tiene lugar la degeneración primaria (Del Pilar *et al.*, 2021). En nuestro caso analizamos la distribución de los leucocitos por lóbulos con el fin de evaluar si también seguía un patrón similar al observado en la microglía (descrito previamente) a P30. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los diferentes lóbulos analizados en ninguno de los grupos experimentales, distribuyéndose de forma homogénea por todo el vermis cerebeloso. Este resultado difiere de las diferencias regionales de la degeneración de células de Purkinje y de la microgliosis asociada del cerebelo del ratón PCD a esta edad. En concreto, destaca la presencia de leucocitos en el lóbulo X a pesar de que la degeneración en esta región acaba de comenzar y no presenta una fuerte microgliosis a P30 (Landis y Mullen, 1978; Baltanás *et al.*, 2013). Una explicación plausible podría estar relacionada con la entrada uniforme de células del sistema inmunitario desde las meninges hacia todos los lóbulos del cerebelo (Wilson *et al.*, 2010; Ransohoff *et al.*, 2015). Además, este fenómeno apoyaría la mayor densidad de leucocitos observada en las capas externas de la corteza cerebelosa al ser la región más cercana a las meninges (Del Pilar *et al.*, 2021). Otra posible explicación estaría relacionada con la disposición anatómica del lóbulo X, íntimamente ligado al cuarto ventrículo que constituye otra de las principales vías de entrada de las células inmunitarias al SNC (Ransohoff *et al.*, 2015). Así, el lóbulo X podría considerarse como una región “de paso” de células del sistema inmunitario desde el sistema ventricular a otras regiones cerebelosas y explicaría la presencia de estas, a pesar de que aún no presenta signos evidentes de degeneración. Por último, puede ocurrir que la infiltración leucocitaria se produzca de una forma más temprana que otros signos de daño neuronal, incluso antes de que la muerte de las células de Purkinje del lóbulo X sea evidente. De hecho, en el mismo trabajo de Del Pilar *et al.* (2021) se hipotetiza que algunos cambios en el sistema inmunitario puedan ser un marcador temprano de degeneración neuronal.

El fenómeno de infiltración de células del sistema inmunitario periférico hacia el SNC es muy común en muchos modelos de enfermedades neurodegenerativas y puede agravar el proceso de muerte neuronal (Kyuhou *et al.*, 2006; Schwartz y Baruch, 2014; Sweeney *et al.*, 2018; Profaci *et al.*, 2020; Del Pilar *et al.*, 2021). Por ello, quisimos evaluar si el

ambiente más neuroprotector y menos neurotóxico en el cerebelo del ratón PCD promovido por la OEA influía en la atracción e infiltración de leucocitos hacia el parénquima cerebeloso. Nuestros resultados demostraron por primera vez que el tratamiento con OEA reduce dicha infiltración en un modelo de neuroinflamación y degeneración neuronal, llegando a valores basales comparables con los de los animales WT. Sin embargo, no está claro si este reajuste puede deberse a la disminución general del estado inflamatorio del cerebelo promovida por la OEA y/o a un efecto del fármaco sobre la BHE. En este sentido, se ha demostrado que algunos componentes del sistema endocannabinoide son capaces de regular la permeabilidad de la BHE (Panikashvili *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012; Hind *et al.*, 2015). En concreto, la OEA a través del receptor PPAR α mantuvo la integridad de la BHE y, por lo tanto, disminuyó su permeabilidad en estudios *in vitro* donde se emplearon cultivos de astrocitos y células endoteliales humanas (Hind *et al.*, 2015), así como en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral (Zhou *et al.*, 2012). Por ello, aunque sería necesario realizar una investigación detallada sobre la BHE de los ratones PCD con el fin de dilucidar si existe una alteración o no de la misma y si la OEA ejerce algún tipo de acción sobre ella, los datos que disponemos actualmente apoyan este posible efecto.

A pesar de que aún no se conoce el mecanismo exacto a través del cual la OEA estaría mediando la reducción del reclutamiento de leucocitos desde el sistema inmunitario periférico hacia el parénquima cerebeloso en el ratón PCD, estos hallazgos abren aún más el abanico de acciones terapéuticas de la OEA conocidas hasta la fecha.

Efecto del tratamiento con OEA en la fisiología del cerebelo y comportamiento del ratón PCD

Dado el efecto neuroprotector de la OEA en el cerebelo del ratón PCD, quisimos comprobar si esta mejora se traducía en cambios en la actividad electrofisiológica de esta región, así como en una recuperación de las funciones motora, cognitiva y social afectadas en este modelo (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Propiedades electrofisiológicas del cerebelo del ratón PCD

Hasta la fecha prácticamente no existe bibliografía disponible sobre las características electrofisiológicas del cerebelo del ratón PCD. Grüsser-Cornehls y Bäurle (2001) analizaron la actividad electrofisiológica en el núcleo vestibular de este modelo y

observaron que no se producía un aumento en la actividad espontánea, al contrario de lo esperado debido a la eliminación de la inhibición tónica de las células de Purkinje. Ello sugiere la posible existencia de mecanismos compensatorios en este sistema (Grüsser-Cornehls y Bäurle, 2001). Por el contrario, no existen estudios publicados sobre la actividad electrofisiológica de las células de Purkinje y los NCP. Una de las posibles causas sería la gran dificultad para localizar y registrar este tipo de neuronas, que a edad temprana (P30) prácticamente han degenerado en su totalidad (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Además, la técnica de registro electrofisiológico *in vivo* con la cabeza fija está estandarizada y optimizada en animales adultos (Tara *et al.*, 2018; Snell *et al.*, 2022), presentando limitaciones en el registro de animales jóvenes, momento de especial relevancia en el modelo PCD. Por ello, la adaptación de esta técnica de registro a animales jóvenes presentada en esta Tesis Doctoral ya supone un avance significativo: no solamente abre la posibilidad de realizar un estudio exhaustivo de la actividad electrofisiológica en el cerebelo del ratón PCD, sino que amplía su posible aplicación en otros modelos experimentales de pequeño tamaño y en diferentes ventanas temporales. En cuanto a los resultados preliminares obtenidos en el ratón PCD, no se observó una diferencia evidente en ninguna de las variables analizadas relacionadas con la actividad electrofisiológica de las células de Purkinje y los NCP, aunque sería necesario incrementar el tamaño muestral para poder obtener unos resultados concluyentes al respecto. Uno de los resultados menos esperados fue el relacionado con el ISI CV. Este parámetro mide la irregularidad de los disparos de las neuronas, y en el caso concreto de las células de Purkinje y los NCP, se ha demostrado que el funcionamiento anómalo del cerebelo correlaciona con un aumento en el valor de este parámetro (Walter *et al.*, 2006; Fremont *et al.*, 2015; Tara *et al.*, 2018; Washburn *et al.*, 2019). De este modo, debido a la degeneración de las células de Purkinje y la atrofia cerebelosa del ratón PCD, cabría esperar unos valores de ISI CV mayores con respecto a los de los animales WT. Sin embargo, con los datos preliminares disponibles hasta la fecha, no parece existir un cambio evidente ni en las células de Purkinje ni en los NCP del ratón PCD. Estos resultados podrían indicar la existencia de algún tipo de mecanismo compensatorio en este circuito, como el especulado previamente en el circuito del núcleo vestibular por Grüsser-Cornehls y Bäurle (2001). Por último, tampoco se observaron diferencias evidentes con el efecto de la OEA. En todo caso, conviene recalcar que todos estos resultados son meramente informativos y especulativos, puesto que no disponemos de un tamaño muestral suficiente como para extraer resultados concluyentes.

La OEA mejora parcialmente el comportamiento motor, cognitivo y social del ratón PCD

A pesar de que el cerebelo se ha considerado tradicionalmente una estructura de integración sensoriomotora (Ito, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007; Manto *et al.*, 2012), en las últimas décadas se ha demostrado su participación esencial en otras funciones de tipo cognitivo, afectivo y social, y relacionadas con el lenguaje, la atención e incluso con la memoria (Reeber *et al.*, 2013; Vožeh, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Carta *et al.*, 2019). Así, una afectación de esta región encefálica provoca la aparición de alteraciones en estas funciones como se ha descrito en varios modelos animales, incluido el ratón PCD (Landis y Mullen, 1978; Goodlett *et al.*, 1992; Le Marec y Lalonde, 1997; Lalonde y Strazielle, 2003, 2019; Tuma *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Más aún, este tipo de alteraciones también se han detectado en personas portadoras de una mutación análoga a la del ratón PCD, y que sufren la enfermedad denominada CONDCA (Shashi *et al.*, 2018; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021). Debido a que la causa principal de estos fallos en el comportamiento se debe a la degeneración de las células de Purkinje, el efecto neuroprotector de la OEA tanto en la citoarquitectura como en la supervivencia de estas neuronas debería promover una mejora funcional. En este sentido, la administración de OEA no solamente mejoró la realización de ciertas pruebas de comportamiento, como en el test del *Rotarod*, sino que también consiguió recuperar completamente algunas de las funciones alteradas, como la memoria de reconocimiento y la preferencia social hasta P30. Así, en relación con la función motora, los ratones PCD tratados con OEA mostraron una motricidad intermedia entre los animales WT y los PCD sin tratamiento, aunque no se observó una mejora progresiva debida debido al aprendizaje como la que ocurre en los animales WT (Buitrago, 2004). Además, los mutantes que recibieron el tratamiento con OEA mantuvieron un patrón de comportamiento general similar al de los animales WT hasta P30, sin observarse efectos secundarios como la hipolocomoción descrita en estudios previos en los que se emplearon altas dosis del fármaco (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; González-Aparicio y Moratalla, 2014; Fedele *et al.*, 2018). En cuanto a la memoria de reconocimiento y la preferencia social, ambas funciones se mantuvieron hasta P30 con valores similares a los de animales WT, coincidiendo con estudios previos en los que el tratamiento con endocannabinoides recuperó las funciones cognitivas, afectivas y sociales en modelos de daño neuronal (Campolongo *et al.*, 2009; Mazzola *et al.*, 2009; D'Agostino *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Mirza y Sharma, 2018; Moya *et al.*, 2021; Rani *et*

al., 2021). A P40, sin embargo, las mejoras tanto en el comportamiento motor, cognitivo y social no se mantuvieron en los mutantes tratados con OEA. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis histológico que se han discutido previamente, y de nuevo sugerirían un efecto temporal limitado de la OEA.

Por último, no se observó una disminución del peso de los animales con ninguna de las pautas de administración evaluadas en esta Tesis Doctoral, a pesar del efecto anorexigénico de la OEA descrito previamente (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003, 2005; Fedele *et al.*, 2018). Estos resultados indicarían que la dosis y pauta de administración empleada en nuestras investigaciones serían seguras y óptimas para ejercer un efecto neuroprotector, minimizando al máximo la aparición de efectos secundarios asociados.

En resumen, la administración de OEA mediante la estabilización de la citoarquitectura de las células de Purkinje y el retraso de su muerte neuronal, junto a la modulación de la neuroinflamación cerebelosa asociada, consigue mantener parcialmente las funciones relacionadas con la fisiología del cerebelo hasta P30, aunque estos efectos no se prolongan a edades más tardías. A pesar de ello, estos hallazgos abren futuras líneas de trabajo en las que evaluar posibles re-administraciones del fármaco o estudiar su combinación con otras estrategias terapéuticas, como la terapia celular, para obtener una neuroprotección a largo plazo.

Los efectos observados de la OEA en el ratón PCD están mediados principalmente por los receptores PPAR α

Diversos estudios previos habían demostrado que los principales receptores a través de los cuales la OEA ejerce su acción son los PPAR α , aunque también se ha observado cierta afinidad por el receptor TRPV1 y el GPR119 (Wang *et al.*, 2005; González-Aparicio y Moratalla, 2014; Henry *et al.*, 2017). En la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral, presentamos evidencias que demuestran que los efectos de la OEA observados a nivel génico, histológico y del comportamiento en el ratón PCD estarían mediados principalmente por el receptor PPAR α (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003; Lo Verme *et al.*, 2005; Bento-Abreu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Así, cuando se inhibieron estos receptores de forma previa al tratamiento con OEA mediante el antagonista GW6471, tanto los efectos histológicos como los comportamentales fueron eliminados completamente (Pérez-Martín *et al.*, 2021). Estos resultados concuerdan con los descritos

previamente, según los que tras la inhibición o silenciamiento de los receptores PPAR α , o en su ausencia en animales *knock-out*, no se detectaron las acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras de la OEA (Sun *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012; González-Aparicio *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016, 2015; Bilbao *et al.*, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Por último, también observamos que la administración de OEA promovió un aumento en la expresión génica de *Ppara* tanto a corto como a largo plazo. Como se ha discutido en apartados anteriores, estos resultados concuerdan con el aumento observado mediante inmunohistoquímica en la expresión del propio receptor en el cerebelo del ratón PCD tras el tratamiento con OEA (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Por lo tanto, aunque no podemos descartar la participación de otros receptores como los TRPV1 o los GPR119, o incluso un efecto indirecto o periférico de la OEA, en base a los resultados expuestos en este trabajo, los efectos beneficiosos de la OEA estarían mediados principalmente por los receptores PPAR α .

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS COMBINADOS EN EL RATÓN PCD

Desde hace décadas, la terapia celular ha sido una de las estrategias más prometedoras en la investigación de tratamientos frente a las enfermedades neurodegenerativas. Ello se debe, por un lado, a la capacidad de fusión entre las células trasplantadas y las propias células del organismo receptor, para potencialmente suplir génica o metabólicamente los déficits que presente (rescate celular). Por otro, a las propiedades neuroprotectoras de las células madre, bien de forma directa en el SNC o mediante acciones paracrinas (protección celular; Uccelli *et al.* 2008). En relación con el cerebelo, numerosos estudios previos han demostrado la llegada tanto de BMSC como de MSCs y su fusión con las células de Purkinje en diferentes modelos animales, incluido el ratón PCD (Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003, 2007; Weimann *et al.*, 2003a; Magrassi *et al.*, 2007; Bae *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Kemp *et al.*, 2011, 2018a, 2018b; Recio *et al.*, 2011; Edalatmanesh *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018, 2019; Matsuura *et al.*, 2014; Huda *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2021). Sin embargo, en muchos de ellos, la llegada y la posterior formación de heterocariones entre las células derivadas del trasplante y las células de Purkinje no se detectó hasta pasados mínimo dos meses tras el mismo (Álvarez-Dolado *et al.*, 2003, 2007; Magrassi *et al.*, 2007; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018; entre otros). En nuestro laboratorio se han evaluado diferentes estrategias basadas en esta terapia celular en el ratón PCD, demostrándose cierta

neuroprotección (Díaz, 2011; Díaz *et al.*, 2012a, 2012b, 2018, 2019; Del Pilar, 2021). Sin embargo, uno de los principales factores limitantes de los trasplantes celulares como terapia de rescate celular en modelos de degeneración neuronal rápida y agresiva es el tiempo necesario para que se produzcan estos fenómenos de fusión. Teniendo en cuenta que a partir de P40 el cerebelo del ratón PCD está prácticamente desprovisto de células de Purkinje (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007; Pérez-Martín *et al.*, 2021), esta terapia no sería muy eficaz si el único objetivo es promover la fusión celular.

El empleo de terapias celulares en combinación con otro tratamiento que retrase la degeneración y, por lo tanto, permita ampliar la ventana temporal en la que poder realizar el trasplante, podría aumentar la eficacia de este. En este escenario, la terapia farmacológica con OEA se erige como una candidata ideal. Como se ha descrito y discutido previamente, el tratamiento con OEA presenta un efecto neuroprotector preventivo, retrasando la degeneración y la pérdida de las células de Purkinje del ratón PCD (Pérez-Martín *et al.*, 2021). Por lo tanto, la OEA mediante sus acciones neuroprotectoras estaría ampliando precisamente la ventana temporal en la que el trasplante con células madre podría ser más eficaz. Dicho de otro modo, la densidad de células de Purkinje con las que las células derivadas del trasplante podrían fusionarse para rescatarlas de forma duradera sería mayor durante más tiempo. No obstante, no debemos olvidar que independientemente de que exista fusión celular o no, tanto las BMSC como las MSCs podrían ejercer una neuroprotección adicional mediante la liberación de factores neurotróficos o la modulación del microambiente neurodegenerativo (Uccelli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2020). Además, tanto la terapia exclusiva con OEA como la terapia celular con BMSC han mostrado efectos neuroprotectores en el ratón PCD (Díaz *et al.*, 2012b, 2018, 2019; Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021), por lo que el empleo combinado de ambas podría suponer un efecto sinérgico de las propiedades individuales. Además, si consideramos la implicación del sistema endocannabinoide y los receptores PPAR α en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la migración de las células hematopoyéticas y MSCs (Jiang *et al.*, 2011; Galve-Roperh *et al.*, 2013; Wollank *et al.*, 2015), también existe la posibilidad de que la administración de OEA como agonista del receptor PPAR α (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003) facilite estos fenómenos en las células madre trasplantadas.

El principal objetivo de la segunda estrategia terapéutica de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el posible efecto neuroprotector sinérgico de la combinación de la

administración de OEA y el trasplante completo sustitutivo con BMSC. Dado que esta terapia combinada no mostró un mayor efecto neuroprotector respecto al tratamiento exclusivo con OEA y que, además, provocó un efecto deletéreo en el peso de los animales debido a la mieloablación, decidimos evaluar una nueva estrategia modificando el tipo celular empleado y la pauta del trasplante. En esta se evaluó el tratamiento de OEA junto al trasplante continuo de MSCs sin condicionamiento previo mieloablativo. Una de las posibles ventajas de esta nueva estrategia sería la disminución del riesgo de aparición de efectos secundarios negativos asociados a los tratamientos mieloablativos. Además, el trasplante continuo de células madre se ha realizado con éxito en un estudio previo de nuestro laboratorio (Díaz *et al.*, 2019), y facilitaría el aporte casi diario no solo de las células madre sino también de los factores tróficos derivados (Uccelli *et al.*, 2008, 2011; Chen *et al.*, 2018).

El tratamiento combinado de OEA y células madre es seguro y eficaz

Los estudios en los que se evaluó individualmente la terapia farmacológica con OEA o la terapia con células madre -bien BMSC o MSCs-, demostraron que ambos tratamientos eran seguros y eficaces en el ratón PCD, al igual que había sido demostrado en otros modelos de afectación cerebelosa (Bae *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015, 2018, 2019; Nakamura *et al.*, 2015; Huda *et al.*, 2016; Kemp *et al.*, 2018a, 2018b; Correia *et al.*, 2021; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Sin embargo, debido a que este era el primer estudio en el que se combinaban ambas terapias, el primer paso a seguir fue analizar la eficacia y la viabilidad tanto de las células trasplantadas como de la propia técnica del trasplante.

En primer lugar, se analizó la viabilidad y la supervivencia de las células trasplantadas. Para ello se empleó el colorante azul de tripán en las células sobrantes tras los diferentes trasplantes que, lógicamente, habían sufrido las mismas manipulaciones que las inyectadas en los animales. En todos los casos el número de células que incorporaron este colorante fue prácticamente inexistente, demostrando su supervivencia a lo largo del proceso de extracción y, en el caso concreto de las MSCs, tras su manipulación y su cultivo. Por otro lado, la cantidad de células empleadas -7,5 millones de BMSC y 2 millones en total de MSCs- y el método de ablación de la médula ósea -cuando fue necesario- fueron similares a los empleados en trabajos previos con resultados positivos (Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Recio, 2008; Kemp *et al.*, 2011; Recio *et al.*, 2011; Díaz, 2011; Díaz *et al.*, 2012b; 2015, 2018; Wang *et al.*, 2018).

En segundo lugar, para evaluar la seguridad del trasplante se realizó un seguimiento exhaustivo de la apariencia física y del comportamiento de los animales que recibieron cualquier tipo de células, a lo largo de su periodo de supervivencia correspondiente. Únicamente se produjo la muerte de tres animales del total que recibieron el tratamiento combinado de OEA y BMSC, y que previamente habían sido irradiados. Sin embargo, no podemos determinar si la causa de la muerte se debió al propio proceso de ablación y fallo en la incorporación de células trasplantadas, a un posible efecto deletéreo del tratamiento combinado o a causas comunes de mortalidad del modelo PCD. Cabe destacar que en los animales tratados con OEA y con el trasplante completo de BMSC, se detectó una disminución de su peso corporal respecto al resto de tratamientos evaluados. Como se discutió previamente, la dosis y pauta de administración empleada de OEA (10 mg/kg, i.p., P12) no mostró un efecto anorexigénico en los animales que recibieron exclusivamente el tratamiento farmacológico. Por lo tanto, el efecto deletéreo en el peso corporal de los animales que recibieron OEA y trasplante completo de BMSC podría estar causado por el proceso de irradiación, como se ha demostrado tanto en modelos animales como en personas que han sido sometidas a un tratamiento de radioterapia (Koch *et al.*, 2016). Ello está apoyado por el hecho de que en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y células MSCs -y que no fueron sometidos a una radiación mieloablativa- no se observó una disminución del peso.

En tercer lugar, se analizó el porcentaje de células derivadas de los diferentes trasplantes en la sangre de los animales tratados. El objetivo de este análisis fue diferente en cada uno de los tratamientos combinados. En los animales tratados con OEA y un trasplante completo de BMSC, el objetivo fue evaluar la eficacia del tratamiento en la reconstitución de su médula ósea (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015). Los valores del grado de quimerismo en sangre obtenidos fueron similares a los publicados en estudios previos de nuestro laboratorio donde se realizó este mismo tipo de trasplante (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018, 2019). Cabe destacar que tan solo diez días tras el trasplante, ya se detectó un porcentaje medio de células GFP+ en sangre de más del 40 % del total de células nucleadas. Durante el proceso de reconstitución de la médula ósea tras su ablación, se diferencian dos etapas principales en base a las poblaciones del sistema inmunitario derivadas del trasplante que se observan en el bazo de los animales receptores (Auletta *et al.*, 2004; Duran-Struuck y Dysko, 2009). La primera fase de reconstitución temprana tiene lugar entre los 7 y los 14 días (dependiendo de la cepa empleada) y se caracteriza por la presencia de monocitos, células dendríticas y neutrófilos. Alrededor del

día 21 tiene lugar la denominada reconstitución tardía, en la que se observan células derivadas del trasplante pertenecientes a todas las poblaciones celulares y acelulares del sistema inmunitario (Auletta *et al.*, 2004; Duran-Struuck y Dysko, 2009). Por lo tanto, cabría esperar que las células derivadas del trasplante detectadas en la sangre periférica de los animales receptores fueran principalmente monocitos, células dendríticas y neutrófilos. En todo caso, sería necesaria una caracterización más exhaustiva de dichas células para comprobar esta hipótesis, más allá de los objetivos de la presente Tesis Doctoral. Independientemente de estas poblaciones, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el trasplante de BMSC en combinación con la OEA es eficaz y consigue reconstituir la médula ósea de los animales receptores. Por su parte, en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y el trasplante continuo de MSCs el objetivo del análisis de la sangre periférica fue verificar la presencia de MSCs que pudiesen ejercer un efecto directo o indirecto en los animales receptores. En este caso, el porcentaje de células GFP+ fue mucho menor que el obtenido con el trasplante completo de BMSC. Sin embargo, el hecho de detectar células derivadas del trasplante en sangre demostró que las MSCs trasplantadas son capaces de mantenerse en el sistema circulatorio y escapar del sistema inmunitario de los ratones receptores, posiblemente debido a su baja inmunogenicidad, como se había descrito previamente (Uccelli *et al.*, 2008; Ankrum *et al.*, 2014).

La terapia combinada de OEA y BMSC mejora parcialmente el comportamiento motor del ratón PCD a P30

El comportamiento motor de los ratones PCD tratados con OEA y BMSC u OEA y MSCs se evaluó mediante la prueba *Rotarod* para poder compararse con el de los animales que recibieron exclusivamente el tratamiento con OEA. Ambos grupos mostraron una mejora en la realización de la prueba a P30 respecto a los animales PCD sin tratamiento. Sin embargo, únicamente el tratamiento combinado de OEA con un trasplante completo de BMSC mostró una mejora (sinérgica) con respecto a los resultados obtenidos tras el tratamiento exclusivo con OEA. Como se discutirá más adelante, esta mejora en el comportamiento no estaba acompañada de un mayor efecto neuroprotector en la morfología y supervivencia de las células de Purkinje, como también se ha descrito en otros modelos de degeneración cerebelosa (Jones *et al.*, 2010; Díaz, 2011; Edalatmanesh *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2018). Además, en un estudio previo de nuestro laboratorio en el que se realizó este mismo tipo de trasplante con BMSC en ratones PCD, se demostró que la mejora en el comportamiento motor observada se debía principalmente a un efecto

periférico debido a la integración y diferenciación de las BMSC en fibras del músculo estriado (Díaz *et al.*, 2018). Así, este fenómeno podría ser también la causa de la mejora adicional observada a P30 tras el tratamiento de OEA y BMSC en nuestro estudio. Además, tanto las BMSC como las MSCs secretan diversas quimiocinas, citocinas y factores neurotróficos que podrían estar contribuyendo a la mejora funcional en los ratones PCD a través de un efecto sobre otras poblaciones neuronales no analizadas o bien de forma periférica fuera del encéfalo (Sánchez-Ramos *et al.*, 2008; Uccelli *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2015, 2018; Chen *et al.*, 2018).

El tratamiento combinado de OEA y células madre permite la llegada e incorporación de células derivadas del trasplante al cerebelo

En ambos tipos de terapia combinada se detectaron células GFP+ en el cerebelo de los ratones receptores, aunque la densidad de estas fue completamente diferente en función del tipo de trasplante. Por ello, se discutirá por separado cada terapia combinada.

Terapia combinada de OEA y BMSC

En el caso de los animales que recibieron el tratamiento con OEA y el trasplante completo con BMSC conseguimos observar una alta densidad de células GFP+ en el cerebelo diez días tras el trasplante. Recordemos que estos animales, previo al trasplante, recibieron una dosis mieloablativa de radiación cuyos efectos secundarios tanto en el estado inflamatorio del animal como en la BHE podrían estar facilitando la llegada de BMSC al cerebelo (Yuan *et al.*, 2006; Magrassi *et al.*, 2007; Wiersema *et al.*, 2008; Espejel *et al.*, 2009; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015).

El tipo celular más numeroso derivado de este trasplante fue la microglía, aunque también se observaron elementos morfológicamente similares a células del sistema inmunitario periférico (macrófagos, monocitos o leucocitos). Estas células se detectaron en todo el parénquima cerebeloso, pero principalmente en las regiones próximas a las meninges, coincidiendo con estudios previos (Priller *et al.*, 2001; Díaz, 2011; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b; Kemp *et al.*, 2018b; Sailor *et al.*, 2022). Además, estas células se observaron tanto a P30, como a P35 y a P40. A pesar de que no se realizó una cuantificación de las mismas, cabría esperar un aumento en la incorporación a lo largo del tiempo tras el trasplante como se ha descrito en otros trabajos (Díaz, 2011; Recio *et al.*, 2011; Sailor *et al.*, 2022). En cuanto al proceso de formación de estas células,

probablemente fuera por diferenciación de las BMSC ya que todas ellas presentaron un único núcleo, al igual que en estudios previos (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b). Por el contrario, en ninguna de las edades analizadas se consiguió detectar la fusión entre BMSC y células de Purkinje, al contrario de lo mostrado en otros estudios (Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a, 2003b; Magrassi *et al.*, 2007; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la mayoría de los trabajos mencionados anteriormente se emplearon animales WT o animales heterocigotos para la mutación *pcd*, y que las células de Purkinje fusionadas con BMSC no se detectaron hasta pasado un mínimo de dos meses tras el trasplante (Magrassi *et al.*, 2007; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012). Por ello, una posible explicación de no haber detectado estos eventos de fusión en nuestro trabajo -a pesar de haberse reducido la muerte de las células de Purkinje- podría deberse a haber contado con un tiempo de supervivencia demasiado corto tras el trasplante. De esta forma, cabría la posibilidad de observar este fenómeno si se incrementara la edad de supervivencia a periodos análogos a los utilizados anteriormente (Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003; Weimann *et al.*, 2003a; Magrassi *et al.*, 2007; Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018), siempre y cuando se consiguiese mantener la supervivencia de un número adecuado de células de Purkinje durante un tiempo suficiente.

Terapia combinada de OEA y MSCs

En el cerebelo de los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y MSCs la densidad de células derivadas del trasplante fue extremadamente baja. Únicamente se detectaron células con morfología más o menos redondeada y dos células de Purkinje cuyo soma era GFP+, las cuales se caracterizaban por una morfología completamente aberrante y un árbol dendrítico desestructurado, como se había descrito previamente tras el trasplante continuo de BMSC en el ratón PCD (Díaz *et al.*, 2019). En ambas células, únicamente se observó un núcleo celular. Debido a la baja densidad de estos eventos no se continuó con su caracterización ni con el análisis de su procedencia. A pesar de no haber observado dos núcleos, no podemos descartar un posible fenómeno de fusión celular como los descritos en estudios previos con la técnica de visualización que hemos empleado en nuestro trabajo (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018). Además, hay que tener en cuenta que podría haber ocurrido un fenómeno de fusión transitoria como el propuesto por Nern C *et al.* (2009), o incluso que uno de los núcleos degenerase o fuera de menor tamaño (Nern *et al.*, 2009). Por último, algunos estudios contemplan la

transdiferenciación de las MSCs en células neuronales *in vivo* (Muñoz-Elías *et al.*, 2004). Sin embargo, existe controversia sobre la funcionalidad de las células neurales transdiferenciadas y, además, su baja densidad no explicaría los efectos neuroprotectores observados tras su uso en modelos de enfermedades neurodegenerativas (Uccelli *et al.*, 2008).

Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por otros autores, quienes empleando el mismo tipo celular sí consiguieron detectar numerosas células derivadas del trasplante en el cerebelo, incluso fusionadas con células de Purkinje (Bae *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Kemp *et al.*, 2011; Matsuura *et al.*, 2014; Huda *et al.*, 2016). En todos ellos, la edad de supervivencia de los receptores fue mayor que la empleada en nuestro estudio y, además, el trasplante de las MSCs se realizó vía intracerebelosa, evitando así las barreras físicas en las que las células madre pueden quedar atrapadas (Schrepfer *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2009). Más aún, existe la posibilidad de una interacción entre las MSCs y las células endoteliales de los microcapilares mediante moléculas de adhesión celular, que podrían estar limitando el número de MSCs libres en el torrente sanguíneo para alcanzar el encéfalo de los animales (Fischer *et al.*, 2009); ello también explicaría la baja densidad de células derivadas del trasplante encontradas en el cerebelo de los ratones receptores. En cualquier caso, si por algo destacan las MSCs es por la producción de citocinas y moléculas neurotróficas que podrían promover de forma indirecta o periférica un efecto neuroprotector (Uccelli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018). Curiosamente, Correia *et al.* observaron que la administración del secretoma de las MSCs ejercía un efecto neuroprotector mayor que el trasplante de las propias MSCs tanto a nivel celular como en el comportamiento en un modelo de ataxia cerebelosa (Correia *et al.*, 2021). Por ello, a pesar de no detectar MSCs en el cerebelo del ratón PCD, decidimos evaluar su efecto neuroprotector a nivel histológico al igual que se realizó con el tratamiento exclusivo de OEA y con el tratamiento combinado de OEA y BMSC.

Las terapias combinadas ejercen un efecto neuroprotector parcial a nivel histológico en el cerebelo

Las dos terapias combinadas de OEA con trasplantes celulares mostraron un efecto neuroprotector parcial en las células de Purkinje del cerebelo de los ratones PCD. Sin embargo, en general, no se observaron diferencias evidentes en la mayoría de las variables histológicas analizadas (área del soma, grosor de la dendrita primaria y densidad de las

células de Purkinje) respecto a las del tratamiento exclusivo con OEA (Pérez-Martín *et al.*, 2021). Al contrario de lo esperado, en alguna variable incluso se observó un efecto negativo o deletéreo cuando se empleó cualquiera de los tratamientos combinados respecto al tratamiento exclusivo con OEA; tal es el caso de la longitud del árbol dendrítico y la longitud de la dendrita primaria de las células de Purkinje. En el caso del tratamiento combinado de OEA y BMSC, una de las posibles causas de este efecto deletéreo sería la radiación mieloablativa previa al trasplante. Estudios previos han demostrado que la exposición a radiación en neonatos daña el cerebelo e induce cambios en la disposición de las células de Purkinje y en la morfología de su árbol dendrítico, lo que explicaría parcialmente los resultados obtenidos en nuestro trabajo (Altman y Anderson, 1971; Ralcewicz y Persaud, 1995; Espejel *et al.*, 2009). Sin embargo, el efecto deletéreo en el árbol dendrítico de las células de Purkinje también se detectó en los animales que recibieron el tratamiento combinado de OEA y MSCs sin radiación mieloablativa previa. En este sentido, otra posible explicación del efecto deletéreo observado en el árbol dendrítico sería la existencia de algún tipo de interacción entre las células derivadas del trasplante, localizadas preferentemente en las meninges, y los elementos neurales de la CM. Recordemos que en esta capa se extiende el árbol dendrítico de las células de Purkinje, que es la estructura donde se ha observado este efecto deletéreo. Además, la mayoría de las células derivadas del trasplante presentaban una morfología y una expresión de marcadores específicos de células microgliales o macrófagos, por lo que podrían estar mediando también procesos fagocíticos en esta región de la corteza cerebelosa (Kavetsky *et al.*, 2019; Sailor *et al.*, 2022). Aunque sería realmente interesante indagar sobre las causas y mecanismos subyacentes al efecto deletéreo observado, estos estudios no se han considerado como un objetivo de la presente Tesis Doctoral.

De esta forma, en base a los resultados obtenidos, todo parece indicar que los tratamientos combinados con OEA y algún tipo de terapia celular no parecen mostrar una clara mejora en sus propiedades neuroprotectoras respecto al tratamiento farmacológico exclusivo con OEA. Además, teniendo en cuenta su posible aplicación en clínica, hemos demostrado que el tratamiento único con OEA conllevaría menos riesgos y efectos secundarios que los tratamientos combinados en los que puede ser necesario un condicionamiento mieloablativo previo y un mayor número de intervenciones que podrían afectar al bienestar y calidad de vida del paciente.



Conclusiones

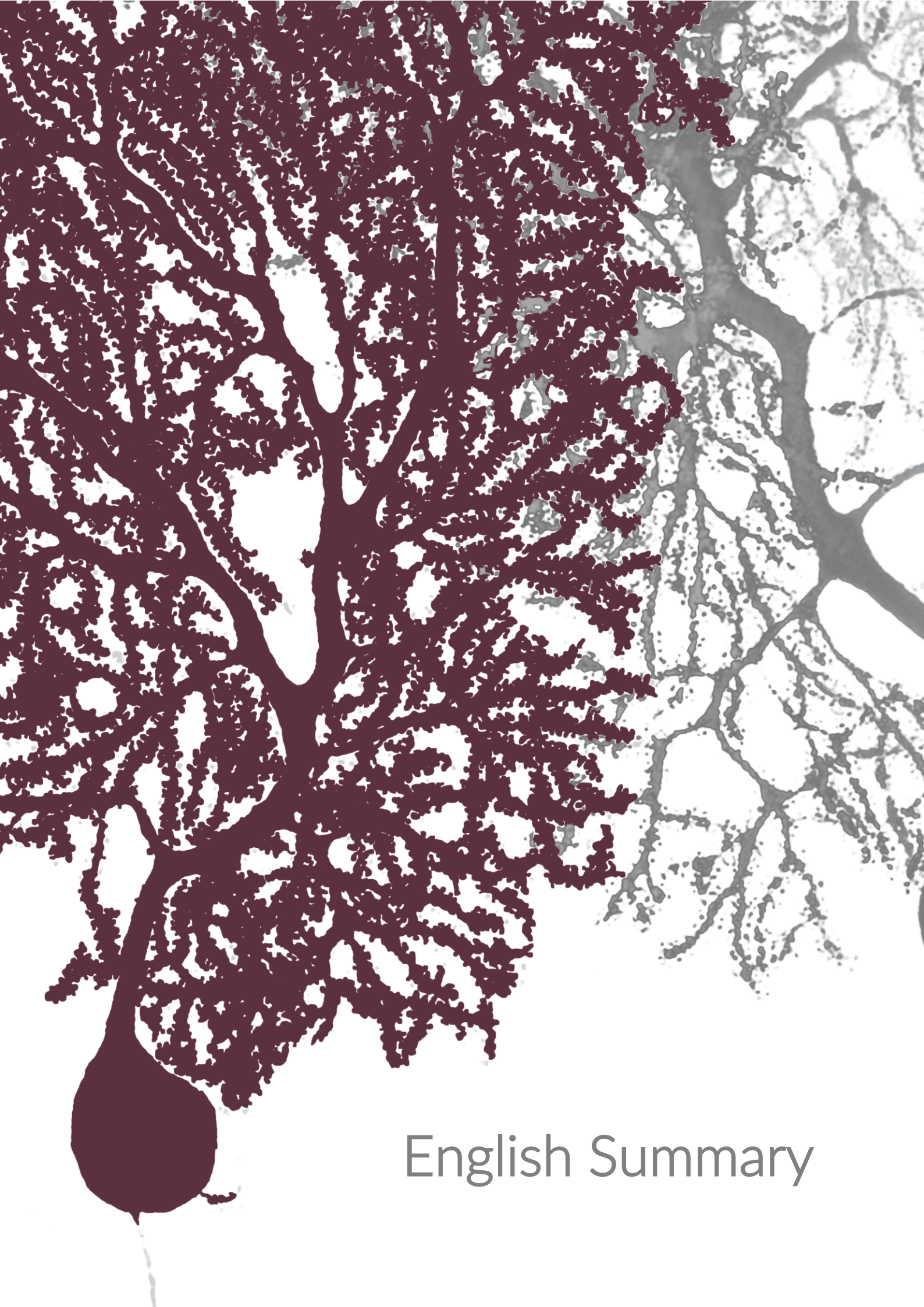
De acuerdo con los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, y en base a los resultados obtenidos y su posterior discusión, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- I. El tratamiento con OEA es más efectivo cuando se administra de forma preventiva y temprana en el ratón PCD. La pauta óptima de 10 mg/kg de OEA por vía i.p. a P12 ejerce un efecto neuroprotector a través de:
 - a. el retraso de la disfunción y muerte de las células de Purkinje,
 - b. la modulación de la neuroinflamación y la microgliosis,
 - c. la reducción de la infiltración de leucocitos periféricos,
 - d. la mejora parcial de las funciones motoras, cognitivas y sociales alteradas en el modelo PCD,
 - e. la acción sobre los receptores PPAR, a nivel histológico y comportamental.

- II. El tratamiento combinado de OEA y el trasplante completo con BMSC es seguro y eficaz en la reconstitución de la médula ósea. Este tratamiento promueve un efecto neuroprotector parcial en el cerebelo del ratón PCD mediante:
 - a. el aumento de la supervivencia de las células de Purkinje y el mantenimiento parcial de su morfología.
 - b. la mejora del comportamiento motor a P30 respecto al tratamiento exclusivo con OEA.

- III. El tratamiento combinado de OEA y trasplante continuo de MSCs ejerce una neuroprotección parcial en el cerebelo del ratón PCD exclusivamente a través de la disminución de la muerte de las células de Purkinje y el mantenimiento parcial de su morfología.

Los tratamientos combinados de OEA junto con la terapia celular evaluados no tienen, en general, un efecto neuroprotector sinérgico en el modelo de degeneración neuronal selectiva PCD. Solo en ocasiones aisladas se encontró una respuesta sumativa y en algunas de las variables analizadas se detectó incluso un efecto antagónico y/o deletéreo.



English Summary

Abbreviations

AGTPBP1	ATP/GTP Biding Protein 1
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMSC	Bone Marrow-derived Stem Cells
b.w.	Body weight
CCP1	CarboxyPeptidase 1
CONDCA	Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy
COX2	Cyclooxygenase 2
DCN	Deep Cerebellar Nuclei
DI	Discriminatory Index
GAP43	Growth-Associated Protein 43
GFP	Green Fluorescent Protein
i.p.	Intraperitoneal injection route
IFN γ	Interferon gamma
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
MAP2	Microtubule-Associated Protein 2
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
NFKB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NNA1	Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy 1
NOR	Nobel Object Recognition test
OEA	Oleoylethanolamide
P	Postnatal
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCD	Purkinje Cell Degeneration
PPAR α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
r.o.	Retroorbital injection route
SI	Sociability Index
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
WT	Wild type

INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases are pathologies of the central or peripheral nervous system that are characterized by the progressive loss of vulnerable neural elements, and that evolve negatively over time causing severe neurological disorders (<https://www.niehs.nih.gov/research/supported/health/neurodegenerative/index.cfm> ; <https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369>). However, their incidence, pathogenesis, clinical manifestations, and prognosis vary over a wide spectrum depending on the specific disease to which we refer (Dugger and Dickson, 2017; Fu *et al.*, 2018).

The scientific community has spent decades devoting great efforts to basic, translational, and clinical research on neurodegenerative diseases with the aim of discovering an effective therapy for these conditions. Indeed, there are currently some palliative treatments that help to relieve some of the associated symptoms (Wang *et al.*, 2020). However, so far, research has not found a way to stop or at least slow down the progression of these disorders. Considering that ageing is the primary risk factor for most of these neurodegenerative diseases (Alzheimer Europe, 2019; Hou *et al.*, 2019) and the increase in life expectancy worldwide, the urge to develop effective treatments is crucial and time-pressing. Precisely, the evaluation of new therapeutic approaches based on pharmacological and cellular therapies is the main objective of this Doctoral Thesis, as detailed later.

Although the etiology of neurodegenerative diseases is widely diverse (Dugger and Dickson, 2017), most of them share the following hallmarks: neuronal dysfunction and loss, behavioral impairments, and neuroinflammation (Schwartz and Baruch, 2014; Stephenson *et al.*, 2018; Guzmán-Martínez *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2021). In this work we employed the Purkinje Cell Degeneration (PCD) mutant mouse as a model of selective neurodegeneration and neuroinflammation (Mullen *et al.*, 1976; Wang and Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2013, 2021; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Bodakuntla *et al.*, 2021; Del Pilar *et al.*, 2021). This animal is characterized by an early-onset cerebellar atrophy caused by a mutation in the *Ccp1/Agtpbp1/Nna1*⁴⁷ gene (MGI/NCBI IDs: 2159437/67269 <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:2159437>) and a consequent lack of the enzymatic activity of CCP1 (Mullen *et al.*, 1976; Harris *et al.*, 2000; Fernández-González *et al.*, 2002; Wang and Morgan, 2007; Rogowski *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2020; Baltanás *et al.*, 2021; Lalonde and Strazielle, 2022). Interestingly, PCD mutant mouse displays similar

⁴⁷ Carboxypeptidase 1, AGT/GTP Biding Protein, Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy

pathophysiological and clinical manifestations of the Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy (CONDCA) observed in humans with a monogenic biallelic mutation in the *CCP1* gene (Shashi *et al.*, 2018; Karakaya *et al.*, 2019; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021). In both humans and mice, the mutation causes the drastic death of Purkinje cells, this neuronal loss taking place in the mouse model from the third week of postnatal development onwards (Mullen *et al.*, 1976; Landis and Mullen, 1978; Wang and Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2013). In particular, the neuronal degeneration starts as an initial predegenerative phase –from postnatal day 15 (P15) to P18– during which nuclear, cytological, and morphological changes in Purkinje cells are observed (Ford *et al.*, 2008; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Then, it progresses to a degenerative stage *per se* –from P18 onwards– in which Purkinje cells rapidly die with only a few ones remaining in lobule X of the cerebellar vermis at P40 (Mullen *et al.*, 1976; Landis and Mullen, 1978; Fernández-González *et al.*, 2002; Valero *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). This neuronal degeneration leads to a severe cerebellar microgliosis and leukocyte recruitment towards the cerebellar parenchyma (Kyhrou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013; Del Pilar *et al.*, 2021), and triggers motor, cognitive and social deficits (Landis and Mullen, 1978; Le Marec and Lalonde, 1997; Machado *et al.*, 2015; Tuma *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Lalonde and Strazielle, 2019; Pérez-Martín *et al.*, 2021).

Considering these features, the PCD mouse has been a very suitable model for exploring potential therapeutic strategies for preventing severe neurodegenerative disorders with direct translational application on human diseases. In this model, most of these experimental therapies assessed aimed at preventing, or at least, decreasing cerebellar neurodegeneration (for review Baltanás *et al.*, 2021). In this sense, previous works in our laboratory have shown promising neuroprotective properties of bone marrow-derived stem cells (BMSC) after a transplantation, and pharmacological treatment with the endocannabinoid oleoylethanolamide (OEA; Díaz *et al.*, 2012a, Díaz *et al.* 2012b, 2018, 2019; Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021).

On the one hand, cells derived from a healthy bone marrow transplantation migrated and reached the degenerating cerebellum of PCD mice, although most of them differentiated into glial cells and low or null fusion with Purkinje cells was observed in transplanted animals (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2018, 2019). Interestingly, animals that received BMSC transplantation showed a partial amelioration of motor performance due to a peripheral effect on skeletal muscle (Díaz *et al.*, 2018). Despite these results, this

approach has certain limitations; particularly that late delivery of BMSC to a cerebellum almost devoid of Purkinje cells is not fast enough to stop neurodegeneration.

On the other hand, preliminary studies with the endocannabinoid OEA reported that its administration exerts neuroprotection in the cerebellum of PCD mice, as previously described in other *in vitro* and *in vivo* models of brain injury such as: cerebral ischemia (Sun *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012, 2017; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019), chemically induced parkinsonism (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; González-Aparicio and Moratalla, 2014; González-Aparicio *et al.*, 2014), neonatal hypoxia (Herrera *et al.*, 2014; Holubiec *et al.*, 2018), stress of different etiology (Kerr *et al.*, 2012; Sayd *et al.*, 2015; Henry *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2018; Rani *et al.*, 2021), and excessive consumption of alcohol (Antón *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Moya *et al.*, 2021). Overall, these studies reported that OEA by binding mainly to PPAR α ⁴⁸ mediates a wide spectrum of neuroprotective effects, namely increasing both the levels of neurotrophic factors (BDNF, MAP2, GAP43, SYN) and neuronal survival, diminishing inflammatory cytokines and mediators (NF κ B, TNF α , IL1 β , IL6), modulating glial activation, and restoring neurobehavioral defects caused by neuronal damage, as summarized in Figure S1. In PCD mice, OEA treatment decreased Purkinje cell death and improved its morphology when administered prior to the predegenerative process, in particular one day before its onset (i.e., at P14; Muñoz-Castañeda, 2015). These promising results encouraged us to optimize the therapeutic time window of OEA and investigate its effects at the molecular, histological, and behavioral levels. These results, as part of this Doctoral Thesis, will be described in the Results section.

Nevertheless, these strategies, as well as most of the current treatments, are based on “one gene, one drug, one disease” philosophy. However, little is known about the synergistic effect of the combination of different therapies and their potential as a neuroprotective treatment to prevent neurodegeneration.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

In this work, the PCD mutant mouse has been employed as a model of selective neuronal degeneration and neuroinflammation for the evaluation of different combined treatments based on two different approaches: pharmacological therapy with OEA and stem cell therapy.

⁴⁸ Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha

Thus, the **hypothesis** of this Doctoral Thesis is “*the combination of pharmacological treatment with OEA and cell therapy exerts a synergistic neuroprotective effect in a model of selective neurodegeneration and neuroinflammation*”.

To test the above hypothesis, the following general and specific **objectives** have been developed:

- I. Analysis of the neuroprotective, anti-inflammatory, and immunomodulatory effects of OEA.
 - a. Optimization of the therapeutic time window of OEA and evaluation of its neuroprotective effect at the histological level at P30 and P40.
 - b. Assessment of the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of the optimal dosage of OEA in the cerebellar gene expression in the short- (~P12), medium- (P20), and long-term (P30).
 - c. Evaluation of the effect of the optimal dosage of OEA on the microgliosis and leukocyte infiltration at P30.
 - d. Analysis of the OEA effect on the cerebellar electrophysiological activity and on the motor, cognitive, and social behaviors throughout the neurodegenerative process.
 - e. Study of the involvement of PPAR α receptors in the observed effects of OEA at histological and behavioral levels at P30.
- II. Analysis of the neuroprotective effect of the combined treatment of OEA and complete BMSC transplantation.
 - a. Evaluation of the safety and feasibility of the combined treatment of OEA and BMSC.
 - b. Analysis of the effect of the combined treatment of OEA and BMSC on motor behavior throughout the neurodegenerative process.
 - c. Study of the arrival of transplanted cells into the cerebellum and quantification of the neuroprotective effect at the histological level at P30 and P40.
- III. Analysis of the neuroprotective effect of the combined treatment of OEA and continuous mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation.
 - a. Evaluation of the feasibility of the combined treatment of OEA and MSCs.

- b. Assessment of the effect of the combined treatment of OEA and MSCs on motor behavior throughout the neurodegenerative process.
- c. Analysis of the arrival of transplanted cells into the cerebellum and quantification of their neuroprotective effect at the histological level at P30.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Mice (*Mus musculus* L. 1758, Muridae, Rodentia, Mammalia) were housed under a 12/12 h light/dark cycle at a constant room temperature and humidity and fed *ad libitum* with water and special rodent chow (Envigo, Indianapolis, IN, US) at the Animal Facilities of both the Universidad de Salamanca (Salamanca, Spain) and Albert Einstein College of Medicine (New York, NY, US). All animal protocols were approved by the Bioethics Committee of the Universidad de Salamanca (reference number #613) and Albert Einstein College of Medicine IACUC⁴⁹ (Protocol #00001090) and were performed in compliance with the guidelines established by European (Directive 2010/63/UE), Spanish (RD118/2021, Law 32/2007) and American (Health Research Extension Act of 1985, Public Law 99-158) legislations.

Wild-type (WT) and mutant *pcd^{1J}* mice on a C57BL/DBA background were obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, US) and employed in this study. As PCD mice are not suitable for breeding (Wang and Morgan, 2007), the colony was kept by mating heterozygous animals and genotyping their offspring as previously described (Valero *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2012a, 2019). In the experiments involving cell transplantation, transgenic green fluorescent protein (GFP) mice on a BALB/C57BL background (Jackson Laboratories) were used as donors of stem cells. Sample size employed in each experiment and groups will be detailed in each corresponding figure caption.

This Doctoral Thesis was organized on three different phases depending on the therapeutic approach evaluated: a) pharmacological treatment with OEA, b) combined treatment of OEA and complete BMSC transplantation, and c) combined treatment of OEA and continuous MSCs transplantation (Figure S2).

⁴⁹ Institutional Animal Care and Use Committee

Pharmacological therapy

Both OEA (CAS: 111-58-0; Sigma-Aldrich, San Luis, MO, US) and the PPAR α antagonist GW6471 (CAS: 880635-03-0; Tocris Bioscience, Bristol, UK) were freshly prepared on the day of administration to avoid drug degradation, as previously described (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; González-Aparicio *et al.*, 2014; Muñoz-Castañeda, 2015). OEA was administered by intraperitoneal injection (i.p.) at a dose of 10 mg/kg body weight (b.w.) in a volume of 10 μ l/g b.w., (Muñoz-Castañeda, 2015). When GW6471 was required, a dose of 2.5 mg/kg b.w. in a volume of 10 μ l/g b.w. was administered i.p. 15 min before OEA treatment. PCD untreated animals were injected i.p. with 0.9 % (w/v) NaCl. All animals were treated at 10 AM and the body weight was monitored throughout the entire experiment because of the anorexigenic effect of OEA (Fu *et al.*, 2003, 2005; Fedele *et al.*, 2018).

Cell therapy

Bone marrow harvesting

For both approaches II and III, BMSC were harvested from femurs, tibias, and ilium of P70-P90 GFP transgenic mice as previously described (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012a, 2015, 2018, 2019). For complete BMSC transplantation (Approach II), isolated BMSC were directly resuspended in a variable volume of phosphate buffered saline (PBS; see Appendix I) depending on the number of counted cells, so that 70 μ l contained 7.5×10^6 cells (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015, 2019). For continuous MSCs administration (Approach III), BMSC was resuspended in 16 ml of complete MSCs medium at 37 °C, consisting of α -MEM (Gibco, Waltham, MA, US), 2 mM L-Glutamine (Gibco), 15 % (v/v) FBS-HI⁵⁰ (Cytiva SV30160.03, Hyclone, Logan, UT, US) and 1 % (v/v) of Penicillin/Streptomycin/Neomycin antibiotic mixture (Gibco), for MSCs differentiation and culture.

Mesenchymal stem cells culture

Isolated BMSC in complete MSCs medium were seeded in vented flasks (75 cm²) and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % (v/v) CO₂. The cells were subjected to fresh medium exchange and passages every 3-4 days until a pure culture of

⁵⁰ Fetal Bovine Serum Heat-Inactivated

MSCs was obtained. They were used for transplantation at passage 4 when adherent cells met the three fundamental criteria proposed by the ISCT⁵¹ to be defined as MSCs (Dominici *et al.*, 2006). Each day of transplantation, MSCs were resuspended in a variable volume of PBS depending on the number of counted cells, so that 50 μ l contained 2.5×10^5 cells (Wang *et al.*, 2018).

Cell transplantation and monitoring

For Approach II (OEA + BMSC combination), bone marrow ablation was performed in recipient animals by irradiation at P19 with a ¹³⁷Cs source suitable for mice (Gammacell 1000 Elite, MDS Nordion, Ottawa, Canada), with a radiation rate of 243 cGy/min and with energy of 0.662 MeV (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015, 2018). The day after this myeloablation (P20), animals received a single dose of 7.5×10^6 BMSC in a 70 μ l volume by intravenous retro-orbital (r.o.) injection (Yardeni *et al.*, 2011).

For Approach III (OEA + MSCs combination), no prior myeloablation was required, so recipient mice received continuous administrations of 2.5×10^5 MSCs in a 50 μ l volume by r.o. injection every 48 hours at P15, P17, P19, P21, P23, P27 and P29.

After transplantation, all animals received special care and daily checks of health conditions to ensure their welfare. To determine the degree of incorporation of cells derived from transplantation in recipient animals, the percentage of GFP positive (+) cells in peripheral blood was analyzed by direct immunofluorescence and flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US).

Behavioral analyses

A battery of tests for behaviors associated with cerebellar function was performed at different timepoints throughout the neurodegenerative process of PCD mice and depending on the approach evaluated: a) P15, P17, P22, P30 and P40, for Approach I; b) P22, P30 and P40, for Approach II; and c) P22 and P30, for Approach III. All tests were performed between 9 AM and 1 PM. For each animal, video recordings were obtained and meticulously analyzed. After each trial, the various apparatuses and objects employed were cleaned with 70 % (v/v) ethanol.

The *rotarod test* (LE8200, Panlab, Barcelona, Spain) was used to assess motor coordination as previously described (Schönfeld *et al.*, 2017; Muñoz-Castañeda *et al.*,

⁵¹ International Society for Cell and Gene Therapy

2018). Briefly, the rod accelerated at a rate of 0.06 rpm/s from 4 to 40 rpm for 10 min (rod diameter: 30 mm; distance from surface: 25 cm). The latency to fall off was measured as the mean of seven trials with 20 min-resting intervals for each mouse and day of the task.

Home-cage behavior analysis was used to characterize general behavior (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). After 10 min of habituation, grooming time (innate stereotyped behavior), rearing time (environmental exploratory behavior), time spent moving (general movement), time in activity and resting time were analyzed. Each animal was assigned to an individual home cage to avoid the influence of odor emitted from the other animals.

The novel object recognition (NOR) test was performed to evaluate long-term object recognition memory (Ennaceur and Delacour, 1988; Ennaceur, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). The first test day (P15), two identical objects placed in opposite corners of a cage were presented to a single animal for 10 min. Then, in each of the following sessions (at P17, P22, P30 and P40), the animals were returned to the cage, which contained the familiar object and a novel one. The percentage of time exploring the novel and familiar objects, and the discriminatory index (DI) were calculated (Pérez-Martín *et al.*, 2021).

The three-chambered social preference test was performed to assess sociability in a white Plexiglas box (50 x 29 cm) divided into three connected chambers (29 x 16.67 cm each; (Moy *et al.*, 2004; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). After 10 min of habituation, each mouse was placed in the middle chamber of the box, while the lateral rooms contained either a mouse of the same age and sex or an object, both covered by a similar drilled pencil cup. The percentage of time spent interacting with the animal or the object, and the sociability index (SI) were calculated (Pérez-Martín *et al.*, 2021).

Electrophysiological analyses

All surgical procedures were performed under isoflurane anesthesia (Covetrus, Portland, ME, US) at 5 or 1.5-2 % (v/v) for induction and maintenance, respectively, and oxygen 1.5 % (v/v). A 3D-printed “L”-shaped bracket made of polylactic acid was fixed onto the skull with Optibond (Kerr Dental, Brea, CA, US) and Charisma composite (Kulzer, Tokyo, Japan) one day before electrophysiological recordings. A recording chamber of 5 mm in diameter was molded on the posterior skull above the cerebellum and surrounded with dental cement (M&S Dental Supply, Jamaica, NY, US). Stereotaxic coordinates for deep cerebellar nuclei (DCN) recordings were adjusted for young animals (<15 g of body weight) by referring the real Bregma to Lambda distance to the same measure gathered

from the Paxinos and Franklin atlas (Figure S3; Franklin and Paxinos, 2008). New calculated DCN coordinate's locations were confirmed using Alexa Fluor 555 CTB conjugate (Waltham, MA, US) injections (see Results). Craniotomies of 2 mm in diameter were drilled and covered with low toxicity silicone adhesive Kwik-Sil (World Precision Instruments, Sarasota, FL, US) until the day of the experiment. Following surgery, 0.9 % (w/v) NaCl and Flunixin Flunazine 0.25 mg/kg (Bimeda, Oakbrook Terrace, IL, US) were administered by subcutaneous route and allowed to recover before habituation to the stereotaxic frame.

To analyze neural activity, extracellular single-unit activity was recorded in awake head-fixed mice by advancing a tungsten electrode (2-3 M Ω , Thomas Recording GmbH, Giessen, Germany) into the cerebellum until Purkinje Cell layers or DCN were reached. Purkinje cells and DCN were identified by location, presence of complex spikes, and characteristic firing rate (Hoebeek *et al.*, 2008; Tara *et al.*, 2018; Snell *et al.*, 2022). Neural signals were filtered (200 Hz-20 kHz) and amplified (2000x) using a custom-built amplifier, and then, digitized (20 kHz) using a data acquisition card Purkinje Cell-MIO-16-XE and a custom written software in Labview (National Instruments, Austin, TX, US). Waveforms were sorted by amplitude, energy, and principal component analysis using Offline Sorter software (Plexon, Dallas, TX, US). Neural activity was evaluated through three parameters: a) mean firing frequency, b) predominant firing frequency, and c) inter-spike interval coefficient of variation (ISI CV). These experiments were conducted during a research stay in the Khodakhah's Lab at Albert Einstein College of Medicine (New York, NY, US) from September to December 2021.

Histological analyses

Tissue extraction and processing

At P30 or P40 (depending on the experiment), animals were deeply anesthetized with 10 μ l/g b.w. chloral hydrate (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) and perfused intracardially with 0.9 % (w/v) NaCl and 100 μ l of 1000 U/ml heparin for 1 min, followed by modified Somogyi's fixative solution (see Appendix I) for 15 min. Brains were dissected out, washed with phosphate buffer (PB) and cryoprotected with 30 % (w/v) sucrose in PB overnight at 4 $^{\circ}$ C. Cerebella were cut into 30 μ m-thick sagittal sections, by using a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Wetzlar, Germany) and stored in a cryoprotective solution at -20 $^{\circ}$ C until they were used for immunostaining.

For immunofluorescence and histological analyses, four equidistant parasagittal sections of the cerebellar vermis (distance: 180 μm) were assessed for each mouse. The antibodies employed in this work are listed in Table S1.

TABLE S1 | List of primary and secondary antibodies used in the indirect immunofluorescence technique

Primary antibody	Species	Company	Dilution	Secondary antibody*
Calbindin	Mouse	Swant	1:2000	Mouse Anti-IgG Cy3 o Cy2
CD16/32	Rat	BD	1:200	Rat Anti-IgG Cy3
CD206	Goat	R&D Systems	1:200	Goat Anti-IgG Cy2
CD45	Rat	Bio-Rad Laboratories	1:1000	Rat Anti-IgG Cy2
GFP	Goat	Abcam	1:2000	Goat Anti-IgG Cy2
Iba1	Rabbit	Wako Pure Chemical Industries	1:1000	Rabbit Anti-IgG Cy3

*All secondary antibodies were produced in donkey and used at a dilution of 1:500

Microscopy visualization and quantifications

Immunostained cerebellar vermis sections were visualized under an epifluorescence microscope Olympus Provis AX70 equipped with an Olympus DP70 digital camera (12.5 MP, Olympus, Tokyo, Japan). For analysis and processing images the following software were employed: Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe World, San José, CA, US), ImageJ (NIH, Bethesda, MD, US) or Neurolucida (MBF Bioscience, Williston, VT, US; see Appendix I).

Overall, cell quantifications were carried out considering the entire cerebellar vermis (lobules I to X), except for microglial and leukocyte analyses where different regions of interest were chosen, based on previous studies reporting that microgliosis and neuroinflammation of PCD mice is not homogenous throughout all the lobules and layers of the cerebellum (Baltanás *et al.*, 2013; Del Pilar *et al.*, 2021). Although all the results obtained in this Doctoral Thesis will be shown in the figures section, only the most remarkable findings will be detailed in the body text of this summary.

Molecular analyses

RNA was isolated from left hemiserebellum using the column based PureLinkTM RNA Mini Kit (Invitrogen) and PureLinkTM DNase Set (Invitrogen). 1000 ng of RNA was converted into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, Foster City, CA, US). qPCR⁵² was carried out using PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), and the specific pairs of primers of the following

⁵² Quantitative Polymerase Chain Reaction

inflammatory and neurotrophic/neuroprotective genes: brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*), cyclooxygenase 2 (*Cox2*), growth-associated protein 43 (*Gap43*), interferon gamma (*Ifn γ*), interleukin 1 beta and 6 (*Il1 β* , *Il6*), inducible nitric oxide synthase (*iNos*), microtubule-associated protein 2 (*Map2*), nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (*Nf κ B*), and tumor necrosis factor alpha (*Tnfa*). *Ppara* gene expression was also analyzed, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) was used as a housekeeping gene. Sequence details, efficiency, and specificity of primers are available in Appendix II.

Statistical analyses

Homoscedasticity and normality were checked prior to all the statistical analyses by performing Kolmogorov–Smirnov’s and Levene’s tests. Each statistical test and the variables compared are provided in each corresponding result section and figure caption, and the specific *p*-values are detailed in Appendix III (a *p*-value < 0.05 was set up as the minimum level of statistical significance). All analyses and graphical representations were performed using SPSS software version 26 for Windows (IBM, Armonk, NY, US) and GraphPad Prism software version 9.0.2 for Windows (GraphPad, San Diego, CA, US), respectively.

RESULTS

Approach I. Pharmacological treatment with OEA

Neuroprotective effect of OEA on Purkinje cell morphology and density

A previous work in our laboratory demonstrated that OEA administration (10 mg/kg, i.p.) at P14, P16 or from P7 to P21 increased Purkinje cell survival and partially prevented their morphological alterations in PCD mice, with the acute administration at P14 being the most effective treatment (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). These promising results encouraged us to go a step further and optimize the time window in which OEA showed a higher therapeutic effect. To this end, we compared the effect of acute administration of OEA (10 mg/kg, i.p.) at three different timepoints P14, P12 and P10 (i.e., one, three and five days before the onset of predegeneration) on Purkinje cell morphology and density by one-way ANOVA followed by Bonferroni’s *post hoc* test (Figure S4, *p*-values in Appendix III, 1). The results of this analysis showed that acute administration at these three timepoints prevented morphological alterations and

increased Purkinje cell survival at P30 (Figure S4 j-n; Appendix III, 1). Furthermore, this neuroprotective effect followed an inverted U-shaped time-response curve, with the acute administration at P12 being the most effective schedule for preventing Purkinje cell morphological alterations and death, as the morphological parameters reached values similar to those of WT animals (Figure S4 j-n; Appendix III, 1). Interestingly, OEA administration at P10 had no effect on Purkinje cell density (Figure S4 n). Moreover, the number of Purkinje cells in these animals treated at P10 seemed to be even lower than that in untreated PCD mice, probably due to the deleterious effects of OEA at very early stages (Figure S4 n).

Next, we decided to determine whether this neuroprotective effect of OEA administered at P12 was maintained over time at P40 (Figure S5; *p*-values in Appendix III, 2). However, two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed that the values of only two of the parameters analyzed (soma area and main dendrite length) were maintained in treated mice at this age (Figure S5 d, f; Appendix III, 2).

Due to the anorexigenic side effect of OEA (Fu *et al.*, 2003, 2005; Fedele *et al.*, 2018), the body weight of the animals was monitored (Figure S6). Results from one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a decrease in the body weight of all the PCD experimental groups at P30 and P40 compared to WT ones. By contrast, no differences were found between PCD mice that received OEA and the untreated ones (Figure S6; *p*-values in Appendix III, 3).

Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of OEA

Some authors have reported that OEA and other PPAR α ligands exert an anti-inflammatory effect on different models of neuroinflammation and brain injury (Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; Kerr *et al.*, 2012; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Rani *et al.*, 2021). Thus, once the optimal dosage of OEA was determined, we evaluated the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of OEA in PCD mice.

First, we analyzed changes in the gene expression of different proinflammatory markers (*Cox2*, *Ifn γ* , *Il1 β* , *Il6*, *iNos*, *Nf κ b* and *Tnfa*) and neurotrophic/neuroprotective factors (*Bdnf*, *Gap43*, *Map2*) in the cerebellum, in the short- (~P12), medium- (P20), and long-term (P20) after OEA treatment. For all the molecular analyses, non-parametric Kruskal-Wallis'

test was carried out for multiple comparisons (Kolmogorov-Smirnov's and Levene's test p -values were < 0.05).

In the short-term, OEA effects on mRNA levels were evaluated in an unharmed organism (i.e., WT) 3- and 24-hours post-OEA treatment (Figure S7 a, b). In general, mRNA expression of inflammatory markers *Ifny*, *Il1 β* , and *Tnfa* decreased at 3- and/or 24-hours after OEA administration. Conversely, the mRNA level of *Il6* increased 3h after OEA administration but decreased to basal levels (untreated WT) 24h later (Figure S7 a, b; p -values in Appendix III, 5). By contrast, gene expression of the neuroprotective factors *Bdnf*, *Gap43* and *Map2*, and the *Ppara* receptor increased at both 3- and 24-hours after OEA treatment (Figure S7 a, b; Appendix III, 5). These results in WT animals indicate an anti-inflammatory and neuroprotective effect of OEA even in a non-pathological state.

Concerning the medium-term analysis at P20 -when the neurodegeneration of PCD mice has just begun- differences among WT, untreated PCD and OEA-treated PCD animals were detected in the gene expression of both inflammatory and neuroprotective factors, and in *Ppara* receptor (Figure S7 c, d; p -values in Appendix III, 6). First, we found a striking increase in *Tnfa* expression in PCD animals compared to WT ones, whereas the mRNA quantity of the rest of the proinflammatory factors remained unaltered or even decreased, as observed in *iNos* expression (Figure S7 c, d; Appendix III, 6). Moreover, at this timepoint a decrease in mRNA levels of *Gap43* and *Ppara* was also detected in PCD mice compared to WT (Figure S7 c, d; Appendix III, 6). Interestingly, OEA administration increased mRNA levels of half of the factors analyzed at P20 compared to baseline: *Cox2*, *Ifny*, *Il1 β* , *Il6* and *Tnfa* (Figure S7 c, d; Appendix III, 6). Furthermore, OEA-treated PCD mice showed a higher gene expression level of some neuroprotective factors such as *Bdnf*, *Gap43* and *Map2* compared to untreated PCD mice, also showing similar levels of WT animals (Figure S7 c, d; Appendix III, 6).

Regarding the long-term analysis at P30, when Purkinje cell degeneration is at its peak, differences in mRNA levels among WT, untreated PCD and OEA-treated PCD were also detected for both inflammatory and neuroprotective factors, and in *Ppara* receptor expression (Figure S7 e, f; p -values in Appendix III, 7). First, untreated PCD mice showed an increase in the mRNA levels of the following proinflammatory factors: *Ifny*, *Il1 β* , *Il6* and *Tnfa*, but a decrease in the neurotrophic *Bdnf* and *Ppara* compared to those of WT (Figure S7 e, f; Appendix III, 7). Thus, these results indicated an increase in the neuroinflammatory state at this timepoint in the PCD mutant mouse, which is consistent with the neurodegenerative process occurring at the same time. Nevertheless, after OEA

administration, mRNA levels of the proinflammatory markers decreased either to those observed in WT ones for *Ifn γ* , *Il1 β* and *Il6* (Figure S7 e, f), or to an intermediate level between WT and untreated PCD for *Tnfa* (Figure S7 e, f; Appendix III, 7). By contrast, *Bdnf*, *Map2* and *Ppara* mRNA levels increased in OEA-treated PCD mice compared to those of untreated PCD, reaching WT levels or higher (Figure S7 e, f; Appendix III, 7).

All these results in the medium- and long-term indicate that OEA would exert a dual effect over time in PCD cerebellum. At the onset of the cerebellar degeneration, it increases the gene expression of almost all evaluated genes, whereas in the long-term it modulates the cerebellar neuroinflammation by decreasing the gene expression of proinflammatory markers and increasing that of neuroprotective/neurotrophic factors.

In parallel to gene analyses, we evaluated by immunofluorescence changes on the density, distribution, and marker-based phenotype of microglial cells at P30, when Purkinje cell degeneration is at its peak, since previous authors have reported an exacerbated microgliosis in the cerebellum of PCD mice (Baltanás *et al.*, 2013). Although a thorough analysis by cerebellar lobules and layers was performed (Figures S8-S10), only general results will be described below. In these analyses, either one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test or Student's *t*-test were employed when appropriate.

Regarding microglial density, an increase in the number of Iba1+ cells per mm² was found in the entire cerebellar vermis of untreated PCD mice at P30 compared to the WT one (Figure S8 b), which was partially prevented when PCD animals were treated with OEA, showing values closer to those of WT mice (Figure S8 b; *p*-values in Appendix III, 8). Similar results were observed when analyzing microglial density by lobules and layers, indicating that OEA decreases microgliosis although it does not change its distribution (Figures S8 c, d and S9; *p*-values in Appendix III, 9 and 10).

In order to evaluate microglial phenotype, we analyzed three of the most common microglial markers inside the Iba1+ cell population: CD45^{low} (reactive microglia marker), CD16/32 (proinflammatory marker) and CD206 (anti-inflammatory/tissue repair marker), in the cerebellar vermis at P30 (Figure S10; Mecha *et al.*, 2016). Overall, WT noticeably showed a lower percentage of all the microglial populations compared to that of both standard and OEA-treated PCD groups (Figure S10 a). Moreover, when comparing PCD groups, an increase in the percentage of the microglial population presenting the anti-inflammatory CD206 marker could be noticed in treated animals, whereas CD45 and CD16/32 markers seemed to be not affected by OEA treatment (Figure S10 a). Similar

results were obtained when these analyses were carried out thoroughly per lobules or layers of the cerebellum (Figure S10 b-p; *p*-values in Appendix III, 11-13).

Finally, since a recent work has reported an increase in the leukocyte recruitment in PCD mice due to cerebellar degeneration (Del Pilar *et al.*, 2021), we explored whether the OEA treatment modifies leukocyte infiltration towards cerebellar parenchyma. Quantitative analysis showed an increase in total leukocyte density in untreated PCD mice compared to WT animals (Figure S11 b), which is fully prevented in OEA-treated mutants (Figure S11 b; *p*-values in Appendix III, 14).

OEA effect on cerebellar electrophysiology and functions

Once the neuroprotective properties of OEA were demonstrated at molecular and histological levels, we wondered whether these effects could be translated into an improvement in the cerebellar physiology and functions in PCD mice.

First, we evaluated the effect of OEA administration on the electrophysiological activity of Purkinje cells and DCN in awake head-fixed mice. Due to the reduced sample size per experimental group, no statistical analyses were carried out on these data, and only a brief overview of them will be described. As detailed in Material and Methods section, new adjusted stereotaxic coordinates for young animals (<15 g of body weight) were established as shown in Figure S12 a-e. Regarding electrophysiological activity, no noticeable differences were found *a priori* in any of the parameters analyzed, neither in Purkinje cells nor in DCN, the values being similar in the three experimental groups (Figure S12 f-n). These results were obtained at both P25 and P30 (Figure S12 f-n). Although these results cannot be used to draw conclusions in this work, the adjustment of the technique and surgeries is itself a first step towards the study of cerebellar physiology in this model.

Secondly, we analyzed the effect of OEA on the motor, cognitive, and social behavior of PCD mice throughout the entire neurodegenerative process (at P15, P17, P22, P30 and P40; Figures S13-S15).

Regarding motor behavior, graphic representation of the rotarod test data showed that the general motor performance of the three experimental groups diverged over time, with the most significant differences being between WT and PCD mice (Figure S13 a-b; *p*-values in Appendix III, 15). The performance of WT mice in the rotarod test gradually improved until P30 and then stabilized, probably due to learning (Figure S13 b; Appendix

III, 15). However, treated PCD mice showed similar behavior as WT mice did until P22, but then gradually exhibited a motor performance that was more similar to that of untreated PCD animals (Figure S13 b; Appendix III, 15). Unfortunately, this amelioration was not detected at P40 when motor behavior of both OEA-treated and untreated PCD mice were similar, and no differences were detected between these two experimental groups (Figure S13 b; Appendix III, 15). These finding indicates that although OEA treatment did not completely restore the normal motor coordination of PCD mice, it contributed to improving it since the motor behavior of treated mice was midway between that of WT and untreated PCD animals at P22 and P30.

Related to general behavior, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test revealed that the three experimental groups showed similar results with respect to grooming time, exploratory behavior, and displacement at P15 and P17 (Figure S13 d, e; *p*-values in Appendix III, 16). Conversely, from P22 onwards, these three variables were different between WT and PCD animals (Figure S13 f-h; Appendix III, 16). At P22 and P30, these general behaviors were increased in treated PCD mice compared to those of the untreated PCD animals, being more similar to the values of the WT mice. However, this effect was not maintained at P40, when no differences were detected between the groups of PCD mice (Figure S13 h; Appendix III, 16).

Related to recognition memory, we compared the percentage of time spent exploring the novel and familiar objects in NOR test in each experimental group and age, by using the Student's *t*-test (Figure S14). Our results showed that WT mice spent a higher percentage of time exploring the novel object than the familiar one at all analyzed ages (Figure S14 b-e; *p*-values in Appendix III, 17). PCD mice showed the same behavior at P17 and P22, but not at P30 and P40, when no differences were detected in the exploration time of each object. By contrast, treated PCD mice spent a higher percentage of time exploring the new object than the familiar one until P30, indicating that OEA administration preserved long-term recognition memory (Figure S14 b-d; Appendix III, 17). However, at P40, no differences were detected in this group, which is consistent with the histological results and the outcome of the previous behavioral tests (Figure S14 e; Appendix III, 17). Similar results were obtained when DI was analyzed (Figure S14 f; Appendix III, 17).

Finally, social behavior was assessed by the three-chambered social preference test and the percentage of time interacting with a hidden animal or object was compared in each experimental and age group using the Student's *t*-test. Results showed a preference

for social contact in WT animals at all ages (Figure S15 b-f; *p*-values in Appendix III, 18), while a nonsocial preference from P17 onwards was found in PCD mice, spending the same percentage of time exploring any of the two compartments, either containing the mouse or the object (Figure S15 b-f; Appendix III, 18). By contrast, OEA-treated PCD mice spent a larger percentage of time exploring the chamber containing the mouse than the chamber containing the object until P30, indicating a recovery of normal social behavior up to this age (Figure S15 b-e; Appendix III, 18). Unfortunately, once more this effect was not observed at P40, when treated PCD and untreated PCD mice spent the same percentage of time exploring both compartments (Figure S15 f; Appendix III, 18). Similar results were obtained when SI was evaluated (Figure S15 g; Appendix III, 18).

Role of PPAR α receptors in the effects exerted by OEA in PCD mice

To test whether the endocannabinoid PPAR α receptor mediates the neuroprotective effects of OEA observed in PCD mice at both the histological and behavioral levels, the PPAR α antagonist GW6471 (2.5 mg/kg b.w., i.p.) was injected into an additional group of mice 15 min before OEA treatment (10 mg/kg b.w., i.p.). Histological and behavioral experiments were performed as described in previous experiments. The results of these analyses at P30 (Figure S16; *p*-values in Appendix III, 19 and 20) showed that the administration of the PPAR α antagonist fully blocked the neuroprotective effect of OEA on all the parameters analyzed (Figure S16; Appendix III, 19). These results indicate that PPAR α is the main receptor involved in the actions of OEA in PCD mice.

Approach II. Combined treatment of OEA and BMSC transplantation

Safety and viability of the combined treatment

All animals that received the combined treatment of OEA and BMSC transplantation survived in the animal facilities. Only some casualties were detected, and they were attributed to natural death. As shown in Figure S17, even ten days after transplantation (P30) the percentage of GFP+ blood cells was around 40 % of the total and it progressively increased up to almost 60 % at P40. However, after one-way ANOVA no statistical differences were found among ages (Figure S17 b; *p*-values in Appendix III, 21). These results agree with previous ones in which the same transplantation technique was employed in PCD mice (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2019) and demonstrate that

the combined treatment of OEA and BMSC is safe and effective concerning bone marrow reconstitution after ablation.

Effect of OEA and BMSC on motor behavior

Motor behavior was evaluated as previously described in Approach I. Here, four experimental groups were compared: WT, untreated PCD, PCD administered with OEA and PCD treated with OEA and BMSC. Two-way repeated measures ANOVA revealed that general motor performance of the four experimental groups diverged over time, with the most significant differences focusing between WT and PCD mice, as reported in Approach I (Figure S17 c-e; *p*-values in Appendix III, 22). Moreover, all treated PCD animals showed a partial improvement in motor behavior, regardless of the treatment (Figure S17 d; Appendix III, 22). Due to the great divergence in the motor performance of PCD and WT groups, the latter was excluded to exhaustively analyze possible differences due to treatment by performing one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* tests (Figure S17 e; Appendix III, 22). At P30, significant differences were detected among experimental groups, PCD animals that received the combined treatment of OEA and BMSC showing even greater improvement in motor performance than that observed in those animals treated exclusively with OEA (Figure S17 e; Appendix III, 22). At P22 and P40, no differences between treatments were observed (Figure S17 e; Appendix III, 22).

Arrival of transplanted cells into the cerebellum and analysis of their effect on Purkinje cell morphology and density

The analysis of the arrival of transplant-derived cells into the cerebellum of recipient animals was performed at P30 and P40 (Figure S18). At both ages, GFP+ cells were found in all the lobules and layers of the cerebellum, although preferentially located in the regions near the meninges (Figure S18 a, b). Moreover, according to their morphology, three different types of cells derived from transplant were observed: branched cells like microglia or macrophages (Figure S18 b-e), and round or rod leukocyte-like cells (Figure S18 f, g).

In addition, a double immunofluorescence against GFP and Iba1 revealed that most of cells derived from transplant were indeed microglia or macrophages both at P30 and P40 (Figure S18 h, i). However, no fusion between BMSC and Purkinje cells were found, regardless of the analyzed age (Figure S18, h-i).

Finally, we analyzed whether the partial improvement in motor behavior observed in treated PCD mice with OEA and BMSC was due to an effect at the histological level. We compared this analysis with the results obtained in Approach I, so that changes in the morphology and density of Purkinje cells were evaluated at P30 and P40 (Figure S19 d-h, S20; *p*-values in Appendix III, 23-25). Overall, no noticeable differences were observed between treatments at any of the analyzed ages, both showing a similar neuroprotective effect in the variables soma area, main dendrite width and density (Figure S19, S20; Appendix III, 23-25). Unexpectedly, a null or deleterious effect was observed in the main dendrite length and dendritic arbor length, respectively, in those animals that were treated with OEA and BMSC (Figure S19 e; Appendix III, 23-35). Moreover, this combined therapeutic approach induced a reduction in the body weight of the PCD animals at P30 and P40 respect OEA-treated and untreated PCD mice (Figure S20 g, h; *p*-values in Appendix III, 26). One of the possible causes of this weight reduction could be due to body irradiation, as it has been previously documented in both humans and mice (Koch *et al.*, 2016).

Approach III. Combined treatment of OEA and continuous MSCs transplantation

MSCs are a specific population of adult bone marrow cells, which stand out by their neurotrophic, neuroprotective, and immunomodulatory paracrine properties, and by their high ability to migrate and reach damage tissue (Uccelli *et al.*, 2008, 2011; Chen *et al.*, 2018). These features, together with their low immunogenicity, make them excellent candidates for cell therapy (Uccelli *et al.*, 2008, 2011; Ankrum *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018; Yao *et al.*, 2020; Andrzejewska *et al.*, 2021). In this sense, we wondered whether the combination of MSCs and OEA without prior myeloablative conditioning exerted a greater neuroprotective effect without the deleterious effects detected in Approach II.

Analysis of MSCs in peripheral blood

We first analyzed the percentage of GFP⁺ cells in the peripheral blood of treated mice at P30 as a proof of the presence of the transplanted MSCs in these animals. The mean value obtained was 0.43 ± 0.08 %. Although this result was much lower than those obtained with complete BMSC transplantation, it indicates that transplanted MSCs can escape from the immune system and travel away in the circulatory system of recipient mice.

Effect of OEA and MSCs on motor behavior

Repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test revealed differences in the motor performance of WT animals and all the PCD groups, but not among the latter, regardless of the treatment (Figure S21 a-c; *p*-values in Appendix III, 27).

As in Approach II, due to the great divergence of motor behavior between PCD and WT animals, the latter were excluded, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for each analyzed age was carried out (Figure S21 c; Appendix III, 27). At P22, animals that received OEA and MSCs showed similar results as untreated PCD mice and worse than those of treated exclusively with OEA or with the combination of OEA and BMSC (Figure S21 c; Appendix III, 27). Interestingly, no improvement in motor behavior was observed in PCD mice treated with OEA and MSCs unlike the other treated mutants (both with OEA or with OEA and BMSC), being the comparisons among treatments similar to those described at P22 (Figure S21 c; Appendix III, 27).

Arrival of MSCs into the cerebellum and analysis of their effect on Purkinje cell morphology and density

Although no noticeable improvement in motor performance was found in PCD animals that received the combined treatment of OEA and MSCs, histological analyses of the cerebellum at P30 were performed to evaluate the possible arrival of MSCs and/or a putative neuroprotective effect on Purkinje cells.

First, a very low density of transplant derived MSCs cells were observed in the cerebellar parenchyma of treated mutants, and only cells with a round morphology were detected as shown in Figure S21 d, e. Interestingly, these GFP+ cells colocalized with the Cb28k+ soma of Purkinje cells (Figure S21 d, e), suggesting a possible fusion phenomenon. However, these Purkinje cells had an aberrant morphology and a damaged dendritic tree, as previously described in similar studies in which daily BMSC were administered in PCD mice (Díaz *et al.*, 2019).

Regarding the effect of the combined treatment of OEA and MSCs on Purkinje cell morphology and density, one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed similar results to those obtained in Approach II (Figure S22; *p*-values in Appendix III, 28). Overall, no noticeable differences were observed between treatments, showing all of them similar neuroprotective effect in the variables soma area, main dendrite width and density,

as reported in Approach II analysis (Figure S22 d, g, h; Appendix III, 28). In addition, a null or deleterious effect was observed again in the main dendrite length and dendritic arbor length in animals treated with OEA and MSC, as well as it was found in those PCD mice that were treated with OEA and BMSC (Figure S22 e, f; Appendix III, 28). By contrast, the combined treatment of OEA and MSC without myeloablation did not modify the body weight of treated PCD animals, with similar values to those of untreated and OEA-treated mice (Figure S22 i; *p*-values in Appendix III, 29). This result supports that the weight reduction observed in Approach II would be due to myeloablative irradiation instead of a deleterious side effect of the combined pharmacological and cell treatments *per se*.

Considering these results, neither the combined treatment of OEA and complete BMSC transplantation nor OEA and continuous MSCs administration showed a synergic/greater neuroprotective effect compared to the exclusive treatment with OEA as summarized in Table S2.

TABLE S2 | Comparison of the therapeutic effects of the three approaches evaluated in this Doctoral Thesis.

	Therapeutic effects of OEA treatment	OEA + BMSC	OEA + MSCs
Purkinje cell morphology and density	Soma area at P30	=	=
	Dendritic arbor length at P30	▼	▼
	Main dendrite length at P30	▼	▼
	Main dendrite width at P30	=	=
	Purkinje cell density at P30	=	=
	Soma area at P40	=	NA*
	Main dendrite length at P40	▼	NA
Motor behavior	Motor performance at P22	=	▼
	Motor performance at P30	▲	=
	Motor performance at P40	=	NA
Body Weight	Body weight at P30	▼▼	=
	Body weight at P40	▼▼	NA

Note: The first column lists the effects of OEA treatment which are comparable with those of the combined treatments. In the second column, the comparisons between each of the combined treatments of OEA and stem cell therapy and exclusive OEA are represented as: =, no differences found; ▲, synergistic effect; ▼, deleterious effect (same as untreated PCD); ▼▼, very deleterious (worse than untreated PCD). NA, not analyzed.

DISCUSSION

The development of effective preventive or protective therapies for neurodegenerative diseases have long been a major focus in basic, translational, and clinical research for decades. However, current treatments based on “one gene, one drug, one disease” philosophy have shown limitations in preventing the progression of these conditions. In this work, we have evaluated the neuroprotective properties of combined therapeutical strategies based on two different approaches in the PCD mutant mouse: the pharmacological treatment with OEA and stem cell therapy. First, we demonstrated the efficacy of OEA treatment in delaying neurodegeneration and restoring the behavioral functions impaired in this model. Secondly, we showed that the combined treatments of OEA and stem cells do not offer a summative neuroprotective effect, either at a histological or behavioral level, compared to that observed after the sole OEA treatment. As a result of these experiments, interesting findings were also obtained on the PCD model, however, in this summary we will focus only on the discussion of those related to the evaluated treatments.

OEA delays Purkinje cell dysfunction and death

The endocannabinoid OEA, as a PPAR α agonist, has been reported to exert neuroprotection in different models of brain injury (Sun *et al.*, 2007; Galán-Rodríguez *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012, 2017; Kerr *et al.*, 2012; González-Aparicio and Moratalla, 2014; González-Aparicio *et al.*, 2014; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2016; Henry *et al.*, 2017; Antón *et al.*, 2018; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2019; Moya *et al.*, 2021; Rani *et al.*, 2021). Indeed, its neuroprotective properties in PCD mice –when administered prior to the predegenerative stage– had already been described in our laboratory (Muñoz-Castañeda, 2015). However, the optimal therapeutic time window was not yet completely defined. Therefore, the first objective of this work was to optimize OEA treatment by evaluating different time point administrations of the drug (10 mg/kg) before the onset of the predegeneration (i.e., P14, P12 and P10).

On the one hand, all the evaluated regimens prevented the morphological defects of Purkinje cells and decreased neuronal loss, showing that the effect of OEA in the PCD mouse is preventive (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Moreover, this effect followed an inverted U-shaped time-response curve, with the acute administration

at P12 being the most effective treatment for all the variables evaluated, but especially for those related with the maintenance of dendritic arborization. Although predegeneration is considered to start at P15 (Wang and Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2013), this result may suggest that some molecular alterations not yet described could be taking place in the cerebellum at this timepoint. In this sense, a previous work reported changes on the expression of genes related to apoptosis and neuronal migration before P15 in *pcd^{3J}* mutant mice (Ford *et al.*, 2008). In any case, the underlying mechanisms of the therapeutic window are outside the scope of this Doctoral Thesis.

Then, we evaluated the duration of this neuroprotection on Purkinje cell morphology and density in the long-term. However, at P40 only a partial effect of OEA was observed in two of the morphological variables analyzed. To the best of our knowledge, our study reports for the first time the temporary and limited effect of OEA. It should be noted that most of the previous studies employed continuous administrations of OEA and their corresponding analyses were carried out in the hours or after a few days following the last administration (Plaza-Zabala *et al.*, 2010; González-Aparicio and Moratalla, 2014; Yang *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2018; Rani *et al.*, 2021).

Although the mechanisms by which OEA delays morphological alterations and death of Purkinje cells in PCD mice is not yet known, it could be related to the maintenance of the cytoarchitecture through a direct or indirect effect on microtubules dynamics and stability (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). As summarized in Figure S1, we know that OEA administration increases the gene expression of proteins related to dendritic differentiation (GAP43 and SYN), microtubule-binding proteins (MAP2) and neurotrophic factors (BDFN), as described in previous works and in this Doctoral Thesis (Bento-Abreu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019). In addition, OEA as a PPAR α ligand could also be regulating the expression of neuronal plasticity and survival factors through CREB (Sakamoto *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2013; Amidfar *et al.*, 2020), and attenuating apoptosis through NF κ B pathway (Zhou *et al.*, 2017). Furthermore, the neuroprotection exerted by OEA in PCD mice could also be mediated by the modulation of the cerebellar neuroinflammation as we will discuss below.

Finally, no weight reduction was observed in PCD mice due to the OEA administration, despite the anorexigenic effect of the drug (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003, 2005; Fedele *et al.*, 2018). These findings indicate that the dose and administration schedule employed in our study is safe and optimal to exert a neuroprotective effect while minimizing its side effects.

OEA modulates neuroinflammation and counteracts microgliosis and leukocyte recruitment

Previous studies had shown that the severe and rapid degeneration of Purkinje cells in PCD mice leads to an exacerbated cerebellar inflammation, glial reaction, and leukocyte recruitment (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013; Del Pilar *et al.*, 2021). It is well known that an excessive and chronic neuroinflammatory state can worsen the neuronal damage (Schwartz and Baruch, 2014; Hickman *et al.*, 2018; Subhramanyam *et al.*, 2019; Kwon and Koh, 2020; Muzio *et al.*, 2021). Considering the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of OEA (Benito *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2012, 2017; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020), we decided to analyze whether the modulation of this neuroinflammation could be also contributing to the neuroprotection observed in PCD mouse cerebellum.

At the molecular level, we observed a dual time-effect of OEA on modulating the gene expression of different inflammatory and neurotrophic factors. Thus, in the medium term –when PCD neurodegeneration has just started and an acute neuroinflammation is beneficial– OEA seemed to promote inflammation, whereas in the long term –when the neuronal death is at its peak and chronic neuroinflammation may be detrimental– OEA reduced it even to baseline values. This latter effect has been previously described in other experimental models in which the main cause of neuroinflammation was not neurodegeneration (Benito *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2012, 2017; Sayd *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Joshi *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020). However, our study is the first one describing the dual effect of OEA modulating neuroinflammation induced by neuronal death. Moreover, an increase in the gene expression of the neurotrophic factors *Bdnf* and *Map2* was also found after OEA administration, which could be also promoting a neuroprotective environment, as previously shown (Bento-Abreu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2019).

Regarding microgliosis, OEA treatment did not alter the distribution of microglial cells. Thus, in both untreated and treated PCD cerebellum a higher density of microglia was found in the regions where neurodegeneration is more aggressive, that is, in the lobules I to IX and in the outermost layers of the cerebellar cortex (Baltanás *et al.*, 2013). By contrast, OEA decreased globally this density and increased the percentage of anti-

inflammatory or reparative microglia in the cerebellum of PCD mice. These findings agree with previous ones in which PPAR α agonists decreased exacerbated glial response and modulated their phenotype towards an anti-inflammatory one (Herrera *et al.*, 2016; Guida *et al.*, 2017; Holubiec *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019).

An exacerbated neuroinflammatory state promotes massive leukocyte infiltration that can worsen the progression of the neurodegeneration (Kyuhou *et al.*, 2006; Schwartz and Baruch, 2014; Sweeney *et al.*, 2018; Profaci *et al.*, 2020). Considering that this leukocyte recruitment has been reported recently in the PCD cerebellum (Del Pilar *et al.*, 2021), we also assessed whether this phenomenon could be modified by OEA. Indeed, our results demonstrated for the first time that OEA treatment decreases leukocyte infiltration in this model, reaching baseline values similar to those observed in WT animals. However, it is not defined whether this effect may be due to the general decrease in the inflammatory state of the cerebellum and/or to an effect of the OEA on brain blood barrier permeability, since previous works have reported the capability of some PPAR α agonists to modulate it (Zhou *et al.*, 2012; Hind *et al.*, 2015). Nevertheless, although the mechanism by which OEA could be mediating the reduction of leukocyte recruitment is not yet described, these findings further broaden the range of therapeutic actions of OEA known to date.

OEA partially restores behavioral defects linked to cerebellar dysfunction

Given the neuroprotection exerted by OEA in the cerebellum of PCD mice, we decided to explore whether these improvements translated into changes in the cerebellar electrophysiology, as well as in the recovery of motor, cognitive, and social functions impaired in PCD mice (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Regarding cerebellar electrophysiology, extracellular single-unit recordings from Purkinje cells and DNC neurons of awake head-fixed mice were performed. Although no conclusions could be drawn from these experiments due to the small sample size, preliminary data did not show large noticeable differences in the PCD mouse regardless of treatment, unlike other models of cerebellar dysfunction (Walter *et al.*, 2006; Fremont *et al.*, 2015; Tara *et al.*, 2018; Washburn *et al.*, 2019; Snell *et al.*, 2022). These results may suggest a possible compensatory mechanism in the cerebellum of PCD mice, as previously proposed for the vestibular nuclei (Grüsser-Cornehls and Baurle, 2001). It should be noted that not much literature is available to date about the PCD cerebellar electrophysiology. This fact could be due to the challenge of finding Purkinje cells in a model where almost most of them have degenerated at P30, and that the surgeries for this technique were

standardized only for adult mice (Tara *et al.*, 2018; Snell *et al.*, 2022). For this reason, the setting of these procedures to mice of low body weight has been the first step to carry out such experiments in the PCD mouse and in other mouse models at early postnatal development stages.

Although the cerebellum has long been considered a purely motor structure (Ito, 2006; Sillitoe and Joyner, 2007), numerous studies have revealed that it also plays an important role in non-motor functions such as cognitive and affective behavior (Reeber *et al.*, 2013; Vožeh, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Carta *et al.*, 2019). Indeed, previous studies have demonstrated that an affection of this brain region leads to impairments in these functions, as described in PCD mice and other models of cerebellar damage (Landis and Mullen, 1978; Goodlett *et al.*, 1992; Le Marec and Lalonde, 1997; Lalonde and Strazielle, 2003, 2019; Tuma *et al.*, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Moreover, PCD mice mimics most of the behavioral defects observed in humans carrying the analogous mutation to the model and suffering from the disease called CONDCA (Shashi *et al.*, 2018; Karakaya *et al.*, 2019; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021). Considering the effects of OEA in stabilizing Purkinje cell arborization and increasing their survival, an improvement in these functional alterations would be expected. Indeed, OEA ameliorated general, motor, cognitive, and social defects observed in the PCD mutant mice until P30, which agrees with the histological findings. The results of the rotarod test showed that the general motor behavior of the treated PCD mice was halfway between that of the WT and untreated PCD mice from P22 to P40. However, no motor learning was detected in PCD groups, contrary to WT animals (Buitrago, 2004). Regarding overall behavior, OEA administration led to reestablishing normal performance patterns, the treated PCD mice exhibiting a behavior similar to that of WT animals up to P30, and without showing hypolocomotor effects related to high doses of OEA (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; González-Aparicio *et al.*, 2014; Fedele *et al.*, 2018). Regarding recognition memory and social preference, both functions were maintained up to P30 with values being similar to those of WT animals. These findings agree with previous studies in which the treatment with endocannabinoids improved or restored cognitive and social behaviors in models of brain damage (Campolongo *et al.*, 2009; Mazzola *et al.*, 2009; D'Agostino *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Holubiec *et al.*, 2018; Mirza and Sharma, 2018; Moya *et al.*, 2021; Rani *et al.*, 2021). Unfortunately, at P40, these behavioral improvements were not maintained in PCD mice treated with OEA. These findings are consistent with those previously discussed on

histological analysis and would support the limited temporal effect of OEA in the PCD mouse.

The neuroprotective properties of OEA are mediated by PPAR α in PCD mice

As PPAR α are the main receptors through which OEA exerts its main actions (Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003; Lo Verme *et al.*, 2005; Bento-Abreu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007), we decided to analyze its involvement in the properties observed in PCD mice by blocking them with the antagonist GW6471. Our results showed that the neuroprotective effects of OEA treatment were mainly mediated by these receptors since the administration of the PPAR α antagonist GW6471 fully reversed the OEA-mediated effects at both the cellular and behavioral levels (Pérez-Martín *et al.*, 2021). These findings agree with those previously described in which the PPAR α inhibition, silencing, or even absence in knock-out mice abolished the actions of OEA (Sun *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2012; González-Aparicio *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016, 2015; Bilbao *et al.*, 2016; Holubiec *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019; Silva-Peña *et al.*, 2019; Ogawa *et al.*, 2020; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Moreover, our molecular analyses also showed that OEA treatment increased *Ppara* gene expression in the cerebellum of PCD mice, both in the short- and long-term, as previously demonstrated by immunohistochemistry (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Thus, although the involvement of other receptors or an indirect effect of OEA cannot be ruled out, our findings indicated that the neuroprotective effects of OEA in PCD mice are directly dependent upon PPAR α .

Combined treatments of OEA and cell therapy are safe and allow the arrival and integration of transplanted cells in the cerebellum

Previous studies employing stem cell therapy -either BMSC or MSCs- have reported to be safe and effective in PCD mice, as well as in other models of cerebellar disease (Bae *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2011; Kemp *et al.*, 2011, 2018a, 2018b; Díaz *et al.*, 2012b, 2015, 2018, 2019; Nakamura *et al.*, 2015; Huda *et al.*, 2016; Correia *et al.*, 2021; Pérez-Martín *et al.*, 2021). However, to our knowledge our study is the first one in which cell therapy is combined with a pharmacological administration of OEA. Thus, the first step was to ensure its safety and effectiveness.

First, mice that received the combined treatment of OEA and stem cells (regardless of the cell type) were monitored throughout the duration of the experiments until the corresponding age of survival. Only three animals of the total that received the combined treatment of OEA and BMSC died. However, we cannot determine whether the cause was due to a) the myeloablation process and failure to bone marrow reconstitution, b) a possible deleterious effect of the combined treatment, or c) common mortality inherent to the PCD model. In this regard, we also detected a negative side effect in the body weight of those PCD animals irradiated and treated with OEA and BMSC that probably was caused by the irradiation process, as previously shown in both animals and humans underwent to radiotherapy (Koch *et al.*, 2016). This is supported by the fact that in those PCD mice that received the combined treatment of OEA and MSCs, without myeloablative irradiation, no weight loss was observed. In any case, in both combined treatments of OEA and cell therapy, GFP+ cells were detected in recipient peripheral blood, with chimerism values being similar to those previously described (Recio *et al.*, 2011; Díaz, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2018, 2019). In particular, the percentage of GFP+ cells increased over time in those animals treated with OEA and complete BMSC transplantation, revealing the progressive bone marrow substitution in recipient mice and the effectiveness of the transplant. Regarding the combined treatment of OEA and MSCs, although the percentage of GFP+ cells was low, our results confirmed that the cells escaped the recipient immune system due to their low immunogenicity (Uccelli *et al.*, 2008; Ankrum *et al.*, 2014) and that they could exert some effect on these animals.

Regarding the arrival and integration of transplanted cells in the cerebellum, noteworthy differences were found between the two combined treatments. In animals treated with OEA and BMSC, a high density of GFP+ cells were found in the cerebellar parenchyma even only ten days after transplantation, most of them being microglia, as previously described (Priller *et al.*, 2001; Recio *et al.*, 2011; Díaz, 2011; Díaz *et al.*, 2012b; Kemp *et al.*, 2018a; Sailor *et al.*, 2022). By contrast, in animals treated with OEA and MSCs, a low density of GFP+ cells were found, which corresponded mainly with Purkinje cell somata with aberrant arborization and morphology, similar to those observed in a previous work of our laboratory (Díaz *et al.*, 2019). These results contrasted with previous ones in which a variable number of fusion events were found between transplant-derived cells and Purkinje neurons, regardless of the type of stem cell employed (Priller *et al.*, 2001; Álvarez-Dolado *et al.*, 2003, 2007; Weimann *et al.*, 2003a; Bae *et al.*, 2007; Magrassi *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2011; Kemp *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2015, 2018,

2019; Matsuura *et al.*, 2014; Huda *et al.*, 2016). This fact could be partially explained by the survival ages of the animals employed in our work, since in the aforementioned studies the analyses were carried out months after the transplantation (Díaz *et al.*, 2015). Nevertheless, although these fusion cases were hardly observed, the transplanted cells could be exerting a direct or indirect effect on the cerebellum, as showed in other studies (Uccelli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018), or a summative effect with OEA treatment.

Combined treatment of OEA and cell therapy improves motor behavior at P30 but without a noticeable synergistic neuroprotective effect

To compare the effects of the combined treatment of OEA and cell therapy and those of the sole administration of OEA, motor behavior and histological analyses were performed identically to those described for OEA treatment.

Regarding motor behavior, all treated PCD groups showed an amelioration in the performance of rotarod test at P30 compared to untreated PCD mice. However, only the combined treatment of OEA and complete BMSC transplantation improved this behavior compared to the sole administration of OEA (Pérez-Martín *et al.*, 2021).

To verify whether this improvement was driven by the neuroprotection of the combined treatment in the cerebellum or due to a peripheral effect of BMSC (as showed in a previous work of our laboratory (Díaz *et al.*, 2018), we analyzed the same cytological variables of Purkinje cells as performed in the other therapeutic approaches. Both combined treatments exerted a partial neuroprotective effect on Purkinje cells in PCD mice. Overall, no noticeable differences were detected in most of the variables analyzed (soma area, main dendrite width and Purkinje cell density) compared to the exclusive treatment with OEA (Pérez-Martín *et al.*, 2021). Strikingly, a null or deleterious effect was found in some variables such as the dendritic arbor and the main dendritic length. One possible explanation for the animals treated with OEA and complete BMSC could be related to the myeloablative radiation that they suffered. Indeed, previous works have demonstrated that the exposure to radiation in neonates damages the cerebellum and induces morphological changes in the dendritic arbor of Purkinje cells (Altman and Anderson, 1971; Mariani and Changeux, 1980; Ralcewicz and Persaud, 1995). However, this deleterious effect was also detected in mice treated with OEA and MSCs without radiation. In this sense, another possible explanation could be related to some negative interaction between the cells derived from transplant –mainly located in the meninges–

and the neurons of the molecular layer where Purkinje cells extend their dendritic arbor. Most of these transplant-derived cells showed a morphology and neurochemistry of microglia or macrophages, and they could also be mediating phagocytic processes in this region of the cerebellar cortex (Kavetsky *et al.*, 2019; Sailor *et al.*, 2022). Although it would be interesting to reveal the causes of this deleterious effect, we have not considered them as an objective of this Doctoral Thesis. In any case, the results obtained in the histological analyses would suggest that the improvement in motor behavior could be due to a direct or indirect effect of combined treatments on unanalyzed neuronal populations (Sánchez-Ramos *et al.*, 2008; Uccelli *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2018), and/or to the integration and differentiation of BMSC in skeletal muscle fibers, as previously reported (Díaz *et al.*, 2018).

To sum up, it seems that combined treatments with OEA and some stem cell therapies do not exert a clear improvement in the neuroprotective properties of the exclusive pharmacological treatment with OEA. Considering its possible clinical application, we have also demonstrated that a single administration of OEA carries fewer risks and side effects than the combined treatments, without compromising patient well-being and quality of life.

CONCLUSIONS

According to the proposed objectives and the results obtained and discussed in the present Doctoral Thesis, the following conclusions can be drawn:

- I. OEA treatment is most effective when administered preventively and early in the onset of neurodegeneration. The optimal administration of 10 mg/kg via i.p. at P12 exerts a neuroprotective effect by:
 - a. delaying Purkinje cell dysfunction and death,
 - b. modulating neuroinflammation and counteracting microgliosis,
 - c. decreasing peripheral leukocyte infiltration towards the cerebellar parenchyma,
 - d. partially improving motor, cognitive, and social functions impaired in PCD mice,
 - e. its action through PPAR α receptors, at both the histological and behavioral levels.

- II. The combined treatment of OEA and BMSC is safe and effective on bone marrow reconstitution. This treatment shows a partial neuroprotective effect in the cerebellum of PCD mice by:
 - a. Increasing the survival of Purkinje cells and partially maintaining their morphology,
 - b. Ameliorating motor behavior at P30 compared to exclusive OEA treatment.
- III. The combined treatment of OEA and MSCs exerts a partial neuroprotection in the cerebellum of PCD mice exclusively by diminishing the Purkinje cell death and partially maintaining their morphology.

The combined treatment of OEA and stem cell therapy evaluated does not exert, in general, a synergistic neuroprotective effect in the mouse model of selective neuronal degeneration PCD. In only few analyzed variables a summative result was found, while in some others an antagonistic and/or deleterious side effect was detected.

FIGURES

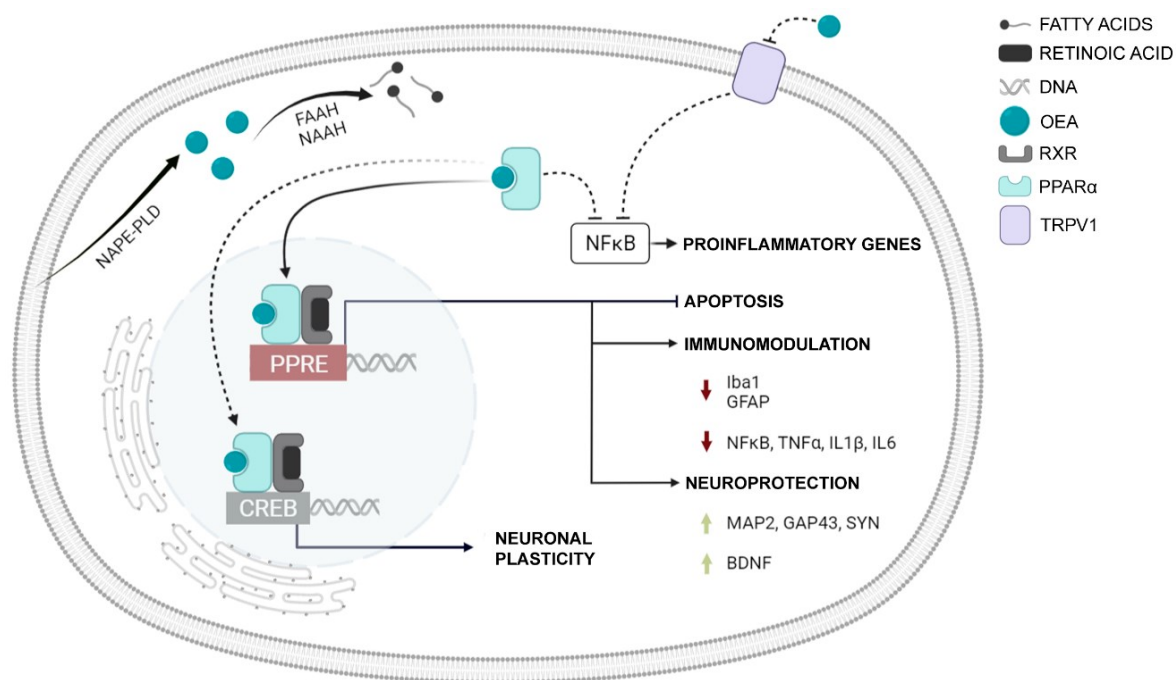


FIGURE S1 | Graphic representation of the possible mechanism of action of OEA through the PPARα and TRPV1 receptors, and its main neuroprotective and anti-inflammatory effects. Documented pathways are represented in solid lines while hypothetical ones appear in dashed lines based on previous studies. *BDNF*, brain-derived neurotrophic factor; *CREB*, cAMP response element-binding protein; *DNA*, deoxyribonucleic acid; *FAAH*, fatty acid amide hydrolase; *GAP43*, growth associated protein 43; *GFAP*, glial fibrillary acidic protein (astrocyte marker); *Iba1*, ionized calcium-binding adapter molecule 1 (microglial marker); *IL1β*, interleukin 1 β; *IL6*, interleukin 6; *MAP2*, microtubule-associated protein 2; *NAAH*, *N*-acylethanolamide acid amide hydrolase; *NAPE-PLD*, *N*-acyl phosphatidylethanolamide-specific phospholipase D; *NFκB*, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; *OEA*, oleoylethanolamide; *PPARα*, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; *PPRE*, peroxisome proliferator response element; *RXR*, retinoid X receptor; *SYN*, synuclein; *TNFα*, tumor necrosis alpha; *TRPV1*, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1. Created with Biorender.com.

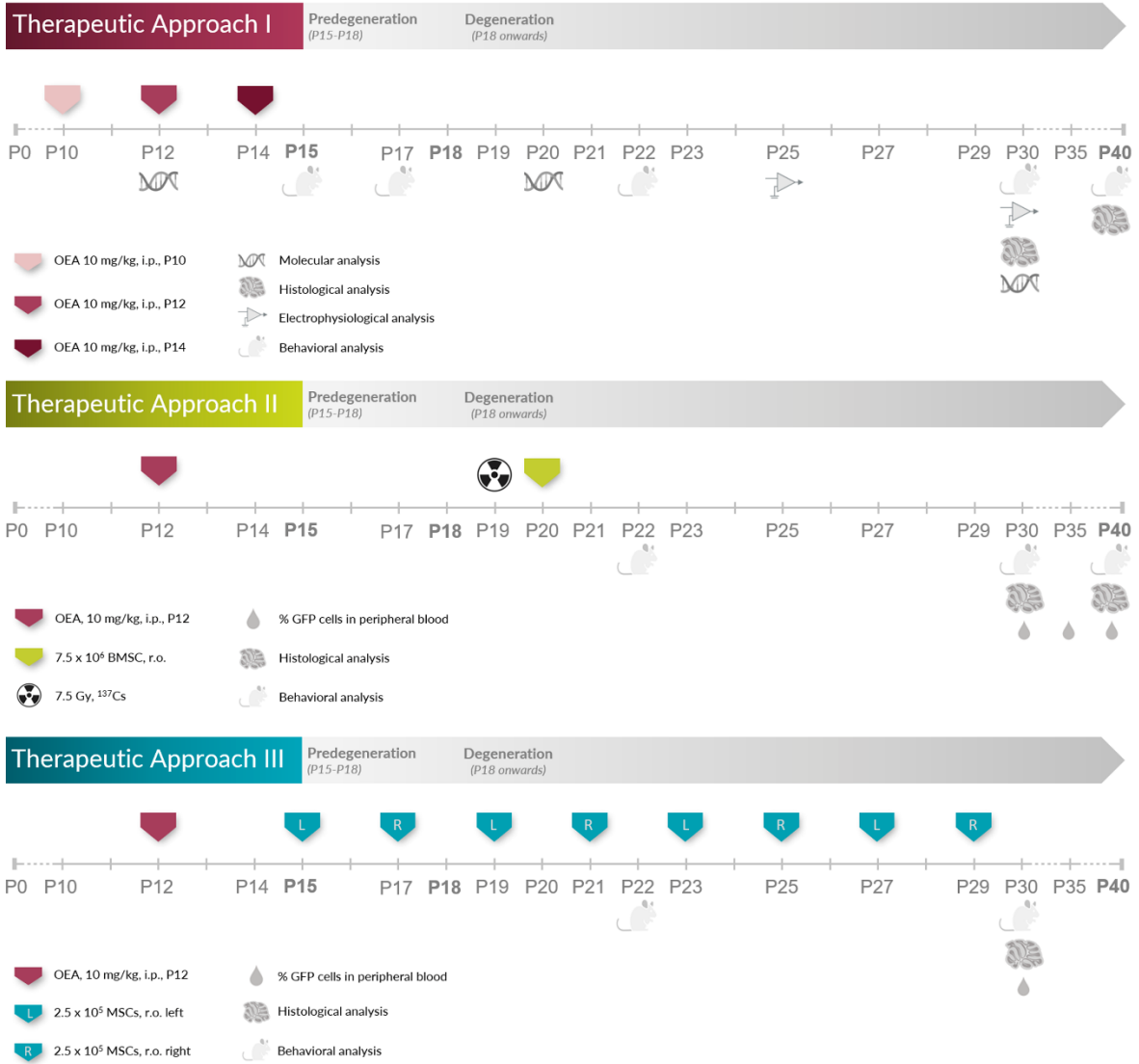


FIGURE S2 | Experimental design of the different therapeutic approaches evaluated in this Doctoral Thesis and the main analyses carried out. *i.p.*, intraperitoneal; *r.o.*, retroorbital.

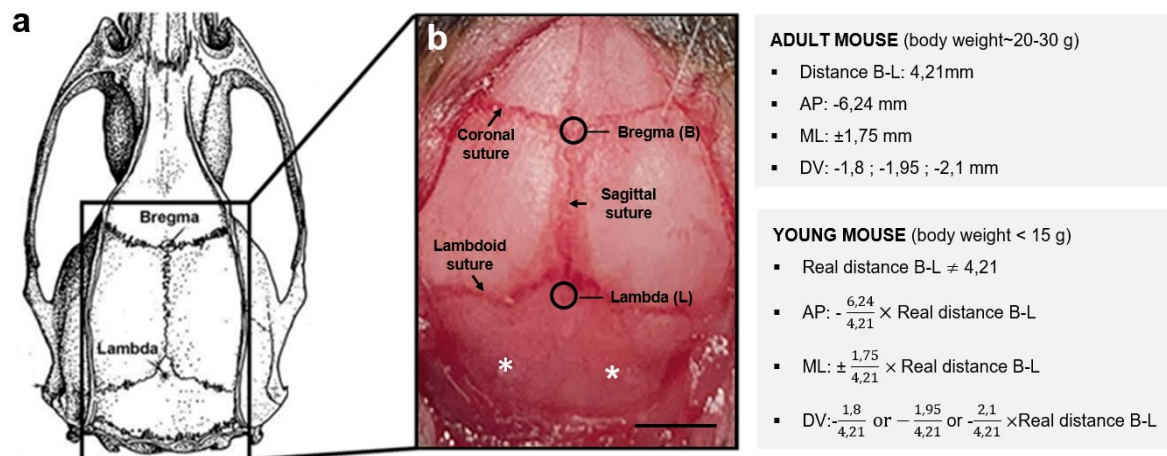


FIGURE S3 | Stereotaxic coordinates calculation for young mice (<15 g body weight). (a) Illustration of the dorsal view of a rodent skull. (b) Real dorsal view of the skull of a 25 days-old mouse. Asterisks indicate the location of the DCN. Scale bar: 2 mm (b). AP, anteroposterior; B, bregma; DV, dorsoventral; L, lambda; ML, mediolateral.

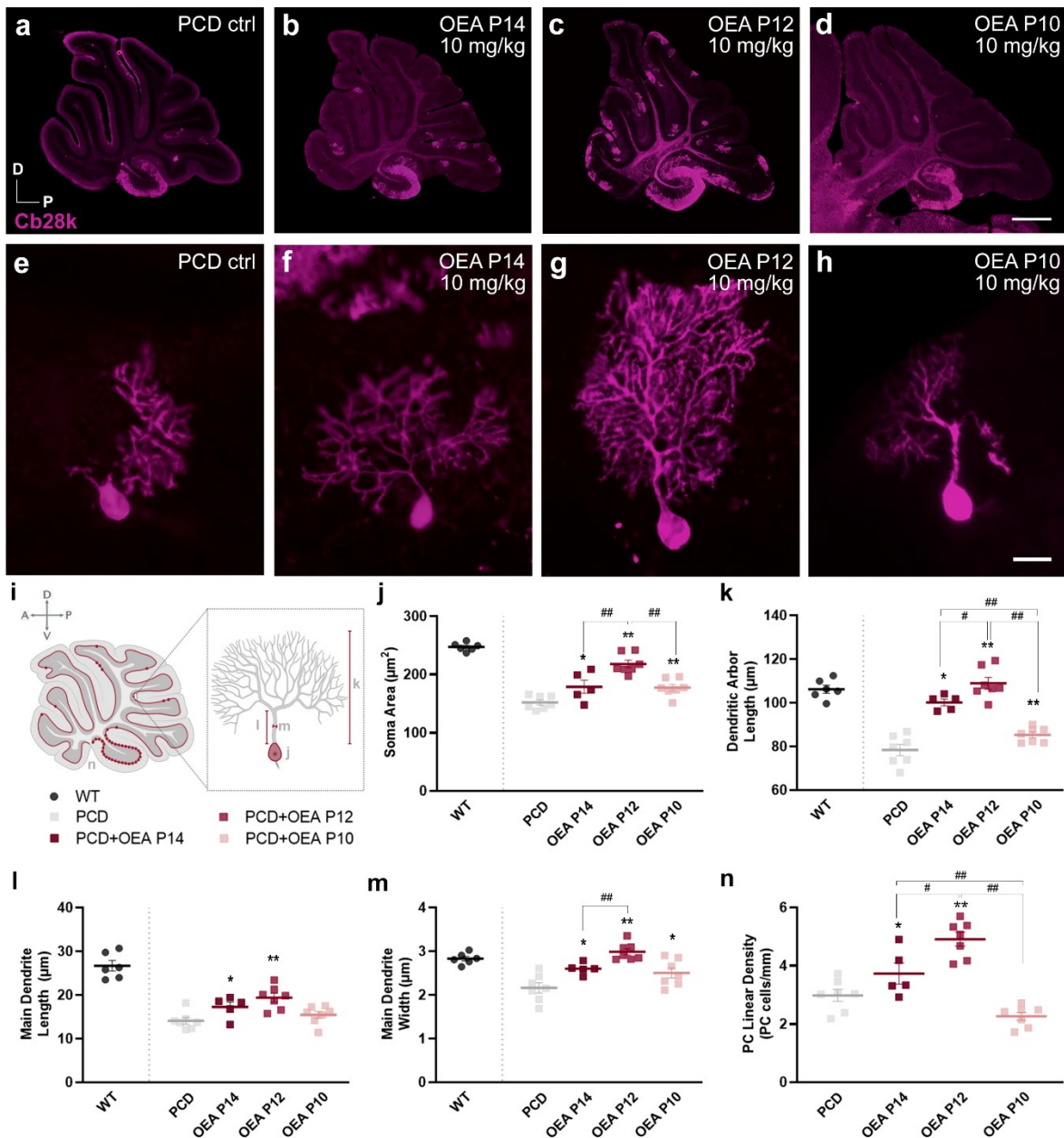


FIGURE S4 | Neuroprotective effect of OEA on Purkinje cell morphology and density in PCD mouse at P30. (a-h) Micrographs of PCD cerebellar vermis and Purkinje cells labeled with calbindin (Cb28k, magenta) of the different experimental groups: untreated PCD mice (a, e), OEA-treated PCD at P14 (b, f), at P12 (c, g) and at P10 (d, h); an increase in the Purkinje cell density can be qualitatively observed when OEA is administered at P12. (i-n) Quantification of the effect of OEA on Purkinje cells morphology and survival: soma area (j), dendritic arbor length (k), main dendrite length (l) and width (m), and Purkinje cell density (n). Note that the neuroprotective effect of OEA follows an inverted U-shaped time-response curve, with acute administration of OEA at P12 being the most effective treatment. $n = 5-7$ per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for j-n. $*/** p < 0.05/0.01$ for differences between OEA treatments and untreated PCD mice; $\#/\#\# p < 0.05/0.01$ for differences among different OEA treatments (specific *p*-values in Appendix III, 1). Data from WT animals have been used only as a reference, not to compare. Scale bar: $500 \mu\text{m}$ (a-d), $20 \mu\text{m}$ (e-h). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral. Modified from Pérez-Martín *et al.*, 2021.

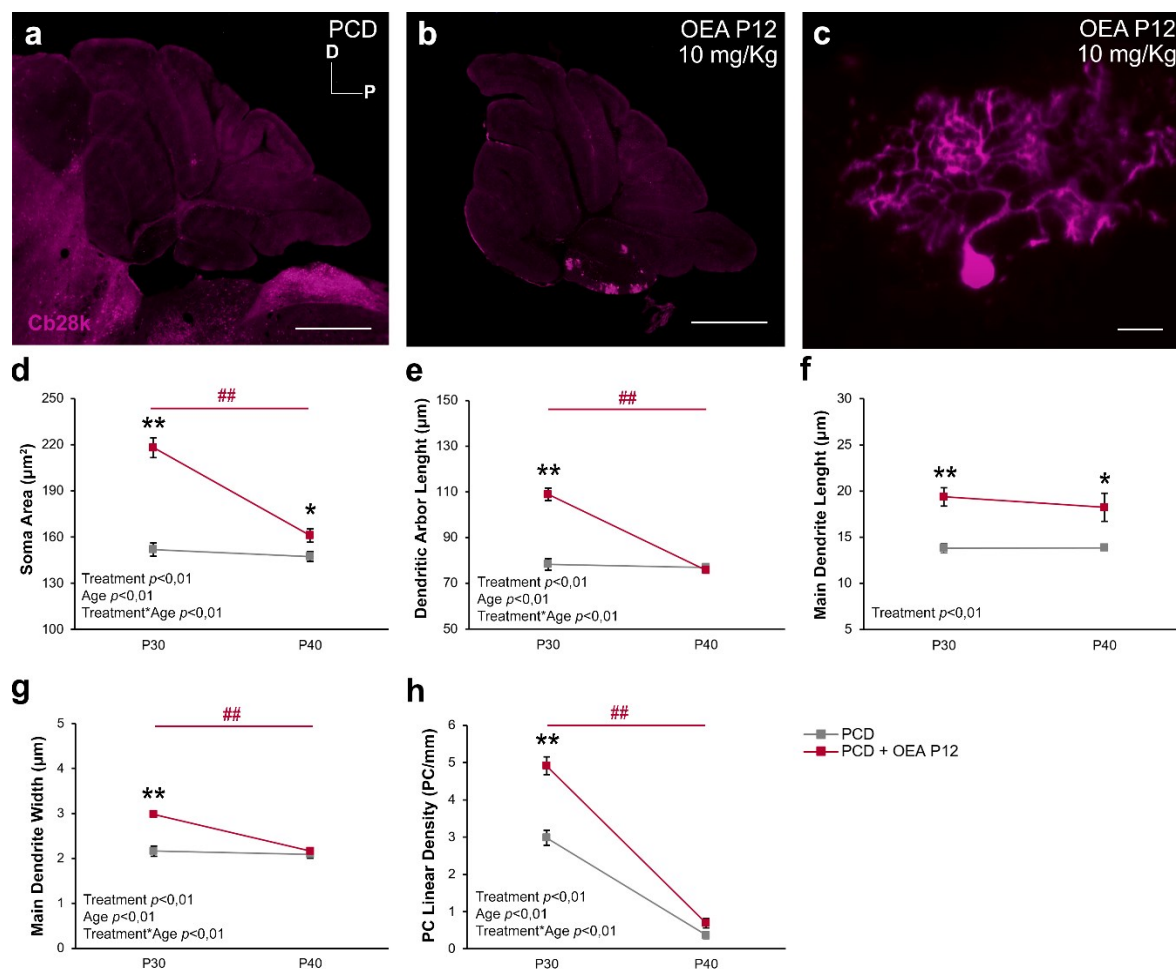


FIGURE S5 | Neuroprotective effect of the optimal OEA treatment on Purkinje cell morphology and density in PCD mouse at P40. (a-c) Micrographs of two PCD cerebellar vermis and one Purkinje cell labeled with calbindin (Cb28k, magenta) of untreated PCD mice (a) and OEA treated PCD mice at P12 (b, c) analyzed at P40. (d-h) Quantification of the effect of OEA on Purkinje cells morphology and survival at P30 vs. P40: soma area (d), dendritic arbor length (e), main dendrite length (f) and width (g), and Purkinje cell density (h). Note that the neuroprotective effect observed at P30 is maintained over time only in two of the morphological parameters analyzed: soma area and the main dendrite length. $n = 8$ per experimental group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test and Student's *t* test (for each age analyzed) for d-h. */** $p < 0.05/0.01$ between experimental groups; ## $p < 0.01$ between ages (specific *p*-values in Appendix III, 2). Scale bar: 500 μm (a, b), 20 μm (c). D, dorsal; P, posterior. Modified from Pérez-Martín *et al.*, 2021.

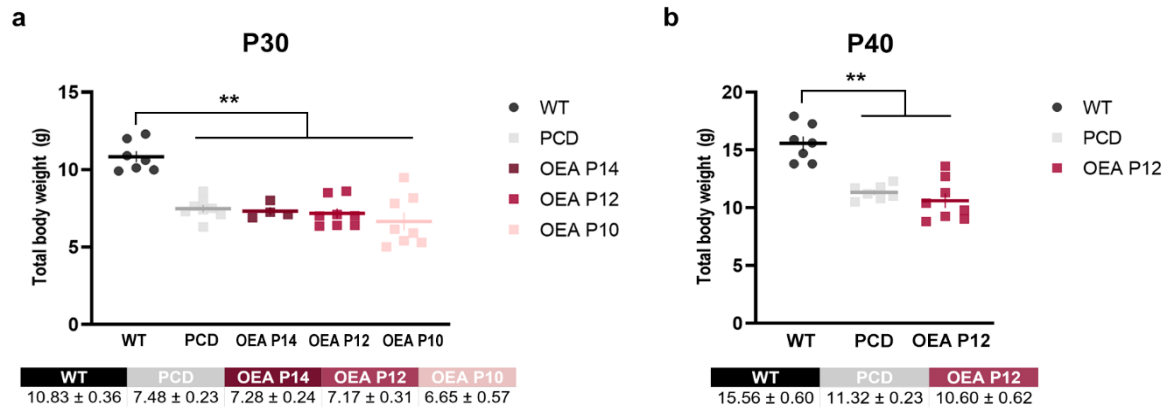


FIGURE S6 | Effect of OEA administration on body weight of PCD mice at P30 and P40. (a) Analysis and mean values of body weight at P30 of WT, untreated PCD and OEA treated PCD (10 mg/kg, i.p., at P14, P12 or P10). **(b)** Analysis and mean values of body weight at P40 of WT, untreated PCD and OEA treated PCD (10 mg/kg, i.p.) at P12. Note that none of the different OEA administration employed in this study exerted an anorexigenic effect in PCD mice. $n = 5-8$ per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. ** $p < 0.01$ (specific p -values in Appendix III, 3).

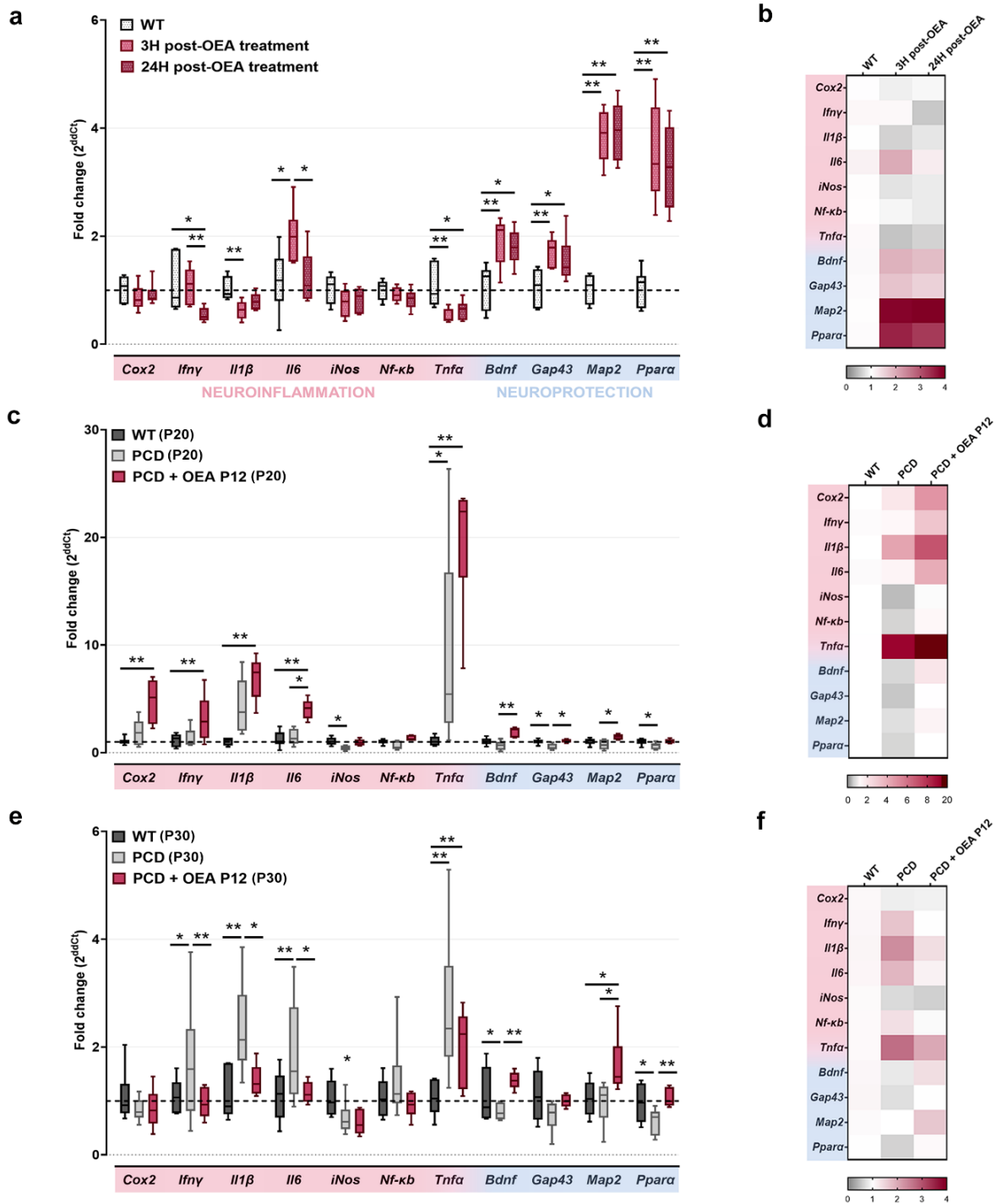


FIGURE S7 | OEA effect on mRNA levels of different inflammatory and neuroprotective factors in the short-, medium- and long-term. (a, b) Chart showing relative mRNA levels of different inflammatory markers and neuroprotective factors 3- and 24-hours after OEA treatment in 12-days old WT mice (a) and its corresponding heatmap gene expression (b). (c, d) Chart showing relative mRNA levels of different inflammatory markers and neuroprotective from WT, untreated PCD and OEA-treated PCD at P20 (c) and its corresponding heatmap gene expression (d). (e, f) Chart showing relative mRNA levels of different inflammatory markers and neuroprotective factors from the same experimental groups as in c and d at P30 (e) and its corresponding heatmap gene expression (f). Note that OEA-treated mice showed an overall reduction in mRNA levels of proinflammatory markers and an increase in neuroprotective factors both in the short- and the long-term; and a striking increase in *Tnfa* gene expression was detected at the onset of the Purkinje cell degeneration process in both PCD groups. n= 6 per experimental group (3 replicates per biological sample). Kruskal-Wallis' test for a, c, e. */** $p < 0.05/0.01$ (specific p -values in Appendix III, 5-7).

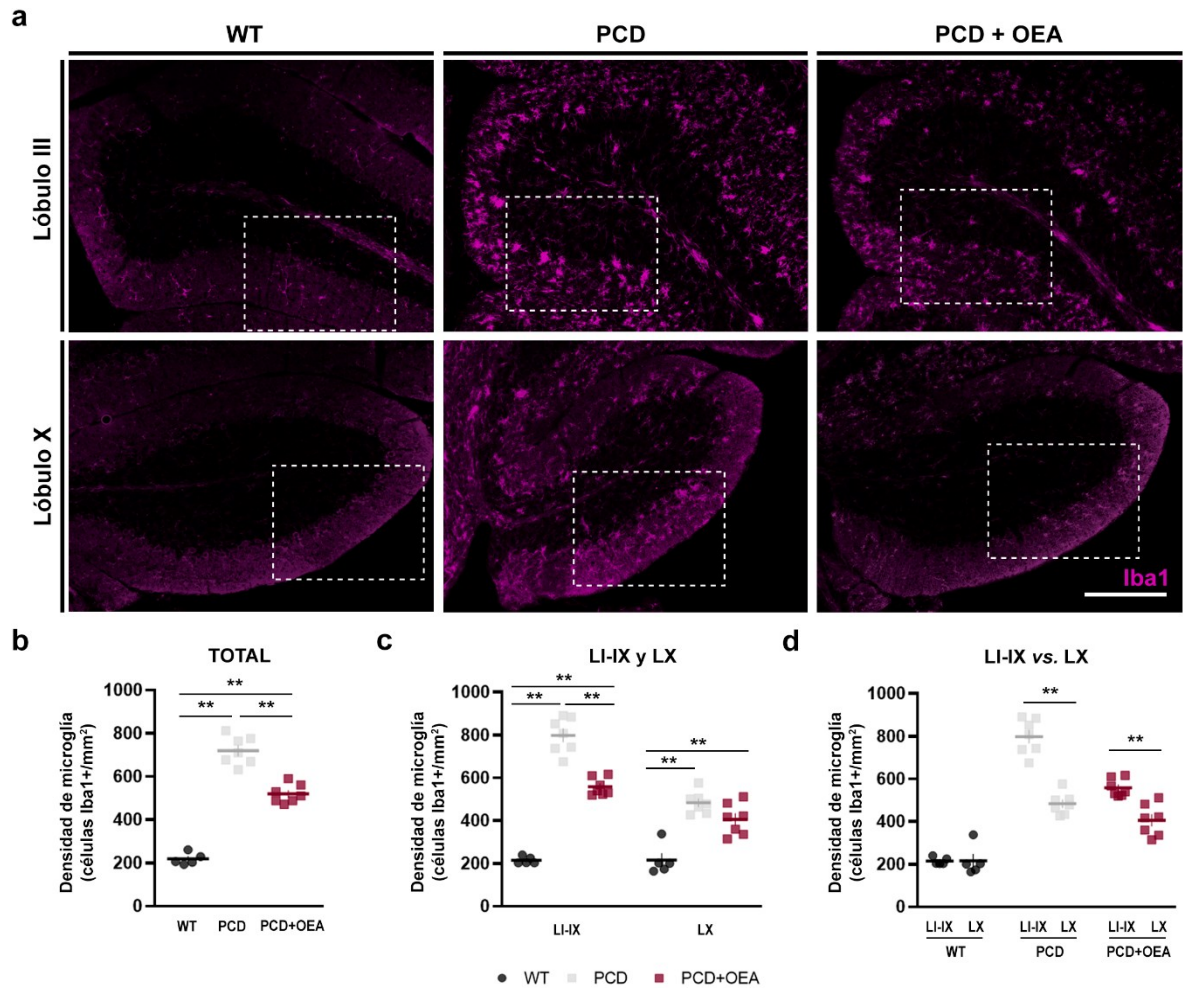


FIGURE S8 | OEA effect on microglial density in the cerebellum (total and per lobules). (a) Immunolabeling for Iba1 (magenta) showing microglial cells in the lobule III and lobule X of the cerebellar vermis of WT, PCD and OEA-treated PCD mice at P30. Dotted insets show the position where micrographs of the Figure S9 were taken from. (b-d) Quantification of the OEA effect on total (b) and per lobules (c, d) microglia density. Note that OEA treatment decreases the density of Iba1+ cells in PCD mice when analyzing both the entire and LI-IX cerebellar vermis. Moreover, unlike WT mice, an increase in the density of Iba1+ cells is found in LI-IX compared to LX in both PCD groups. $n = 5-7$ animals per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for b, c; and Student's *t* test for d. ** $p < 0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 8 and 9). Scale bar: 100 μm .

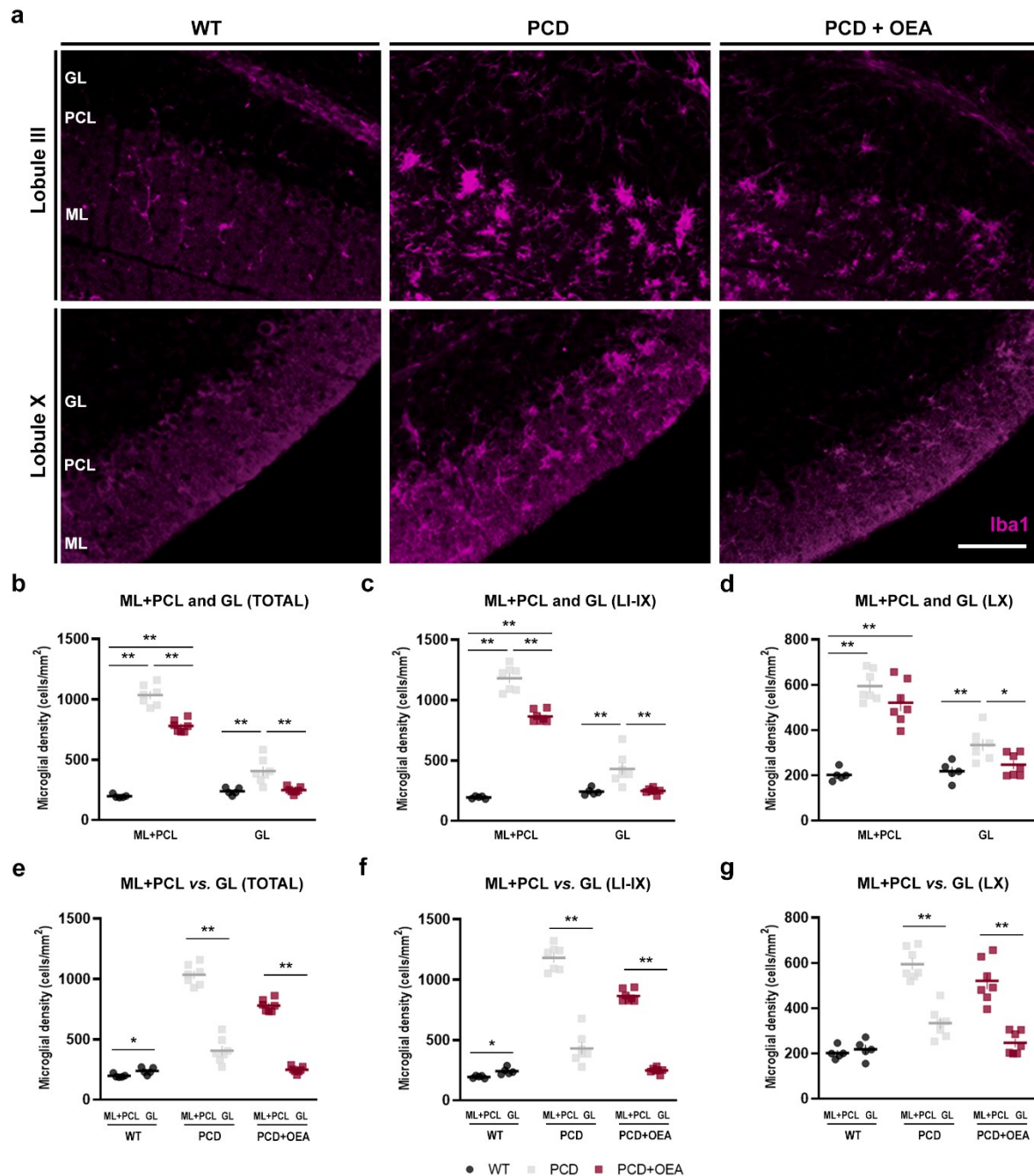


FIGURE S9 | OEA effect on microglial density per layers of the cerebellar cortex. (a) Magnification images of insets in Figure S8 a showing microglia labelled with Iba1 (magenta) in the different layers of the cerebellar cortex of WT, PCD and OEA-treated PCD mice at P30. **(b-d)** Quantification of the OEA treatment effect on microglial density in the whole cerebellar cortex (b), lobule I to IX (c) and lobule X (d), per layers, and comparison among the experimental groups; note that OEA-treated PCD values are always halfway between those of WT and untreated PCD mice for most of the comparisons. **(e-g)** Quantification of the microglial density in total cerebellar cortex (e), lobule I to IX (f) and lobule X (g) for each experimental group, and comparison between layers; note that, unlike WT, the density of Iba1+ cells is higher in the outermost layers (ML+PCL) compared to deeper layer (GL) in both PCD groups for all comparisons. $n = 5-7$ animals per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for b-d and Student's *t* test for e-g. */** $p < 0.05/0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 10). Scale bar: 50 μm . GL, granular layer, ML, molecular layer, PCL, Purkinje cell layer.

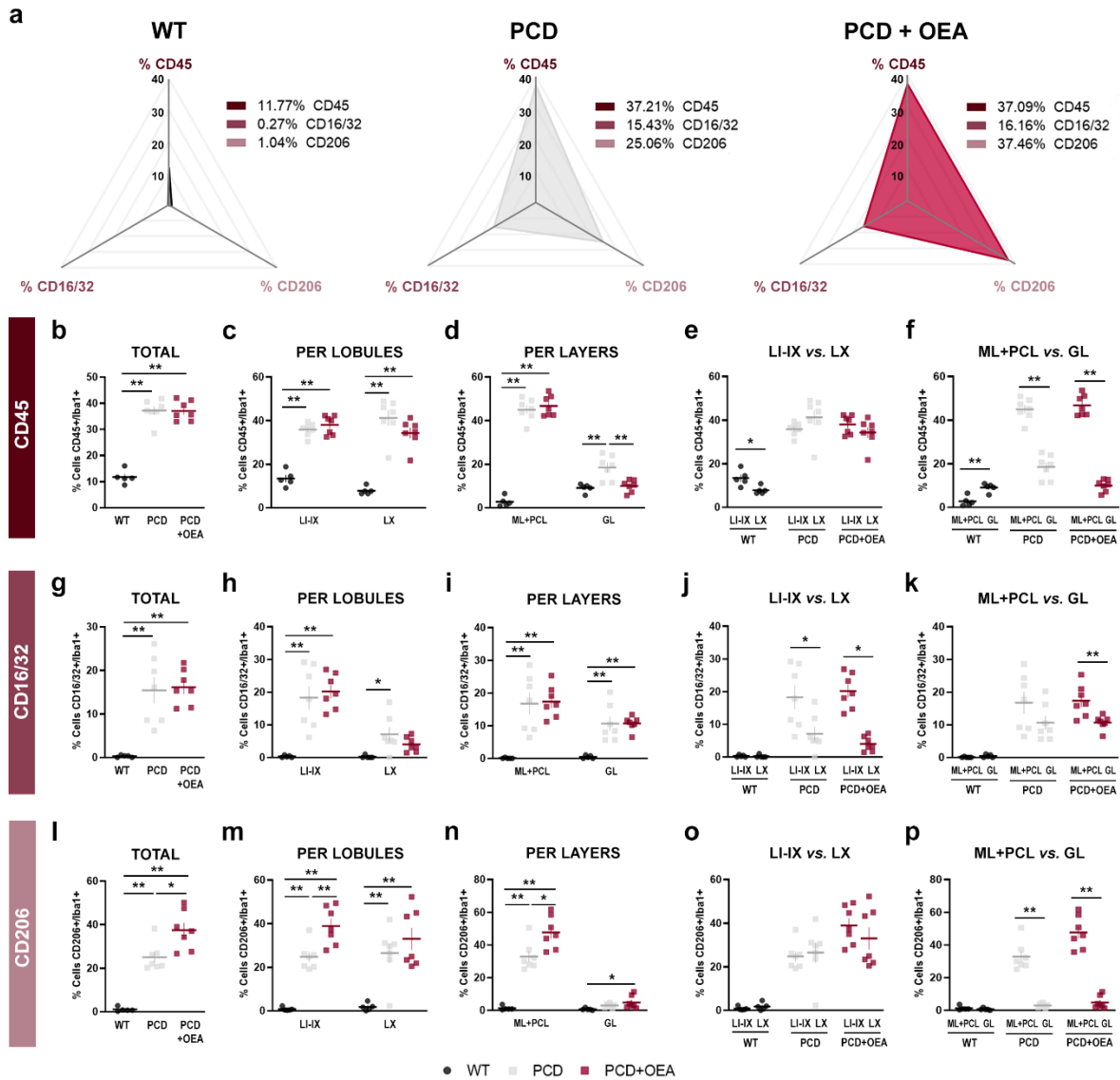


FIGURE S10 | Quantitative analyses of marker-based microglial populations CD45, CD16/32 and CD206 in the cerebellum. (a) Prism representation of the percentage of double CD45/Iba1+, CD16/32/Iba1+ and CD206/Iba1+ cells in the cerebellum for each experimental group WT, PCD and OEA-treated PCD at P30. Note that WT mice showed a lower percentage of all the microglial populations compared to that of both PCD groups, and that an increase in the anti-inflammatory CD206 marker could be clearly observed in OEA-treated PCD ring. (b-f) Quantification of the percentage of reactive CD45 microglia in total (b), per lobules (c, e), and per layers (d, f). (g-k) Quantification of the percentage of proinflammatory CD16/32 microglia in total (g), per lobules (h, j), and per layers (i, k). (l-p) Quantification of the percentage of anti-inflammatory CD206 microglia in total (l), per lobules (m, o), and per layers (n, p). Note that the most evident effect of OEA treatment is the increase in the percentage of the anti-inflammatory CD206 microglial marker for all the comparisons analyzed. n = 5-7 animals per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for b-d, g-i, l-n; and Student's *t* test for e, f, j, k, o, p. */** $p < 0.05/0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 11-13). GL, granular layer, ML, molecular layer, PCL, Purkinje cell layer.

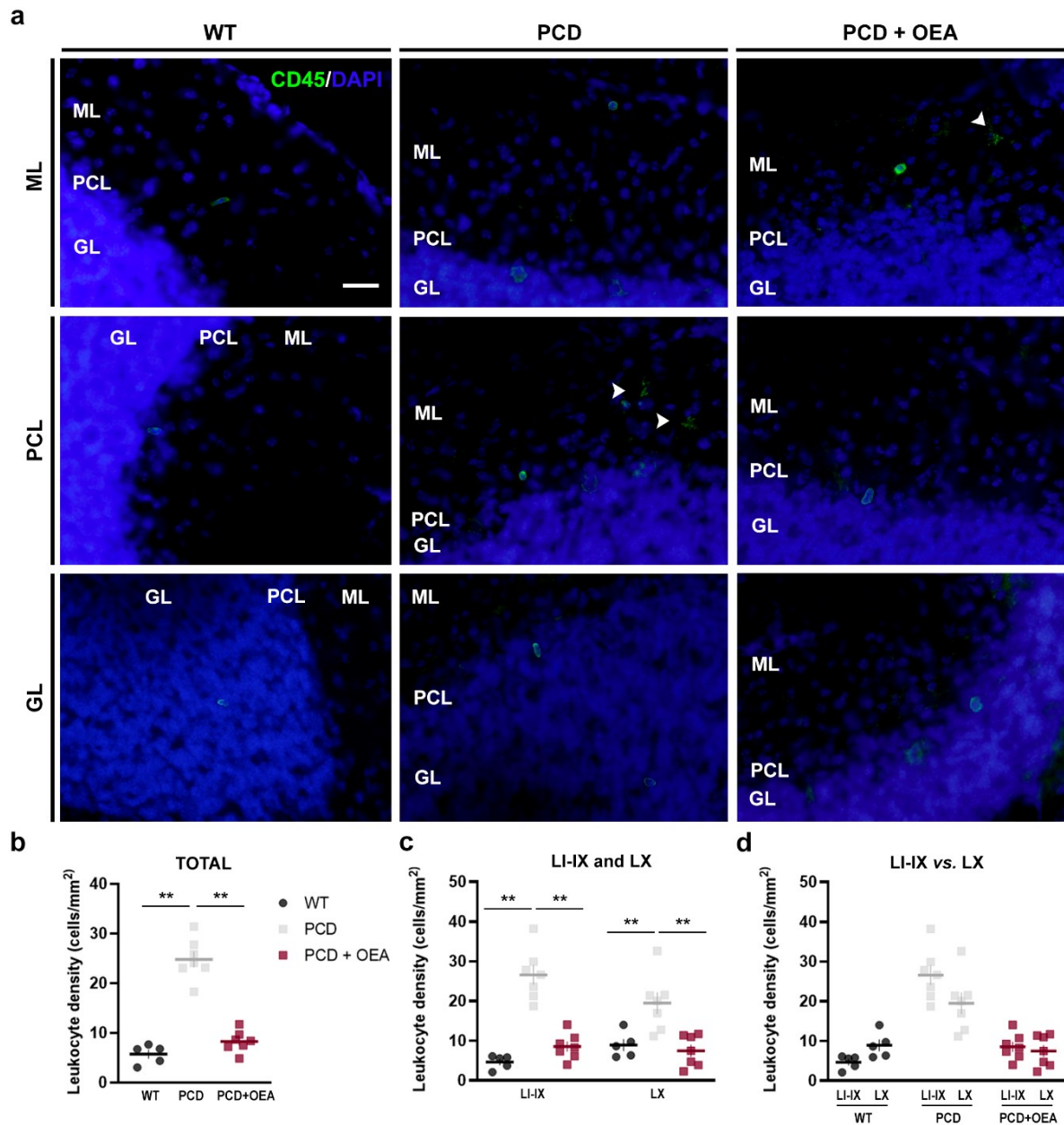


FIGURE S11 | OEA effect on leukocyte infiltration and distribution per lobules in the cerebellum. (a) Micrographs of leukocytes labeled with CD45 (green) distributed in the different layers of the cerebellum of WT, PCD and OEA-treated PCD mice at P30; nuclei are stained with DAPI (blue); white arrows point out microglia. (b-d) Quantification of the density of infiltrated leukocytes in the total cerebellar vermis (b) and per lobules (c-d). Note that the increased leukocyte recruitment observed in untreated PCD mice was prevented in mutant animals treated with OEA, showing similar values to those of WT mice. $n = 5-7$ animals per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for b, c; and Student's *t* test for d. ** $p < 0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 14). Scale bar: 20 μm . GL, granular layer, ML, molecular layer, PCL, Purkinje cell layer.

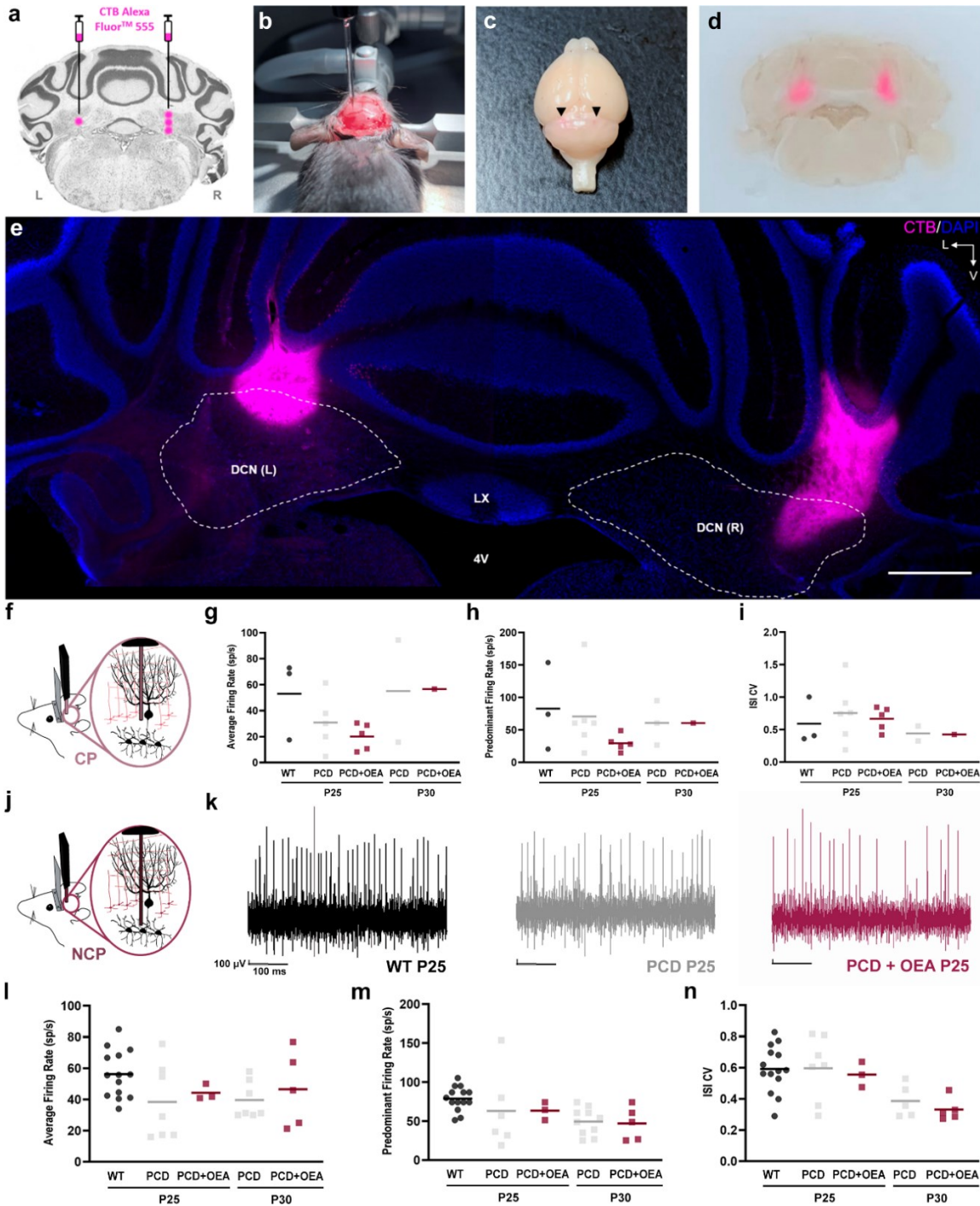


FIGURE S12 | OEA effect on Purkinje cell and deep cerebellar nuclei electrophysiological properties at P25 and P30. (a, b) Experimental design (a) and dorsal view (b) of stereotaxic surgeries for evaluation of new calculated coordinates. (c, d) Dorsal (c) and coronal (d) macroscopic views of the CTB injections in a ~10 g body weight mouse. Arrowheads indicate injection location. (e) Micrograph of a cerebellar coronal section showing the CTB tracer (magenta) in deep cerebellar nuclei (DCN) locations limited by dotted lines; cell nuclei counterstained with DAPI (blue). (f-i) Schematic representation of Purkinje cell recordings in awake head-fixed mouse (f) and quantification of the following firing properties: average (g) and predominant (h) firing rate, and ISI CV (i). (j-n) Schematic representation of DCN recordings (j); examples of electrophysiological traces of WT, PCD and OEA-treated PCD mice at P25, and quantification the same firing properties as mentioned before (l-n). No noticeable differences were observed among the experimental groups. $n = 2-6$ per experimental group. No statistical analyses were carried out due to the small sample size. Scale bar: 1000 μm . 4V, fourth ventricle; CTB, Cholera Toxin Subunit B; DCN, deep cerebellar nuclei; L, left; LX, lobule X; R, right; V, ventral.

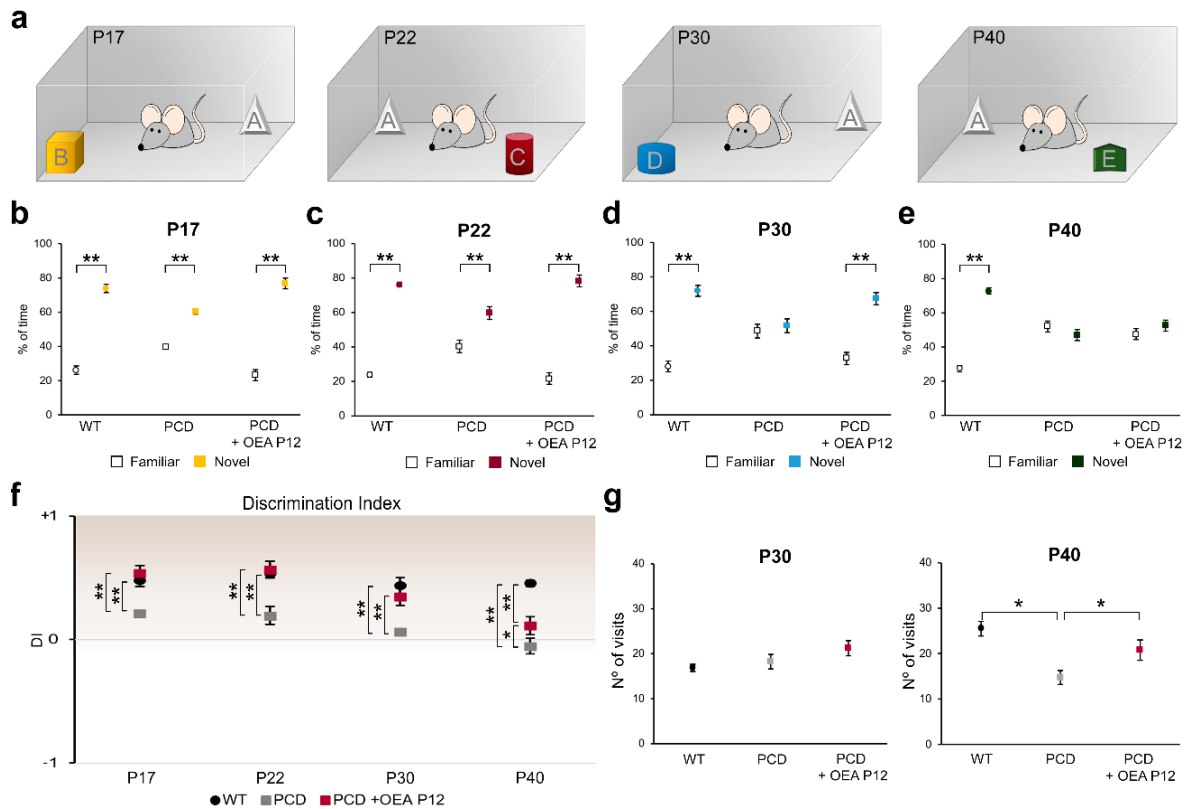


FIGURE S14 | Effect of OEA on recognition memory along cerebellar degeneration of PCD mice. (a) Schematic representation of the NOR test and the objects employed. **(b-e)** Analyses of the percentage of time exploring familiar and novel objects at different ages for WT, PCD and treated PCD animals; the preference for new objects is maintained in treated PCD mice until P30. **(f)** Chart showing the discrimination index at different ages for WT, PCD and treated PCD mice; note that this index is similar in WT and treated PCD until P30, always resulting in a positive score greater than zero, which means there is a preference for novel objects. **(g)** Quantification of the number of visits to both objects at P30 and P40; no differences were observed at P30 while at P40 a decrease in the number of visits was detected in non-treated PCD. $n = 8$ per experimental group. Student's t -test for b-e; and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for f, g. $^{*}/^{**} p < 0.05/0.01$ (specific p -values in Appendix III, 17). Modified from Pérez-Martín *et al.*, 2021.

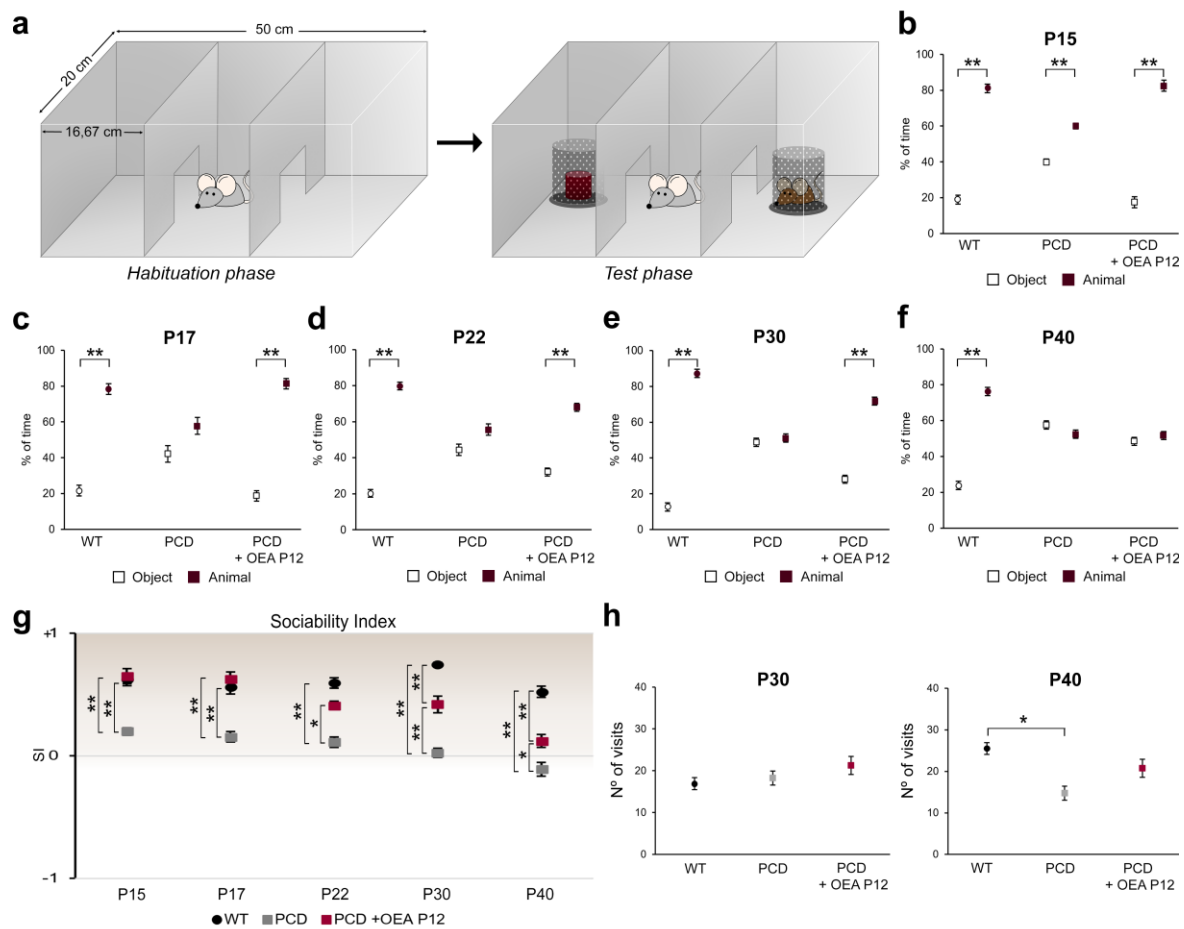


FIGURE S15 | Effect of OEA on social behavior throughout the cerebellar degeneration of PCD mice. (a) Schematic representation of the three-chambered social preference test. **(b-f)** Quantification of the percentage of time spent exploring the chamber, containing either an intruder or an object, by WT, PCD and treated PCD mice at different ages; note that the normal social behavior was impaired in non-treated PCD mice from P17 onwards, whereas treated PCD animals maintained a normal social pattern until P30. **(g)** Chart showing the sociability index at different ages for WT, PCD and treated PCD animals; similar values were observed in WT and treated PCD mice until P30, at which time the treated PCD subjects showed an intermediate score between WT and non-treated PCD mice. **(h)** Quantification of the number of visits to both objects at P30 and P40; a decrease in the number of visits was detected in non-treated PCD mice at P40. $n = 8$ per experimental group. Student's *t*-test for b-f; and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for g, h. */** $p < 0.05/0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 18). Modified from Pérez-Martín *et al.*, 2021.

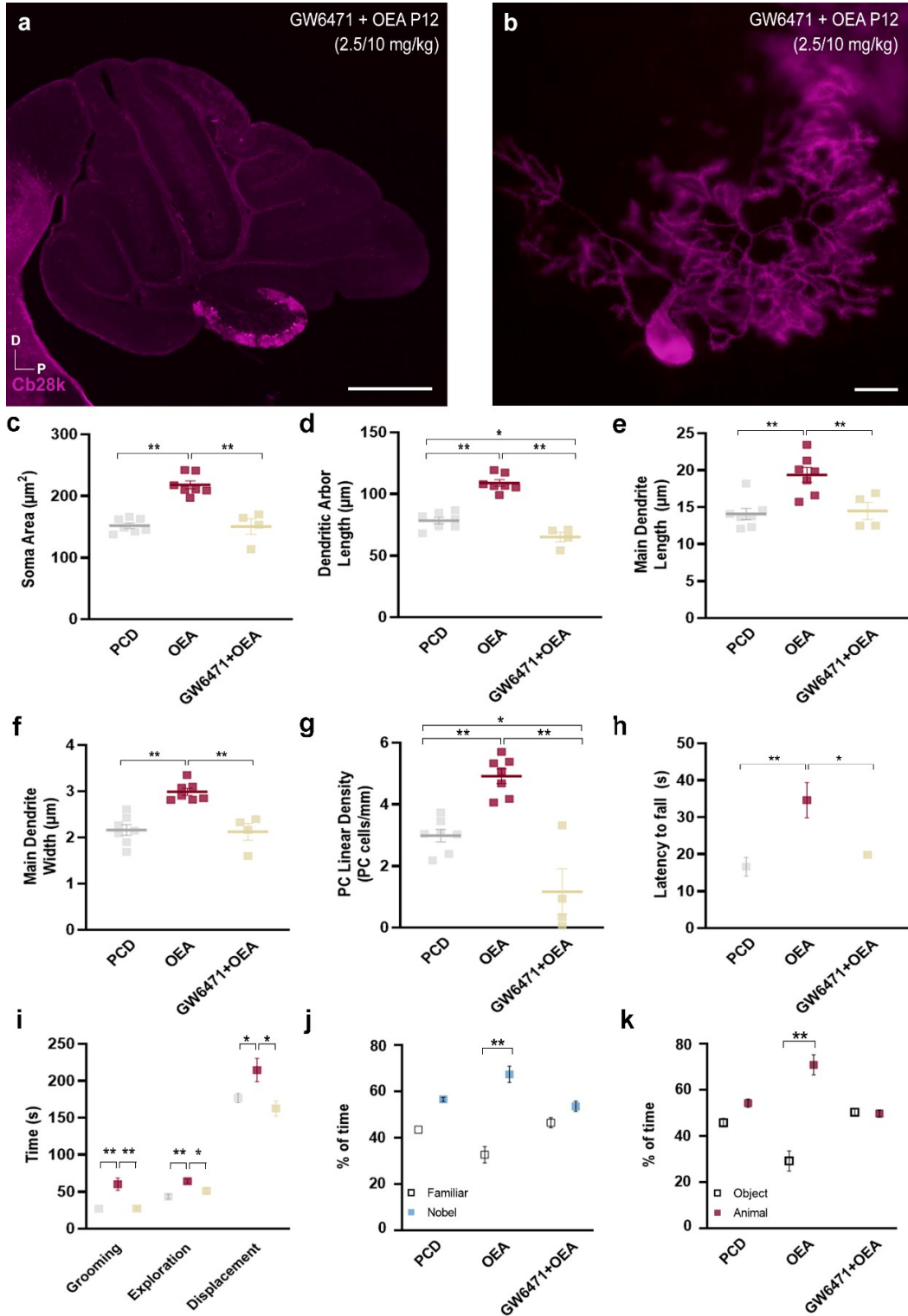


FIGURE S16 | Involvement of PPAR α in the observed effects of OEA in PCD mice at P30. (a, b) Micrographs of cerebellar vermis (a) and a Purkinje cell (b) labeled with calbindin (Cb28k, magenta) of a mouse treated with the PPAR α antagonist GW6471 (2.5 mg/kg, i.p.) and OEA (10 mg/kg, i.p. P12). (c-g) Histological quantification of the effect of GW6471 + OEA on the morphology (c-f) and density (g) of Purkinje cells. (h-k) Motor, cognitive and social analysis of PCD mice treated with GW6471 + OEA. Note that the neuroprotective properties of OEA were abolished when PPAR α was blocked by GW6471. $n = 4-7$ per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for c-i; and Student's *t* test for j, k. $*/** p < 0.05/0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 19 and 20). Scale bar: 500 μm (a), 20 μm (b). D, dorsal; P, posterior. Modified from Pérez-Martín *et al.*, 2021.

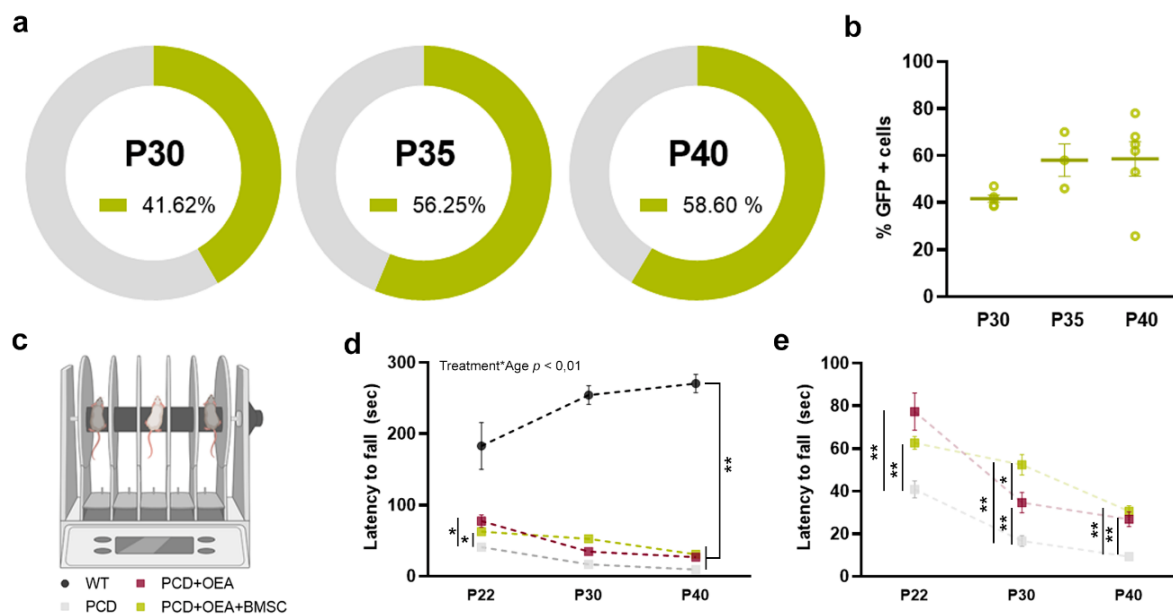


FIGURE S17 | Effect of combined treatment of OEA and BMSC in bone marrow reconstitution and motor behavior of PCD mice. (a, b) Ring-shaped graphical representation (a) and quantification (b) of the total percentage of GFP+ cells in peripheral blood at P30, P35 and P40. Note the trend of progressive increase of transplanted-derived GFP+ cells in the transplanted animals. **(c-e)** Representation (c) and quantification of the rotarod test at different ages for all the experimental groups (d) and excluding WT animals (e). Note that the combined treatment of OEA and BMSC improves motor performance of PCD mice at P30, whereas no differences were found compared to OEA treatment at the other time points. $n = 5-8$ per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test for b, e; and repeated measures ANOVA for d. */** $p < 0.05/0.01$ (specific p -values in Appendix III, 21 and 22).

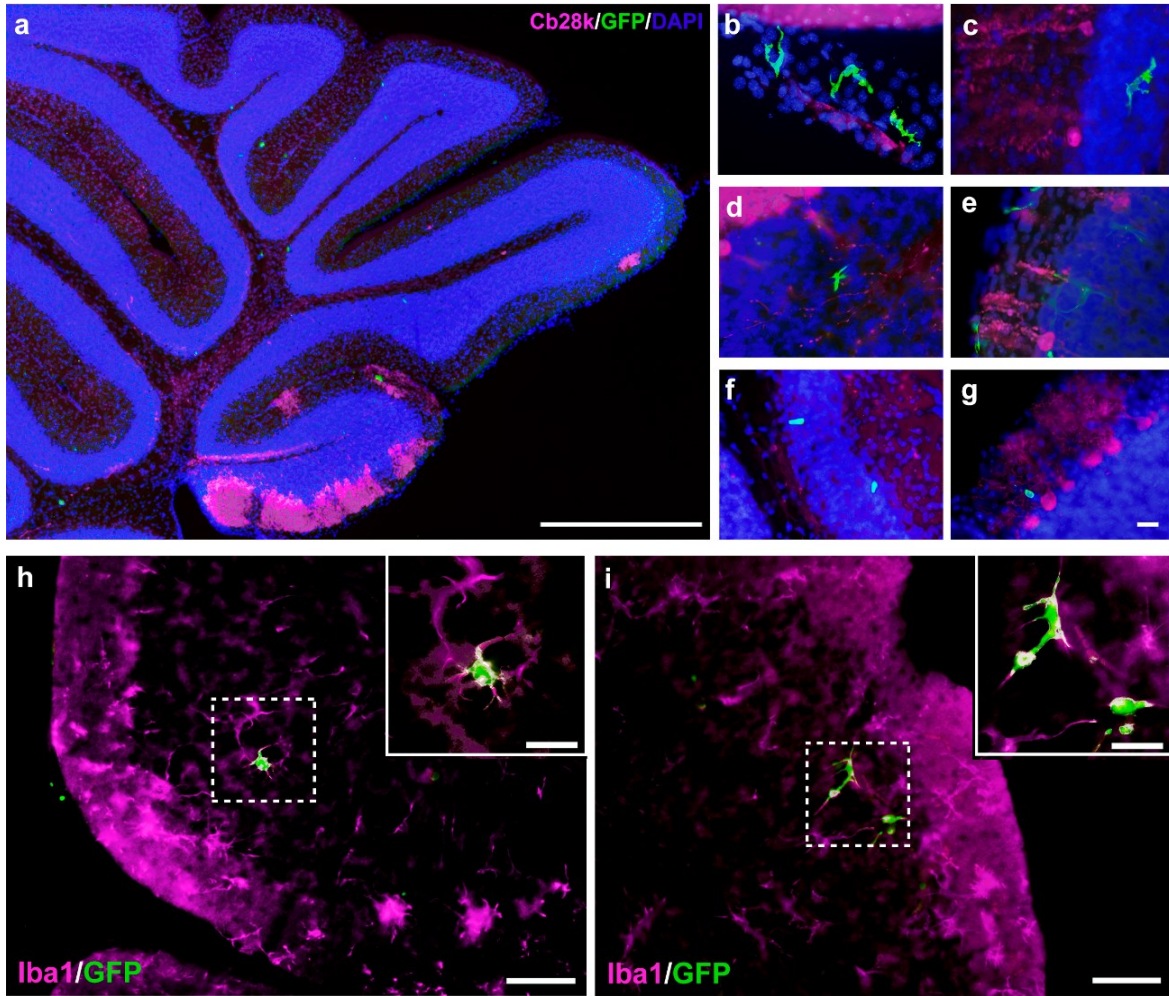


FIGURE S18 | Arrival of transplant-derived cells to the cerebellum of PCD mice. (a, g) Micrographs of GFP+ cells (green) derived from the transplant and calbindin-labeled Purkinje cells (Cb28k, magenta) in cerebellar sections of PCD mice treated with OEA and BMSC; nuclei are counterstained with DAPI (blue). Note that BMSC derived cells show different morphology like microglia/macrophages (b-e) and leukocytes (f, g). (h, i) Micrographs of microglial/macrophages cells (Iba1, magenta) derived from transplant (GFP, green) in the cerebellum of PCD mice treated with OEA and BMSC. The dotted boxes indicate the zoomed inset. n= 5-6 animals. Scale bar: 500 μ m (a), 20 μ m (b-g, zoomed insets of h and i), 50 μ m (h, i).

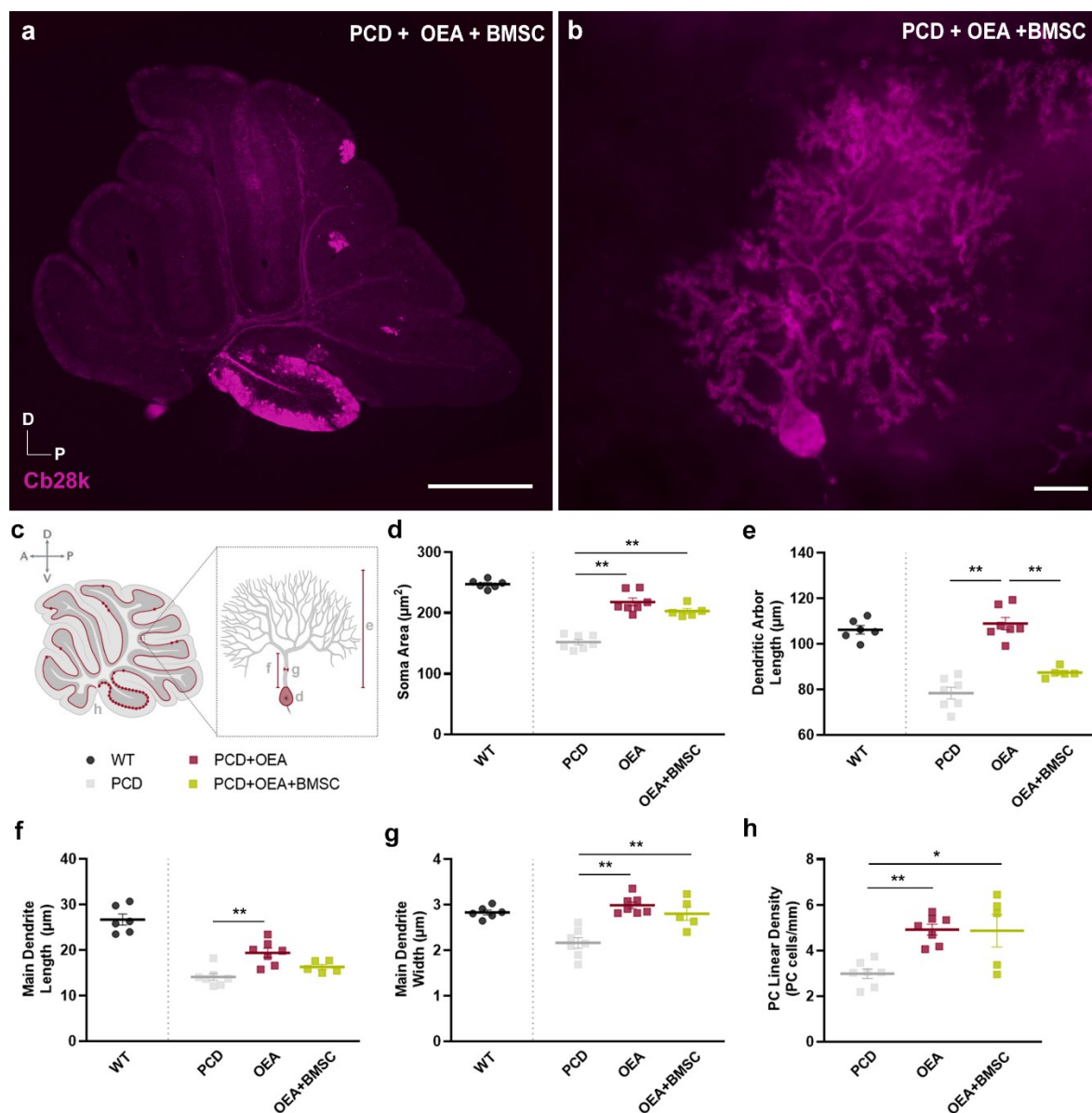


FIGURE S19 | Neuroprotective effect of combined treatment of OEA and BMSC on Purkinje cell morphology and density in PCD mouse at P30. (a-b) Micrographs of PCD cerebellar vermis (a) and Purkinje cell (b) labeled with calbindin (Cb28k, magenta) of PCD mice that received the combined treatment of OEA and BMSC (c-h) Quantification of the effect of combined treatment on Purkinje cells morphology and survival: soma area (d), dendritic arbor length (e), main dendrite length (f) and width (g), and Purkinje cell density (h). Note that combined treatment exerts a partial neuroprotective effect, showing similar results as OEA treatment. However, a deleterious effect was detected in the dendritic arbor length compared to OEA treatment. $n = 5-7$ per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for d-h. */** $p < 0.05/0.01$ (specific p -values in Appendix III, 23). Data from WT animals have been used only as a reference, not to compare. Scale bar: 500 μm (a), 20 μm (b). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral.

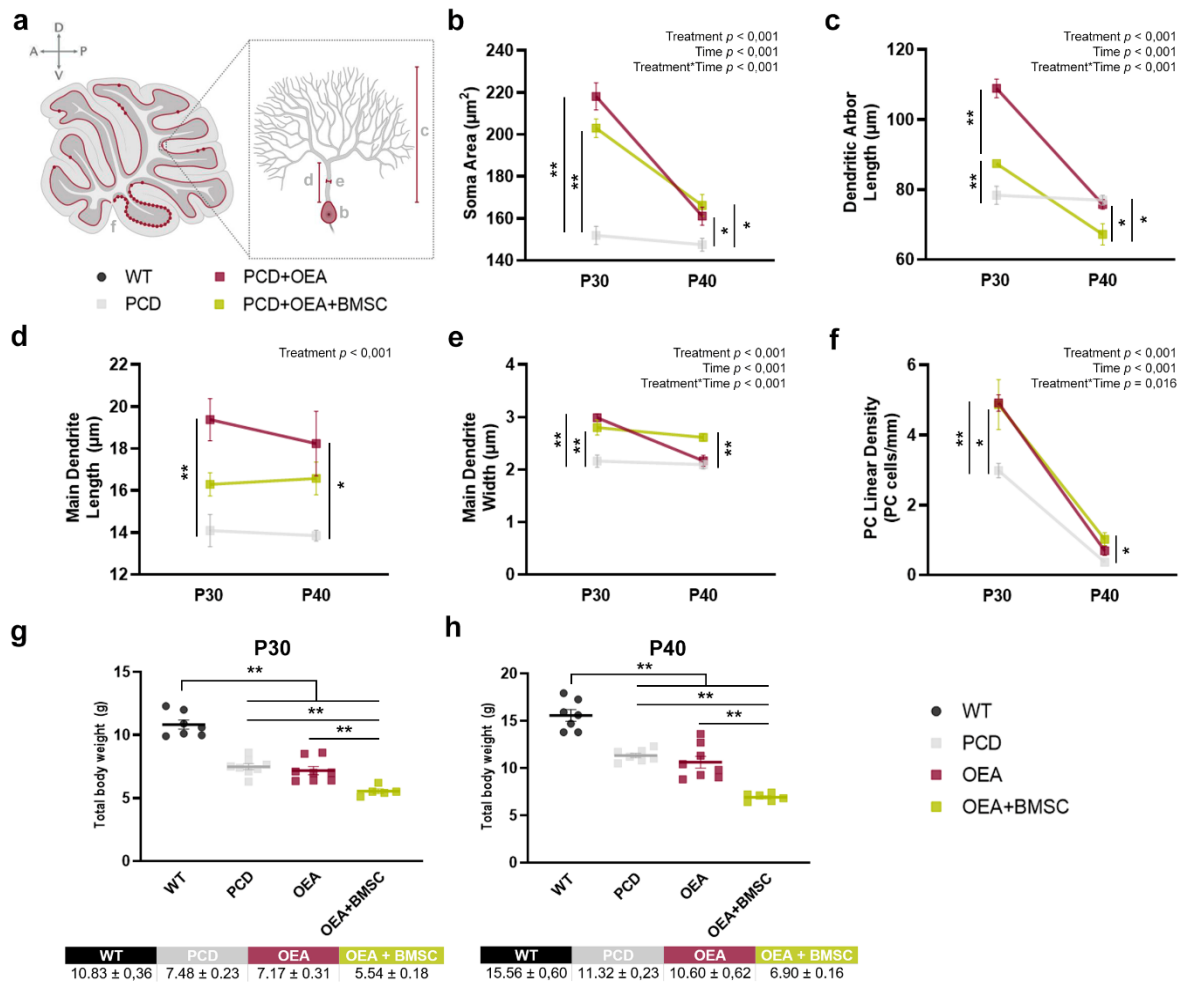


FIGURE S20 | Effect of the combined treatment of OEA and BMSC on Purkinje cell morphology and density in PCD mouse at P40 and on the mouse body weight. (a-f) Quantification of the effect on Purkinje cells morphology and survival at P30 vs. P40: soma area (b), dendritic arbor length (c), main dendrite length (d) and width (e), and Purkinje cell density (f). No noticeable differences were detected between treatments at P40. **(g, h)** Analysis and mean values of body weight of WT, untreated PCD, OEA treated PCD, and OEA+BMSC treated PCD at P30 (g) and P40. A decrease in total body weight was detected in PCD mice treated with OEA and BMSC at P30 and P40. (h). $n = 5-8$ per experimental group. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for b-g; and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for g, h. */** $p < 0.05/0.01$ (specific p -values in Appendix III, 24-26). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral.

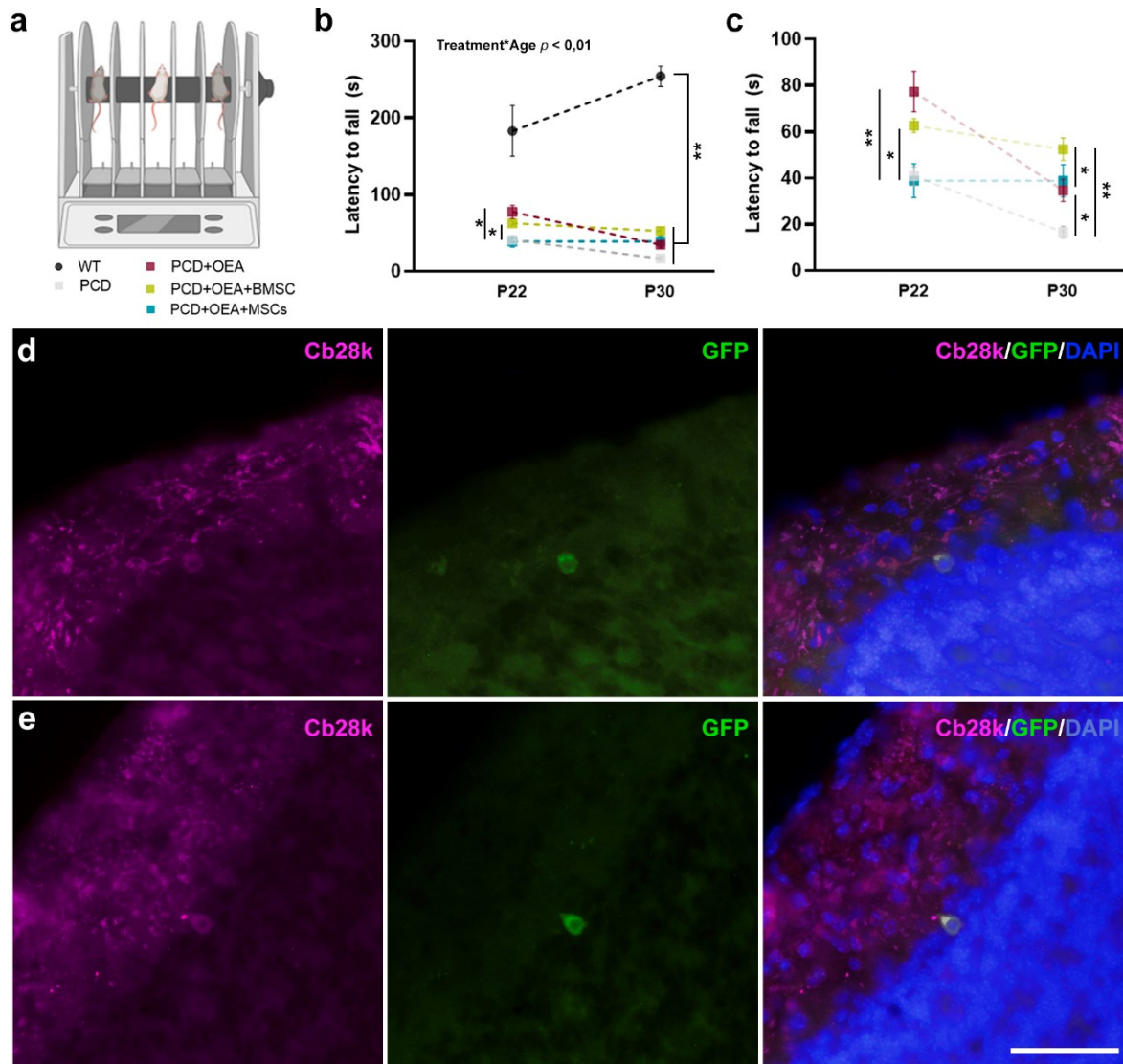


FIGURE S21 | Effect of combined treatment of OEA and MSCs on motor behavior of PCD mice and arrival of MSCs-derived cells to the cerebellum. (a-c) Representation (a) and quantification of the rotarod test at different ages for all the experimental groups (b) and excluding WT animals (c). Note that the combined treatment of OEA and MSCs does not show an improvement in motor performance of PCD mice compared to the other therapeutical approaches assessed. (d, e) Micrographs of GFP+ cells derived from transplant (green) that colocalizing with the soma of calbindin-labeled Purkinje cells (Cb28k, magenta) in sagittal sections of the cerebellum of PCD mice that received the combined treatment of OEA and MSCs; nuclei counterstained with DAPI (blue). Note the aberrant morphology and dendritic arborization of these GFP+ Purkinje cells. $n = 3-6$ per experimental group. Repeated measures ANOVA for b; and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for c. */** $p < 0.05/0.01$ (specific p -values in Appendix III, 27). Scale bar: 50 μm .

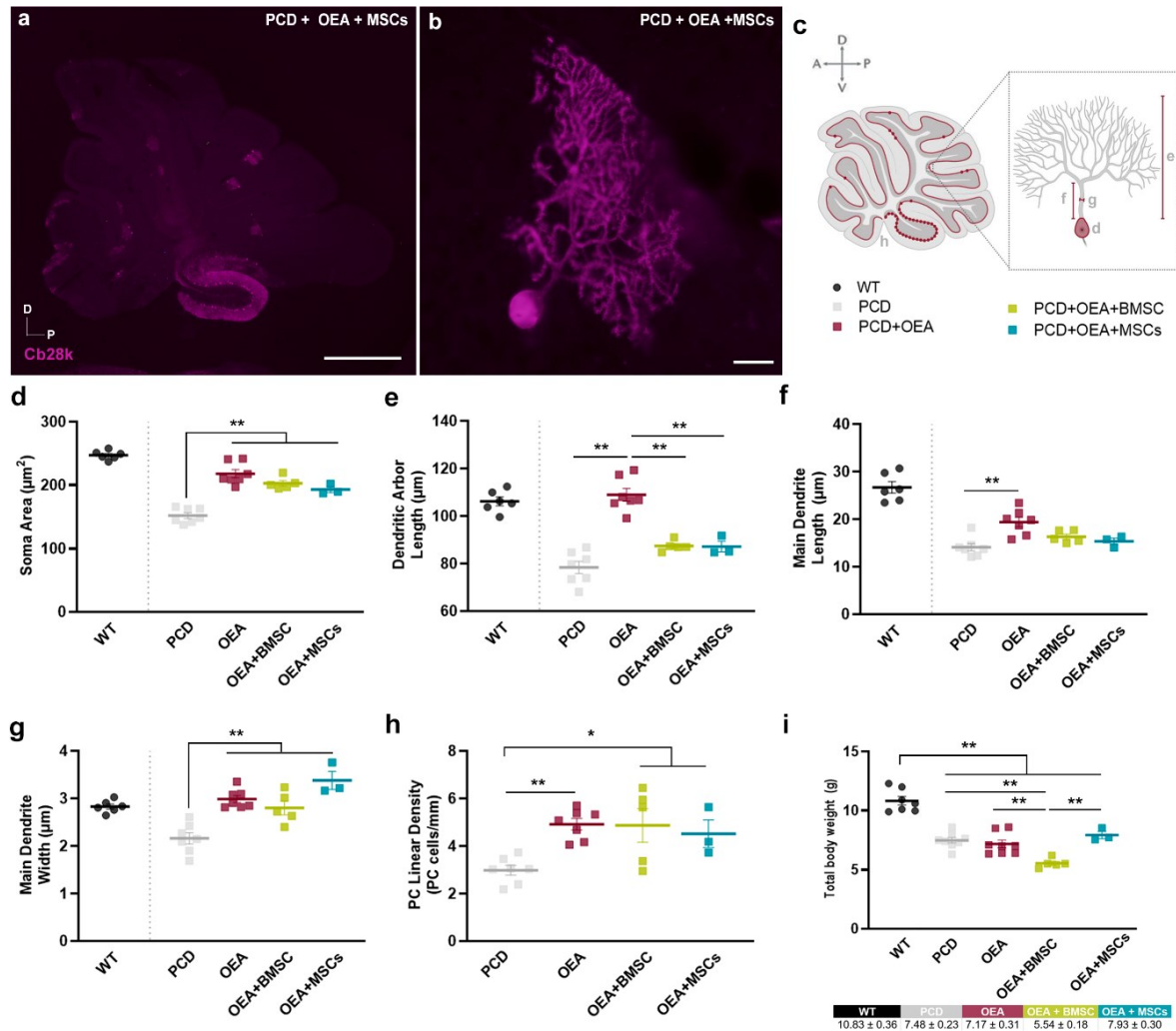


FIGURE S22 | Neuroprotective effect of combined treatment of OEA and BMSC on Purkinje cell morphology and density in PCD mouse and its influence on animal body weight P30. (a-b) Micrographs of PCD cerebellar vermis (a) and Purkinje cell (b) labeled with calbindin (Cb28k, magenta) of PCD mice that received the combined treatment of OEA and MSCs **(c-h)** Quantification of the effect of combined treatment on Purkinje cells morphology (d-g) and density (h). Note that the combination of OEA and MSCs does not exert a greater neuroprotective effect than the other therapeutical approaches evaluated, even showing a deleterious effect in the parameter dendritic arbor length as described in Approach II. **(i)** Analysis and mean values of body weight at P30; unlike OEA + BMSC combined treatment, the combination of OEA and MSCs does not reduce the body weight of treated mice. No negative side effect on body weight was found with Approach III. $n = 3-7$ per experimental group. One-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. $*/** p < 0.05/0.01$ (specific *p*-values in Appendix III, 28 and 29). Data from WT animals have been used only as a reference, not to compare. Scale bar: 500 µm (a), 20 µm (b). A, anterior; D, dorsal; P, posterior; V, ventral.



Bibliografía | *References*

- Altman J, Anderson WJ. 1971. Irradiation of the cerebellum in infant rats with low-level X-ray: histological and cytological effects during infancy and adulthood. *Exp Neurol* 30:492–509.
- Álvarez-Dolado M. 2007. Cell fusion: biological perspectives and potential for regenerative medicine. *Front Biosci* 12:1-12.
- Álvarez-Dolado M, Pardal R, García-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeiffer K, Lois C, Morrison SJ, Álvarez-Buylla A. 2003. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425:968–973.
- Alzheimer Europe. 2019. Dementia in Europe yearbook 2019: estimating the prevalence of dementia in Europe. Alzheimer Europe. URL: https://www.alzheimer-europe.org/sites/default/files/alzheimer_europe_dementia_in_europe_yearbook_2019.pdf
- Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, Budni J, Kim YK. 2020. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. *Life Sci* 257:118020.
- Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, Janowski M. 2021. Mesenchymal stem cells for neurological disorders. *Adv Sci* 8:2002944.
- Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. 2014. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 32:252–260.
- Antón M, Rodríguez-González A, Rodríguez-Rojo IC, Pastor A, Correas Á, Serrano A, Ballesta A, Alén F, Gómez de Heras R, de la Torre R, Rodríguez de Fonseca F, Orio L. 2018. Increased plasma oleoylethanolamide and palmitoleoylethanolamide levels correlate with inflammatory changes in alcohol binge drinkers: the case of HMGB1 in women. *Addict Biol* 23:1242–1250.
- Antunes M, Biala G. 2012. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process* 13:93–110.
- Asal M, Güven S. 2020. Stem cells: sources, properties, and cell types. *Biomaterials Organ and Tissue Regeneration* 177–196.
- Atila E, Ataca Atila P, Demirer T. 2017. A review of myeloablative vs reduced intensity/non-myeloablative regimens in allogeneic hematopoietic stem cell transplantations. *Balkan Med J* 34:1–9.
- Auletta JJ, Devecchio JL, Ferrara JLM, Heinzl FP. 2004. Distinct phases in recovery of reconstituted innate cellular-mediated immunity after murine syngeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:834–847.
- Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. 2018. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol Adv* 36:1111–1126.
- Bae JS, Han HS, Youn DH, Carter JE, Modo M, Schuchman EH, Jin HK. 2007. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells* 25:1307–1316.
- 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.
- 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, Berciano MT, Tapia O, Narcis JO, Lafarga V, Díaz D, Weruaga E, Santos E, Lafarga M. 2019. Nucleolin reorganization and nucleolar stress in Purkinje cells of mutant PCD mice. *Neurobiol Dis* 127:312–322.
- Baltanás FC, Berciano MT, Santos E, Lafarga M. 2021. The childhood-onset neurodegeneration with cerebellar atrophy (CONDCA) disease caused by AGTPBP1 gene mutations: the Purkinje cell degeneration mouse as an animal model for the study of this human disease. *Biomedicines* 9:1157.
- Bartolomei JC, Greer CA. 1998. The organization of piriform cortex and the lateral olfactory tract following the loss of mitral cells in PCD mice. *Exp Neurol* 154:537–550.

- Bäurle J, Helmchen C, Grüsser-Cornehls U. 1997. Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in Purkinje cell degeneration mutant mice: a possible compensatory mechanism. *J Comp Neurol* 596:580–596.
- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452–454.
- Benito C, Tolón RM, Pazos MR, Núñez E, Castillo AI, Romero J. 2008. Cannabinoid CB 2 receptors in human brain inflammation. *Br J Pharmacol* 153:277–285.
- Bento-Abreu A, Taberero 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.
- Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD. 2012. Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α - and β -tubulin. *J Biol Chem* 287:6503–6517.
- Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeras E, Gómez de Heras R, Orió L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F. 2016. Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol* 21:859–872.
- Blanks JC, Mullen RJ, LaVail MM. 1982. Retinal degeneration in the *pcd* cerebellar mutant mouse. II. Electron microscopic analysis. *J Comp Neurol* 212:231–246.
- Blosa M, Bursch C, Weigel S, Holzer M, Jäger C, Janke C, Matthews RT, Arendt T, Morawski M. 2016. Reorganization of synaptic connections and perineuronal nets in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration mutant mice. *Neural Plast* 2016:1–17.
- Bodakuntla S, Schnitzler A, Villablanca C, González-Billault C, Bieche I, Janke C, Magiera MM. 2020. Tubulin polyglutamylation is a general traffic control mechanism in hippocampal neurons. *J Cell Sci* 133: jcs241802.
- Bonaventura G, Munafò A, Bellanca CM, La Cognata V, Iemmolo R, Attaguile GA, Di Mauro R, Di Benedetto G, Cantarella G, Barcellona ML, Cavallaro S, Bernardini R. 2021. Stem cells: innovative therapeutic options for neurodegenerative diseases? *Cells* 10:1992.
- Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Deplanque D, Duriez P, Staels B, Fruchart JC, Bastide M. 2006. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* 34:1341–1346.
- Brahadeeswaran S, Sivagurunathan N, Calivarathan L. 2022. Inflammasome signaling in the aging brain and age-related neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 59:2288–2304.
- Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137:354–366.
- Buitrago M. 2004. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem* 81:211–216.
- Cajal SR. 1909, 1911. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris, Maloine.
- Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, Cuomo V, Astarita G, Fu J, McGaugh JL, Piomelli D. 2009. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci* 106:8027–8031.
- Carrascosa C, Torres-Alemán I, López-López C, Carro E, Espejo L, Torrado S, Torrado JJ. 2004. Microspheres containing insulin-like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials* 25:707–714.
- Carta I, Chen CH, Schott AL, Dorizan S, Khodakhah K. 2019. Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science* 363:eaav0581.
- Casoli T, Di Stefano G, Gracciotti N, Giovagnetti S, Fattoretti P, Solazzi M, Bertoni-Freddari C. 2001. Cellular distribution of GAP-43 mRNA in hippocampus and cerebellum of adult rat brain by in situ RT-PCR. *J Histochem Cytochem* 49:1195–1196.
- Chakrabarti L, Eng J, Ivanov N, Garden GA, La Spada AR. 2009. Autophagy activation and enhanced mitophagy characterize the Purkinje cells of *pcd* mice prior to neuronal death. *Mol Brain* 2:24.
- Chen L, Bao S, Lockard J, Kim J, Thompson R. 1996. Impaired classical eyeblink conditioning in cerebellar-lesioned and Purkinje cell degeneration (*pcd*) mutant mice. *J Neurosci* 16:2829–2838.

- Chen X, Wang S, Cao W. 2018. Mesenchymal stem cell-mediated immunomodulation in cell therapy of neurodegenerative diseases. *Cell Immunol* 326:8–14.
- Chen Z, Trapp BD. 2016. Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 136:10–17.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127:1550–1557.
- Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, Scott EW. 2004. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 363:1432–1437.
- Correia JS, Neves-Carvalho A, Mendes-Pinheiro B, Pires J, Teixeira FG, Lima R, Monteiro S, Silva NA, Soares-Cunha C, Serra SC, Duarte-Silva S, Teixeira-Castro A, Salgado AJ, Maciel P. 2021. Preclinical assessment of mesenchymal-stem-cell-based therapies in spinocerebellar ataxia type 3. *Biomedicines* 9:1754.
- D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. 2012. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid- β 25–35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacology* 37:1784–1792.
- Dantuma E, Merchant S, Sugaya K. 2010. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res Ther* 1:1–7.
- David S, Kroner A. 2011. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* 12:388–399.
- Del Pilar C. 2021. Alteración del sistema inmunitario periférico en un modelo murino de neurodegeneración selectiva: base para terapias con células madre con potencial inmunomodulador. Doctoral Thesis, Universidad de Salamanca.
- Del Pilar C, Lebrón-Galán R, Pérez-Martín E, Pérez-Revuelta L, Ávila-Zarza CA, Alonso JR, Clemente D, Weruaga E, Díaz D. 2021. The selective loss of Purkinje cells induces specific peripheral immune alterations. *Front Cell Neurosci* 15:1–16.
- Delis F, Mitsacos A, Giompres P. 2004. Dopamine receptor and transporter levels are altered in the brain of Purkinje cell degeneration mutant mice. *Neuroscience* 125:255–268.
- Díaz D. 2011. Terapia celular en el sistema nervioso central: recuperación estructural y funcional en un modelo murino de muerte neuronal selectiva. Doctoral Thesis, Universidad de Salamanca.
- Díaz D, Lepousez G, Gheusi G, Alonso JR, Lledo PM, Weruaga E. 2012a. Bone marrow cell transplantation restores olfaction in the degenerated olfactory bulb. *J Neurosci* 32:9053–9058.
- Díaz D, Recio JS, Weruaga E, Alonso JR. 2012b. Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* 21:1595–1602.
- Díaz D, Muñoz-Castañeda R, Alonso JR, Weruaga E. 2015. Bone marrow-derived stem cells and strategies for treatment of nervous system disorders. *Neurosci* 21:637–652.
- Díaz D, Piquer-Gil M, Recio JS, Martínez-Losa MM, Alonso JR, Weruaga E, Álvarez-Dolado M. 2018. Bone marrow transplantation improves motor activity in a mouse model of ataxia. *J Tissue Eng Regen Med* 12:e1950–e1961.
- Díaz D, Pilar C, Carretero J, Alonso JR, Weruaga E. 2019. Daily bone marrow cell transplantations for the management of fast neurodegenerative processes. *J Tissue Eng Regen Med* 13:1702–1711.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
- Dugger BN, Dickson DW. 2017. Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9:a028035.
- Duran-Struuck R, Dysko RC. 2009. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48:11–22.
- Edalatmanesh MA, Bahrami AR, Hosseini E, Hosseini M, Khatamsaz S. 2011. Bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation in cerebellar degeneration: a behavioral study. *Behav Brain Res* 225:63–70.
- Ennaceur A. 2010. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 215:244–254.

- 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.
- Espejel S, Romero R, Álvarez-Buylla A. 2009. Radiation damage increases Purkinje neuron heterokaryons in neonatal cerebellum. *Ann Neurol* 66:100–109.
- Etienne W, Meyer MH, Peppers J, Meyer RA. 2004. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *Biotechniques* 36:618–626.
- F**edele S, Arnold M, Krieger JP, Wolfstädter B, Meyer U, Langhans W, Mansouri A. 2018. Oleylethanolamide-induced anorexia in rats is associated with locomotor impairment. *Physiol Rep* 6:e13517.
- Fernández-González A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI, Zuo J. 2002. Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science* 295:1904–1906.
- Ferro A, Auguste YSS, Cheadle L. 2021. Microglia, cytokines, and neural Activity: unexpected interactions in brain development and function. *Front Immunol* 12:1–14.
- Fidaleo M, Fanelli F, Ceru M, Moreno S. 2014. Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and its lipid ligands. *Curr Med Chem* 21:2803–2821.
- Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS. 2009. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev* 18:683–692.
- Ford GD, Ford BD, Steele EC, Gates A, Hood D, Matthews MAB, Mirza S, MacLeish PR. 2008. Analysis of transcriptional profiles and functional clustering of global cerebellar gene expression in *PCD^{3J}* mice. *Biochem Biophys Res Commun* 377:556–561.
- Franklin KBJ, Paxinos G. 2008. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd Edition, San Diego, Academic Press.
- Fremont R, Tewari A, Khodakhah K. 2015. Aberrant Purkinje cell activity is the cause of dystonia in a shRNA-based mouse model of rapid onset dystonia–parkinsonism. *Neurobiol Dis* 82:200–212.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif* 3:393–403.
- Fu H, Hardy J, Duff KE. 2018. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 21:1350–1358.
- 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 J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. 2005. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* 48:1147–1153.
- Fuchs E, Tumber T, Guasch G. 2004. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116:769–778.
- G**alán-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.
- Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Díaz-Alonso J, Bari M, Guzmán M, Maccarrone M. 2013. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lipid Res* 52:633–650.
- Gardette R, Alvarado-Mallart RM, Crepel F, Sotelo C. 1988. Electrophysiological demonstration of a synaptic integration of transplanted Purkinje cells into the cerebellum of the adult Purkinje cell degeneration mutant mouse. *Neuroscience* 24:777–789.
- Gezen-Ak D, Dursun E, Hanağası H, Bilgiç B, Lohman E, Araz ÖS, Atasoy İL, Alaylıoğlu M, Önal B, Gürvit H, Yilmazer S. 2013. BDNF, TNF α , HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment. *J Alzheimer's Dis* 37:185–195.
- Ghetti B, Norton J, Triarhou LC. 1987. Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of "Purkinje cell degeneration" mutant mice. *J Comp Neurol* 260:409–422.

- Ghetti B, Perry KW, Fuller RW. 1988. Serotonin concentration and turnover in cerebellum and other brain regions of *pcd* mutant mice. *Brain Res* 458:367–371.
- Gilmore-Hall S, Kuo J, Ward JM, Zahra R, Morrison RS, Perkins G, La Spada AR. 2019. CCP1 promotes mitochondrial fusion and motility to prevent Purkinje cell neuron loss in *pcd* mice. *J Cell Biol* 218:206–219.
- Goni R, García P, Foissac S. 2009. The qPCR data statistical analysis. *Integromics White Pap* 1:1–9.
- González-Aparicio R, Moratalla R. 2014. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 62:416–425.
- 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 oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:455–468.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183:1797–1806.
- Goodlett CR, Hamre KM, West JR. 1992. Dissociation of spatial navigation and visual guidance performance in Purkinje cell degeneration (*pcd*) mutant mice. *Behav Brain Res* 47:129–141.
- 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.
- Grillo MA. 1970. Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J Cell Biol* 45:100–117.
- Grüsser-Cornehls U, Bäurle J. 2001. Mutant mice as a model for cerebellar ataxia. *Prog Neurobiol* 63:489–540.
- Guan Z, Fang J. 2006. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun* 20:64–71.
- Guida F, Luongo L, Boccella S, *et al.* 2017. Palmitoylethanolamide induces microglia changes associated with increased migration and phagocytic activity: involvement of the CB2 receptor. *Sci Rep* 7:375.
- 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 α (PPAR- α). *J Biol Chem* 279:27849–27854.
- Guzmán-Martínez L, Maccioni RB, Andrade V, Navarrete LP, Pastor MG, Ramos-Escobar N. 2019. Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol* 10:1–17.
- Handel MA, Dawson M. 1981. Effects on spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutation, Purkinje cell degeneration. *Gamete Res* 4:185–192.
- Hansen HS. 2010. Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Exp Neurol* 224:48–55.
- 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.
- Hassan HT, El-Sheemy M. 2004. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *JRSM* 97:465–471.
- Häusser M, Clark BA. 1997. Tonic synaptic inhibition modulates neuronal output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19:665–678.
- Heneka MT, McManus RM, Latz E. 2018. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 19:610–621.
- Henry RJ, Kerr DM, Flannery LE, Killilea M, Hughes EM, Corcoran L, Finn DP, Roche M. 2017. Pharmacological inhibition of FAAH modulates TLR-induced neuroinflammation, but not sickness behaviour: an effect partially mediated by central TRPV1. *Brain Behav Immun* 62:318–331.

- Herrera M, Romero J, Rodríguez de Fonseca F, Blanco E, Capani F. 2014. Behavioral effect of oleylethanolamide on perinatal asphyxia. *J Adv Neurosci Res* 1:22–26.
- Herrera M, Kölliker-Frers R, Barreto G, Blanco E, Capani F. 2016. Glial modulation by N-acylethanolamides in brain injury and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 8:1–10.
- Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. 2018. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci* 21:1359–1369.
- Hidalgo A. 2008. Hematopoietic stem cell homing: the long, winding and adhesive road to the bone marrow. *Inmunología* 27:22–35.
- Hind WH, Tufarelli C, Neophytou M, Anderson SI, England TJ, O'Sullivan SE. 2015. Endocannabinoids modulate human blood-brain barrier permeability in vitro. *Br J Pharmacol* 172:3015–3027.
- Hoebeek FE, Khosrovani S, Witter L, De Zeeuw CI. 2008. Purkinje cell input to cerebellar nuclei in tottering: ultrastructure and physiology. *The Cerebellum* 7:547–558.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, Culliford D, Perry VH. 2009. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* 73:768–774.
- Holubiec MI, Romero JI, Suárez J, Portavella M, Fernández-Espejo E, Blanco E, Galeano P, Rodríguez de Fonseca F. 2018. Palmitoylethanolamide prevents neuroinflammation, reduces astrogliosis and preserves recognition and spatial memory following induction of neonatal anoxia-ischemia. *Psychopharmacology* 235:2929–2945.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7:393–395.
- Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, Bohr VA. 2019. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15:565–581.
- Huda F, Fan Y, Suzuki M, Konno A, Matsuzaki Y, Takahashi N, Chan JKY, Hirai H. 2016. Fusion of human fetal mesenchymal stem cells with “degenerating” cerebellar neurons in spinocerebellar ataxia type 1 model mice. *PLoS One* 11:e0164202.
- 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. *J Biol Chem* 271:10834–10843.
- Ito M. 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78:272–303.
- Janelins MC, Mastrangelo MA, Oddo S, LaFerla FM, Federoff HJ, Bowers WJ. 2005. Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor- α and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 2:23.
- Jiang S, Fu Y, Avraham HK. 2011. Regulation of hematopoietic stem cell trafficking and mobilization by the endocannabinoid system. *Transfusion* 51:65S–71S.
- Jones J, Jaramillo-Merchán J, Bueno C, Pastor D, Viso-León M, Martínez S. 2010. Mesenchymal stem cells rescue Purkinje cells and improve motor functions in a mouse model of cerebellar ataxia. *Neurobiol Dis* 40:415–423.
- Joshi U, Evans JE, Joseph R, Emmerich T, Saltiel N, Lungmus C, Oberlin S, Langlois H, Ojo J, Mouzon B, Paris D, Mullan M, Jin C, Klimas N, Sullivan K, Crawford F, Abdullah L. 2018. Oleylethanolamide treatment reduces neurobehavioral deficits and brain pathology in a mouse model of Gulf War Illness. *Sci Rep* 8:12921.
- Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. 2020. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front Cell Neurosci* 14:1–18.
- Kainu T, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Pelto-Huikko M. 1994. Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain. *Neuroreport* 5:2481–2485.
- Kalinina E, Biswas R, Berezniuk I, Hermoso A, Aviles FX, Flicker LD. 2007. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J* 21:836–850.
- Kano M, Watanabe T. 2019. Developmental synapse remodeling in the cerebellum and visual thalamus. *F1000Research* 8:1191.
- Karakaya M, Paketci C, Altmueller J, Thiele H, Hoelker I, Yis U, Wirth B. 2019. Biallelic variant in AGTPBP1 causes infantile lower motor neuron degeneration and cerebellar atrophy. *Am J Med Genet Part A* 179:ajmg.a.61198.

- Karp JM, Leng Teo GS. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4:206–216.
- Kavetsky L, Green KK, Boyle BR, Yousufzai FAK, Padron ZM, Melli SE, Kuhnel VL, Jackson HM, Blanco RE, Howell GR, Soto I. 2019. Increased interactions and engulfment of dendrites by microglia precede Purkinje cell degeneration in a mouse model of Niemann Pick type-C. *Sci Rep* 9:14722.
- Kemp KC, Gordon D, Wraith DC, Mallam E, Hartfield E, Uney J, Wilkins A, Scolding N. 2011. Fusion between human mesenchymal stem cells and rodent cerebellar Purkinje cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:166–178.
- Kemp KC, Dey R, Verhagen J, Scolding NJ, Urowicz MM, Wilkins A. 2018a. Aberrant cerebellar Purkinje cell function repaired in vivo by fusion with infiltrating bone marrow-derived cells. *Acta Neuropathol* 135:907–921.
- Kemp KC, Hares K, Redondo J, Cook AJ, Haynes HR, Burton BR, Pook MA, Rice CM, Scolding NJ, Wilkins A. 2018b. Bone marrow transplantation stimulates neural repair in Friedreich's ataxia mice. *Ann Neurol* 83:779–793.
- Kerr DM, Burke NN, Ford GK, Connor TJ, Harhen B, Egan LJ, Finn DP, Roche M. 2012. Pharmacological inhibition of endocannabinoid degradation modulates the expression of inflammatory mediators in the hypothalamus following an immunological stressor. *Neuroscience* 204:53–63.
- Kim N, Xiao R, Choi H, Jo H, Kim JH, Uhm SJ, Park C. 2011. Abnormal sperm development in *pcd^{3J}/-* mice: the importance of *Agtbp1* in spermatogenesis. *Mol Cells* 31:39–48.
- Kim SR, Kim SU, Oh U, Jin BK. 2006. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates microglial cell death in vivo and in vitro via Ca^{2+} -mediated mitochondrial damage and cytochrome c release. *J Immunol* 177:4322–4329.
- Koch A, Gulani J, King G, Hieber K, Chappell M, Ossetrova N. 2016. Establishment of early endpoints in mouse total-body irradiation model. *PLoS One* 11:e0161079.
- Kozera B, Rapacz M. 2013. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54:391–406.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312–318.
- Kwon HS, Koh SH. 2020. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9:42.
- Kyuhou S, Kato N, Gemba H. 2006. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci Lett* 396:91–96.
- Lainé J, Axelrad H. 1994. The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol* 339:159–173.
- Lalonde R, Strazielle C. 2003. The effects of cerebellar damage on maze learning in animals. *The Cerebellum* 2:300–309.
- Lalonde R, Strazielle C. 2019. Motor performances of spontaneous and genetically modified mutants with cerebellar atrophy. *The Cerebellum* 18:615–634.
- Lalonde R, Strazielle C. 2022. The *AGTPBP1* gene in neurobiology. *Gene* 809:146001.
- Landis SC, Mullen RJ. 1978. The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J Comp Neurol* 177:125–143.
- Lapchak PA, Araujo DM, Hefti F. 1993. Systemic interleukin-1 β decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 53:297–301.
- Le Marec N, Lalonde R. 1997. Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res* 768:310–316.
- Li J, Gu X, Ma Y, Calicchio ML, Kong D, Teng YD, Yu L, Crain AM, Vartanian TK, Pasqualini R, Arap W, Libermann TA, Snyder EY, Sidman RL. 2010. *Nna1* mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF- κ B signaling. *Neuron* 68:45–60.
- Li J, Snyder EY, Tang FHF, Pasqualini R, Arap W, Sidman RL. 2020. *Nna1* gene deficiency triggers Purkinje neuron death by tubulin hyperglutamylation and ER dysfunction. *JCI Insight* 5:e136078.
- Liberman AC, Trias E, da Silva Chagas L, Trindade P, dos Santos Pereira M, Refojo D, Hedin-Pereira C, Serfaty CA. 2018. Neuroimmune and inflammatory signals in complex disorders of the central nervous system. *Neuroimmunomodulation* 25:246–270.

- Lima Giacobbo B, Doorduyn J, Klein HC, Dierckx RAJO, Bromberg E, de Vries EFJ. 2019. Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 56:3295–3312.
- Lindvall O, Kokaia Z. 2010. Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation? *J Clin Invest* 120:29–40.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. 2005. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67:15–19.
- Luo D, Zhang Y, Yuan X, Pan Y, Yang L, Zhao Y, Zhuo R, Chen C, Peng L, Li W, Jin X, Zhou Y. 2019. Oleoylethanolamide inhibits glial activation via modulating PPAR α and promotes motor function recovery after brain ischemia. *Pharmacol Res* 141:530–540.
- M**achado AS, Marques HG, Duarte DF, Darmohray DM, Carey MR. 2020. Shared and specific signatures of locomotor ataxia in mutant mice. *eLife* 9:1–18.
- Magiera MM, Bodakuntla S, Žiak J, Lacomme S, Marques Sousa P, Leboucher S, Hausrat TJ, Bosc C, Andrieux A, Kneussel M, Landry M, Calas A, Balastik M, Janke C. 2018. Excessive tubulin polyglutamylolation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *EMBO J* 37:e100440.
- Magrassi L, Grimaldi P, Ibatci A, Corselli M, Ciardelli L, Castello S, Podesta M, Frassoni F, Rossi F. 2007. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J Neurosci* 27:9885–9892.
- Majbour NK, Aasly JO, Hustad E, Thomas MA, Vaikath NN, Elkum N, Van de Berg WDJ, Tokuda T, Mollenhauer B, Berendse HW, El-Agnaf OMA. 2020. CSF total and oligomeric α -Synuclein along with TNF- α as risk biomarkers for Parkinson's disease: a study in LRRK2 mutation carriers. *Transl Neurodegener* 9:15.
- Manto M, Bower JM, Conforto AB, *et al.* 2012. Consensus Paper: Roles of the cerebellum in motor control—the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *The Cerebellum* 11:457–487.
- Marchena M, Lara J, Aijón J, Germain F, de la Villa P, Velasco A. 2011. The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res* 93:607–617.
- Martin KB, Williams IM, Cluzeau CV, Coughnoux A, Dale RK, Iben JR, Cawley NX, Wassif CA, Porter FD. 2019. Identification of novel pathways associated with patterned cerebellar Purkinje neuron degeneration in Niemann-Pick disease, type C1. *Int J Mol Sci* 21:292.
- Matsuura S, Shuvaev AN, Iizuka A, Nakamura K, Hirai H. 2014. Mesenchymal stem cells ameliorate cerebellar pathology in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *The Cerebellum* 13:323–330.
- Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S. 2009. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR- α nuclear receptors. *Learn Mem* 16:332–337.
- Mecha M, Carrillo-Salinas FJ, Feliú A, Mestre L, Guaza C. 2016. Microglia activation states and cannabinoid system: therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 166:40–55.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779–1782.
- Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. 2017. Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges. *Front Cell Neurosci* 11:1–36.
- Mimeault M, Batra SK. 2006. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24:2319–2345.
- Minghetti L. 2007. Role of COX-2 in inflammatory and degenerative brain diseases. *Subcellular Biochemistry* 127–141.
- Mirza R, Sharma B. 2018. Selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects propionic acid induced autism-like phenotypes in rats. *Life Sci* 214:106–117.
- Moattari M, Moattari M, Kaka G, Kouchesfahani HM, Sadraie SH, Naghdi M. 2018. Comparison of neuroregeneration in central nervous system and peripheral nervous system. *Otorhinolaryngol Neck Surg* 3:1–3.

Mohty M, Malard F, Savani BN. 2015. High-dose total body irradiation and myeloablative conditioning before allogeneic hematopoietic cell transplantation: time to rethink? *Biol Blood Marrow Transplant* 21:620–624.

Moravan MJ, Olschowka JA, Williams JP, O'Banion MK. 2011. Cranial irradiation leads to acute and persistent neuroinflammation with delayed increases in T-cell infiltration and CD11c expression in C57BL/6 mouse brain. *Radiat Res* 176:459–473.

Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 8:175–193.

Mota Rodríguez ANJ. 2019. Caracterización de células madre mesenquimales de médula ósea de ratón modificadas con el factor neuroprotector IGF-1. Master Final Project, Universidad de Salamanca.

Moy SS, Nadler JJ, Pérez A, Bárbaro 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.

Moya M, San Felipe D, Ballesta A, Alén F, Rodríguez de Fonseca F, García-Bueno B, Marco EM, Orió L. 2021. Cerebellar and cortical TLR4 activation and behavioral impairments in Wernicke-Korsakoff syndrome: pharmacological effects of oleoylethanolamide. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 108:110190.

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

Muñoz-Castañeda R. 2015. Plasticidad neural en el cerebelo: análisis del sistema endocannabinoide en el ratón PCD. Doctoral Thesis, Universidad de Salamanca.

Muñoz-Castañeda R, Díaz D, Peris L, Andrieux A, Bosc C, Muñoz-Castañeda JM, Janke C, Alonso JR, Moutin MJ, Weruaga E. 2018. Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors. *Sci Rep* 8:3072.

Muñoz-Eliás G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. 2004. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J Neurosci* 24:4585–4595.

Muzio L, Viotti A, Martino G. 2021. Microglia in neuroinflammation and neurodegeneration: from understanding to therapy. *Front Neurosci* 15:742065.

Nakamura K, Mieda T, Suto N, Matsuura S, Hirai H. 2015. Mesenchymal stem cells as a potential therapeutic tool for spinocerebellar ataxia. *The Cerebellum* 14:165–170.

Nam Y, Yoon D, Hong J, Kim MS, Lee TY, Kim KS, Lee HW, Suk K, Kim SR. 2020. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells in a mouse model of cerebellar ataxia with neuroinflammation. *J Clin Med* 9:3654.

Nern C, Wolff I, Macas J, Von Randow J, Scharenberg C, Priller J, Momma S. 2009. Fusion of hematopoietic cells with Purkinje neurons does not lead to stable heterokaryon formation under noninvasive conditions. *J Neurosci* 29:3799–3807.

O'Gorman S. 1985. Degeneration of thalamic neurons in Purkinje cell degeneration mutant mice. II. Cytology of neuron loss. *J Comp Neurol* 234:298–316.

O'Sullivan SE. 2016. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Br J Pharmacol* 173:1899–1910.

Ogawa K, Yagi T, Guo T, Takeda K, Ohguchi H, Koyama H, Aotani D, Imaeda K, Kataoka H, Tanaka T. 2020. Pemafibrate, a selective PPAR α modulator, and fenofibrate suppress microglial activation through distinct PPAR α and SIRT1-dependent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 524:385–391.

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol* 173:649–665.

Orió L, Alén F, Pavón FJ, Serrano A, García-Bueno B. 2019. Oleoylethanolamide, neuroinflammation, and alcohol abuse. *Front Mol Neurosci* 11:1–21.

Otazo MRV, Lorenzo J, Tort O, Avilés FX, Bautista JM. 2013. Functional segregation and emerging role of cilia-related cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *FASEB J* 27:424–431.

Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E. 2006. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis* 22:257–264.

- Peferoen L, Kipp M, Van der Valk P, Van Noort JM, Amor S. 2014. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology* 141:302–313.
- Pérez-Martín E, Muñoz-Castañeda R, Moutin MJ, Ávila-Zarza CA, Muñoz-Castañeda JM, Del Pilar C, Alonso JR, Andrieux A, Díaz D, Weruaga E. 2021. Oleoylethanolamide delays the dysfunction and death of Purkinje cells and ameliorates behavioral defects in a mouse model of cerebellar neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 18:1748–1767.
- Pfaffl M. 2004. A-Z of quantitative PCR., La Jolla, International University Line.
- Plaza-Zabala A, Berrendero F, Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Fernández-Espejo E, Serrano A, Pavón FJ, Parsons LH, Rodríguez de Fonseca F, Maldonado R, Robledo P. 2010. Effects of the endogenous PPAR α agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice. *Synapse* 64:379–389.
- Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. 2001. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 155:733–738.
- Profaci CP, Munji RN, Pulido RS, Daneman R. 2020. The blood-brain barrier in health and disease: important unanswered questions. *J Exp Med* 217:1–16.
- Ralcewicz TA, Persaud TVN. 1995. Effects of prenatal exposure to low dose ionizing radiation on the development of the cerebellar cortex in the rat. *Histol Histopathol* 10:371–383.
- Rani B, Santangelo A, Romano A, Koczwara JB, Friuli M, Provensi G, Blandina P, Casarrubea M, Gaetani S, Passani MB, Costa A. 2021. Brain histamine and oleoylethanolamide restore behavioral deficits induced by chronic social defeat stress in mice. *Neurobiol Stress* 14:100317.
- Ransohoff RM, Schafer D, Vincent A, Blachère NE, Bar-Or A. 2015. Neuroinflammation: ways in which the immune system affects the brain. *Neurotherapeutics* 12:896–909.
- Recio JS. 2008. Trasplante de médula ósea e identificación de sus derivados neurales en un modelo animal con neurodegeneración selectiva, el ratón mutante PCD. Aproximación a la terapia regenerativa con células madre adultas. Doctoral Thesis, Universidad de Salamanca.
- Recio JS, Weruaga E, Gómez C, Valero J, Briñón JG, Alonso JR. 2007. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J Neurosci Res* 85:2407–2421.
- Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, Baltanás FC, Piquer-Gil M, Alonso JR, Weruaga E. 2011. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant* 20:1179–1192.
- Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV. 2013 New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci* 7:1–11.
- Río-Hortega P. 1919. El “tercer elemento de los centros nerviosos”. IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol Soc Esp Biol* 8:155–166.
- Rivera P, Fernández-Arjona M, Silva-Peña D, Blanco E, Vargas A, López-Ávalos MD, Grondona JM, Serrano A, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. 2018. Pharmacological blockade of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by URB597 improves memory and changes the phenotype of hippocampal microglia despite ethanol exposure. *Biochem Pharmacol* 157:244–257.
- Rivera P, Silva-Peña D, Blanco E, Vargas A, Arrabal S, Serrano A, Pavón FJ, Bindila L, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. 2019. Oleoylethanolamide restores alcohol-induced inhibition of neuronal proliferation and microglial activity in striatum. *Neuropharmacology* 146:184–197.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. 2001. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 414:209–212.
- 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.
- Roy A, Jana M, Corbett GT, Ramaswamy S, Kordower JH, González FJ, Pahan K. 2013. Regulation of cyclic AMP response element binding and hippocampal plasticity-related genes by peroxisome proliferator-activated receptor α . *Cell Rep* 4:724–737.
- Russel WMS, Burch RL. 1959. The principles of humane experimental technique. London, Methuen and Co.

- Sailor KA, Agoranos G, López-Manzaneda S, Tada S, Gillet-Legrand B, Guerinot C, Masson JB, Vestergaard CL, Bonner M, Gagnidze K, Veres G, Lledo PM, Cartier N. 2022. Hematopoietic stem cell transplantation chemotherapy causes microglia senescence and peripheral macrophage engraftment in the brain. *Nat Med* 28:517–527.
- Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. 2011. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* 116:1–9.
- Sakthiswary R, Raymond AA. 2012. Stem cell therapy in neurodegenerative diseases: from principles to practice. *Neural Regen Res* 7:1822–1831.
- Salomova M, Tichanek F, Jelinkova D, Cendelin J. 2020. Abnormalities in the cerebellar levels of trophic factors BDNF and GDNF in *pcd* and *lurcher* cerebellar mutant mice. *Neurosci Lett* 725:134870.
- Salter MW, Stevens B. 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23:1018–1027.
- Sánchez-Ramos J, Song S, Cao C, Arendash G. 2008. The potential of hematopoietic growth factors for treatment of Alzheimer's disease: a mini-review. *BMC Neurosci* 9:S3.
- Sanz-Gallego I, Rodríguez-de-Rivera FJ, Pulido I, Torres-Aleman I, Arpa J. 2014. IGF-1 in autosomal dominant cerebellar ataxia-open-label trial. *Cerebellum Ataxias* 1:13.
- Sathyanesan A, Zhou J, Scafidi J, Heck DH, Sillitoe RV, Gallo V. 2019. Emerging connections between cerebellar development, behaviour and complex brain disorders. *Nat Rev Neurosci* 20:298–313.
- Sayd A, Antón M, Alén F, Caso JR, Pavón J, Leza JC, Rodríguez de Fonseca F, García-Bueno B, Orio L. 2015. Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and anhedonia induced by LPS in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 18:pyu111.
- 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.
- Schönfeld LM, Dooley D, Jahanshahi A, Temel Y, Hendrix S. 2017. Evaluating rodent motor functions: which tests to choose? *Neurosci Biobehav Rev* 83:298–312.
- Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP. 2007. Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc* 39:573–576.
- Schwartz M, Baruch K. 2014. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J* 33:7–22.
- Shashi V, Magiera MM, Klein D, *et al.* 2018. Loss of tubulin deglutamylation CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *EMBO J* 37:e100540.
- Sheffer R, Gur M, Brooks R, Salah S, Daana M, Fraenkel N, Eisenstein E, Rabie M, Nevo Y, Jalas C, Elpeleg O, Edvardson S, Harel T. 2019. Biallelic variants in AGTPBP1, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy. *Eur J Hum Genet* 27:1419–1426.
- Shih RH, Wang CY, Yang CM. 2015. NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: a mini review. *Front Mol Neurosci* 8:1–8.
- Shimomura O. 2005. Discovery of green fluorescent protein. *Methods of Biochemical Analysis* 1–13.
- Sierra A, De Castro F, Del Río-Hortega J, Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. 2016. The “Big-Bang” for modern glial biology: translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64:1801–1840.
- Sillitoe RV, Joyner AL. 2007. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:549–577.
- Silva-Peña D, Rivera P, Alén F, Vargas A, Rubio L, García-Marchena N, Pavón FJ, Serrano A, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. 2019. Oleoylethanolamide modulates BDNF-ERK signaling and neurogenesis in the hippocampi of rats exposed to Δ^9 -THC and ethanol binge drinking during adolescence. *Front Mol Neurosci* 12:96.
- Singh-Bains MK, Linke V, Austria MDR, Tan AYS, Scotter EL, Mehrabi NF, Faulf RLM, Dragunow M. 2019. Altered microglia and neurovasculature in the Alzheimer's disease cerebellum. *Neurobiol Dis* 132:104589.
- Snell HD, Vitenzon A, Tara E, Chen C, Tindi J, Jordan BA, Khodakhah K. 2022. Mechanism of stress-induced attacks in an episodic neurologic disorder. *Sci Adv* 8:1–18.

- Song GJ, Suk K. 2017. Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 9:139.
- Song N, Kim N, Xiao R, Choi H, Chun HI, Kang MH, Kim JH, Seo K, Soundarajan N, Do JT, Song H, Ge ZJ, Park C. 2015. Lack of cytosolic carboxypeptidase 1 leads to subfertility due to the reduced number of antral follicles in *pcd^{3J}* females. *PLoS One* 10:e0139557.
- Song WM, Colonna M. 2018. The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nat Immunol* 19:1048–1058.
- Sotelo C, Alvarado-Mallart RM. 1986. Growth and differentiation of cerebellar suspensions transplanted into the adult cerebellum of mice with hereditary degenerative ataxia. *Proc Natl Acad Sci* 83:1135–1139.
- Sotelo C, Alvarado-Mallart RM. 1987. Reconstruction of the defective cerebellar circuitry in adult Purkinje cell degeneration mutant mice by Purkinje cell replacement through transplantation of solid embryonic implants. *Neuroscience* 20:1–22.
- Sousa C, Biber K, Michelucci A. 2017. Cellular and molecular characterization of microglia: a unique immune cell population. *Front Immunol* 8:198.
- Stephenson J, Nutma E, Van der Valk P, Amor S. 2018. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology* 154:204–219.
- Stoodley CJ, Schmahmann JD. 2010. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex* 46:831–844.
- 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.
- Subhramanyam CS, Wang C, Hu Q, Dheen ST. 2019. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol* 94:112–120.
- Sun J, Song Y, Chen Z, Qiu J, Zhu S, Wu L, Xing L. 2021. Heterogeneity and molecular markers for CNS glial cells revealed by single-cell transcriptomics. *Cell Mol Neurobiol*.
- Sun Y, Alexander SPH, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ. 2007. Cannabinoid activation of PPAR α ; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 152:734–743.
- Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3:9–16.
- Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. 2018. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 14:133–150.
- Tanaka M, Sackett S, Zhang Y. 2020. Endocannabinoid modulation of microglial phenotypes in neuropathology. *Front Neurol* 11:87.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016295.
- Tang Y, Le W. 2016. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* 53:1181–1194.
- Tara E, Vitenzon A, Hess E, Khodakhah K. 2018. Aberrant cerebellar Purkinje cell activity as the cause of motor attacks in a mouse model of episodic ataxia type 2. *Dis Model Mech* 11:dmm034181.
- Thach WT. 1968. Discharge of Purkinje and cerebellar nuclear neurons during rapidly alternating arm movements in the monkey. *J Neurophysiol* 31:785–797.
- Triarhou LC, Ghetti B. 1991. Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged Purkinje cell degeneration mutant mice. *Acta Neuropathol* 81:597–602.
- 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.
- Triarhou LC, Low WC, Ghetti B. 1992. Serotonin fiber innervation of cerebellar cell suspensions intraparenchymally grafted to the cerebellum of *pcd* mutant mice. *Neurochem Res* 17:475–482.
- Triarhou LC, Zhang W, Lee WH. 1996. Amelioration of the behavioral phenotype in genetically ataxic mice through bilateral intracerebellar grafting of fetal Purkinje cells. *Cell Transplant* 5:269–277.

- Triarhou LC, Solà C, Palacios JM, Mengod G. 1998. MAP2 and GAP-43 expression in normal and *weaver* mouse cerebellum: correlative immunohistochemical and in situ hybridization studies. *Arch Histol Cytol* 61:233–242.
- Tsuboi K, Ikematsu N, Uyama T, Deutsch D, Tokumura A, Ueda N. 2013. Biosynthetic pathways of bioactive N-acylethanolamines in brain. *CNS Neurol Disord-Drug Targets* 12:7–16.
- Tuma J, Kolinko Y, Vožeh F, Cendelin J. 2015. Mutation-related differences in exploratory, spatial, and depressive-like behavior in *pcd* and *Lurcher* cerebellar mutant mice. *Front Behav Neurosci* 9:1–19.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8:726–736.
- Uccelli A, Benvenuto F, Laroni A, Giunti D. 2011. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 24:59–64.
- Urrutia DN, Caviedes P, Mardones R, Minguell JJ, Vega-Letter AM, Jofre CM. 2019. Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: an approach for their use in neural regeneration therapies. *PLoS One* 14:e0213032.
- 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 der Heijden ME, Gill JS, Sillitoe RV. 2021. Abnormal cerebellar development in autism spectrum disorders. *Dev Neurosci* 43:181–190.
- Vela JM, Dalmau I, González B, Castellano B. 1995. Morphology and distribution of microglial cells in the young and adult mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 361:602–616.
- Voet S, Srinivasan S, Lamkanfi M, Loo G. 2019. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med* 11:1–16.
- Voogd J, Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci* 21:370–375.
- Vožeh F. 2015. Jan Evangelista Purkyně and the cerebellum then and now. *Physiol Res* 64:S567–S584.
- Walter JT, Alviña K, Womack MD, Chevez C, Khodakhah K. 2006. Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat Neurosci* 9:389–397.
- Wang J, Hu WW, Jiang Z, Feng MJ. 2020. Advances in treatment of neurodegenerative diseases: perspectives for combination of stem cells with neurotrophic factors. *World J Stem Cells* 12:323–338.
- 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.
- Wang T, Parris J, Li L, Morgan JI. 2006. The carboxypeptidase-like substrate-binding site in *Nna1* is essential for the rescue of the Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotype. *Mol Cell Neurosci* 33:200–213.
- Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. 2015. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 3:136.
- Wang X, Ma S, Yang B, Huang T, Meng N, Xu L, Xing Q, Zhang Y, Zhang K, Li Q, Zhang T, Wu J, Yang GL, Guan F, Wang J. 2018. Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 339:297–304.
- Wang X, Miyares RL, Ahern GP. 2005. Oleylethanolamide excites vagal sensory neurons, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol* 564:541–547.
- Warden A, Truitt J, Merriman M, Ponomareva O, Jameson K, Ferguson LB, Mayfield RD, Harris RA. 2016. Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci Rep* 6:1–15.
- Washburn S, Fremont R, Moreno-Escobar MC, Angueyra C, Khodakhah K. 2019. Acute cerebellar knockdown of *Sgce* reproduces salient features of myoclonus-dystonia (DYT11) in mice. *eLife* 8:1–21.
- Wassef M, Simons J, Tappaz ML, Sotelo C. 1986. Non-Purkinje cell GABAergic innervation of the deep cerebellar nuclei: a quantitative immunocytochemical study in C57BL and in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res* 399:125–135.

- Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. 2003a. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci* 100:2088–2093.
- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM. 2003b. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 5:959–966.
- Whetton AD, Graham GJ. 1999. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 9:233–238.
- White JJ, Sillitoe RV. 2013. Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:149–164.
- Wiersema A, Dijk F, Dontje B, Van der Want JJ, Haan G. 2008. Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation. *Stem Cell Res* 1:150–154.
- Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. 2010. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 120:1368–1379.
- Wollank Y, Ramer R, Ivanov I, Salamon A, Peters K, Hinz B. 2015. Inhibition of FAAH confers increased stem cell migration via PPAR α . *J Lipid Res* 56:1947–1960.
- Wolmarans E, Nel S, Durandt C, Mellet J, Pepper MS. 2018. Side population: its use in the study of cellular heterogeneity and as a potential enrichment tool for rare cell populations. *Stem Cells Int* 2018:10–13.
- Womack M, Khodakhah K. 2002. Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 22:10603–10612.
- Yang L, Guo H, Zhou H, Suo D, Li W, Zhou Y, Zhao Y, Yang W, Jin X. 2015. Chronic oleylethanolamide treatment improves spatial cognitive deficits through enhancing hippocampal neurogenesis after transient focal cerebral ischemia. *Biochem Pharmacol* 94:270–281.
- Yang L, Guo H, Li Y, Meng X, Yan L, Zhang D, Wu S, Zhou H, Peng L, Xie Q, Jin X. 2016. Oleylethanolamide exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced THP-1 cells by enhancing PPAR α signaling and inhibiting the NF- κ B and ERK1/2/AP-1/STAT3 pathways. *Sci Rep* 6:34611.
- Yang QQ, Zhou JW. 2019. Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells. *Glia* 67:1017–1035.
- Yao P, Zhou L, Zhu L, Zhou B, Yu Q. 2020. Mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. *Eur Neurol* 83:235–241.
- Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S. 2011. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim* 40:155–160.
- Yuan H, Gaber MW, Boyd K, Wilson CM, Kiani MF, Merchant TE. 2006. Effects of fractionated radiation on the brain vasculature in a murine model: blood-brain barrier permeability, astrocyte proliferation, and ultrastructural changes. *Int J Radiat Oncol* 66:860–866.
- Zhang W, Lee WH, Triarhou LC. 1996. Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat Med* 2:65–71.
- Zhang W, Ghetti B, Lee WH. 1997. Decreased IGF-I gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in pcd mice. *Dev Brain Res* 98:164–176.
- Zhou H, Yang W, Li Y, Ren T, Peng L, Guo H, Liu J, Zhou Y, Zhao Y, Yang L, Jin X. 2017. Oleylethanolamide attenuates apoptosis by inhibiting the TLR4/NF- κ B and ERK1/2 signaling pathways in mice with acute ischemic stroke. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 390:77–84.
- Zhou L, Hossain MI, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Konno K, Kageyama S, Komatsu M, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H. 2018. Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *J Neurochem* 147:557–572.
- Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W, Chen C, Jin X. 2012. Orally administered oleylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α . *Neuropharmacology* 63:242–249.



Apéndices | *Appendices*

Apéndice I | *Appendix I*

PRODUCTOS QUÍMICOS, SOLUCIONES DE USO COMÚN, SOFTWARE Y WEBSITES |

CHEMICALS, COMMONLY USED SOLUTIONS, SOFTWARE AND WEBSITES

PRODUCTOS QUÍMICOS | CHEMICALS

Ácido pícrico | *Picric acid*. $C_6H_3N_3O_7$, CAS: 88-9-1, #014220, Probus S.A., Badalona, España (Spain).

Ácido bórico | *Boric acid*. H_3BO_3 , CAS: 10043-35-3, #B0394, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Agar en polvo grado alimentario | *Agar powdered pure, food grade*. CAS: 9002-18-0, #A0917, Panreac-AppliChem, Castellar del Vallès, España (Spain).

Agarosa MS8 | *MS8 Agarose*. CAS: 9012-36-6, #8065, Condalab, Madrid, España (Spain).

Azul Tripán | *Trypan blue*. $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$, CAS: 72-57-1, #15250061, Gibco, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Bicarbonato potásico | *Potassium bicarbonate*. $KHCO_3$, CAS: 298-14-6, #431583, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Cemento dental | *Dental cement*. #51458, #51456, Stoelting, M&S Dental Supply, Jamaica, NY, EE. UU. (US).

Charisma composite. #66056076, Kulzer, Tokio, Japón (Japan).

Cloruro de amonio | *Ammonium chloride*. NH_4Cl , CAS: 12125-02-9, #254135, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Cloruro de magnesio | *Magnesium chloride*. $MgCl_2$, CAS: 7786-30-3, #449172, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Cloruro potásico | *Potassium chloride*. KCl , CAS: 7447-40-7, #141494, Panreac, Castellar del Vallès, España (Spain).

Cloruro sódico | *Sodium chloride*. $NaCl$, CAS: 7647-14-5, #71382, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

CTB-Subunidad B de la toxina colérica conjugada con Alexa Fluor 555 | *Cholera Toxin Subunit B Alexa Fluor 555*. #11584247, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU. (US).

DAPI | *4',6-diamidino-2-phenylindole*. $C_{16}H_{15}N_5$, CAS: 28718-90-3, #D9542, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

DMSO-dimetilsulfóxido | *Dimethyl sulfoxide*. C_2H_6SO , CAS: 67-68-5, #D8418, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

dNTPs- desoxinucleótidos trifosfato | *Deoxynucleotide triphosphates*. #U1515, Promega, Madison, WI, EE. UU. (US).

EDTA-ácido etilendiaminotetraacético | *Ethylenediaminetetraacetic acid*. $C_{10}H_{16}N_2O_8$, CAS: 60-00-4, #E5134, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Etanol absoluto | *Ethanol absolut*. C_2H_5OH , CAS: 64-17-5, #20821.365, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

Flunixin, Flunazine. $C_{14}H_{11}F_3N_2O_2$, CAS: 38677-85-9, #1FLU003, Bimeda, Oakbrook Terrace, IL, EE. UU. (US).

Gel oftálmico Puralube | *Ophthalmic gel*. CAS: 8009-03-8, Dechra Veterinary Products, Northwich, Reino Unido (United Kingdom).

Gelatina en polvo | *Powdered gelatin*. CAS: 9000-70-8, #24360.233, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

Glicerol | *Glycerol*. $C_3H_8O_3$, CAS: 56-81-5, #24386.298, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

Glicina | *Glycine*. $C_2H_5NO_2$, CAS: 56-40-6, #101196X, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

GoTaq Flexi DNA polimerasa | *GoTaq Flexi DNA polymerase*. #M7805, Promega, Madison, WI, EE. UU. (US).

GW6471- antagonista de PPAR α | *GW6471-PPAR α antagonist*. $C_{35}H_{36}F_3N_3O_4$, CAS: 880635-03-0, #4618, Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido (United Kingdom).

H₂O Elix. Obtained from a water purification system Integral 3, Millipore, Burlington, MA, EE. UU. (US).

H₂O Milli-Q. Obtained from a water purification system integral 3, filter MPKO1, Millipore, Burlington, MA, EE. UU. (US).

Heparina sódica | *Sodium heparin*. CAS: 9041-08-1, #H4784, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Hidrato de cloral | *Chloral hydrate*. $C_2H_3Cl_3O_2$ CAS: 302-17-0 #22.682.265 Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia (France).

Hidróxido sódico | *Sodium hydroxide*. NaOH, CAS: 1310-73-2, #141687.1211, Panreac-AppliChem, Castellar del Vallès, España (Spain).

Isoflurano | *Isoflurane*. $C_3H_2ClF_5O$, CAS: 26675-46-7, #029405, Covetrus, Portland, ME, EE. UU. (US); #1385ESP Provesa, Murcia, España (Spain).

Isopropanol | *Isopropyl alcohol*. C_3H_8O , CAS: 67-63-0, #20842.298, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia (France).

Kit de DNAsas PureLink | *DNase PureLink set*. #12185010, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Kit de extracción RNA PureLink | *RNA isolation PureLink kit*. #12183018A, Invitrogen, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Kit de retrotranscripción de alta capacidad | *High capacity reverse transcription kit*. #4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU. (US).

L-Glutamina | *L-Glutamine*. CAS: 56-85-9, #A2916801, Gibco, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Medio de cultivo IMDM | *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*. #12440053, Gibco, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Medio de cultivo α -MEM, sin nucleósidos | *Minimum Essential Medium Alpha, no nucleosides*. #12561056, Gibco, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Medio de montaje Fluoromount-G con DAPI | *Fluoromount-G mounting medium*. #00-4958-02, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Medio PowerUp SYBR Green | *PowerUp SYBR Green Master Mix*. #A25741, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU. (US).

Medio Tissue-Tek O.C.T. | *Tissue-Tek Medium*. #4583, Sakura Finetek, Tokio, Japón (Japan).

β -Mercaptoetanol | *β -mercaptoethanol*. C_2H_6OS , CAS: 60-24-2, #1610710, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU. (US).

Nitrógeno líquido | *Liquid nitrogen*. N_2 , CAS: 7727-37-9, Air Liquide, Paris, Francia (France).

N-propil-galato | *N-propyl gallate*. $C_{10}H_{12}O_5$, CAS: 121-79-9, #P3130, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

N-Oleiletanolamina | *Oleoylethanolamide*. $C_{20}H_{39}NO_2$, CAS: 111-58-0, #O0383, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Optibond. #36517, Kerr Dental, Brea, CA, EE. UU. (US).

Paraformaldehído | *Paraformaldehyde*. $(CH_2O)_n$, CAS: 30525-89-4, #28794.364, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

Penicilina-Estreptomicina-Neomicina | *Penicillin-streptomycin-neomycin*. #15640055, Gibco, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Polietilenglicol 400 | *Polyethylene glycol 400*. $H(OCH_2CH_2)_nOH$, CAS: 25322-68-3, #26602.290, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

Potasio dihidrógenofosfato | *Potassium dihydrogen phosphate*. KH_2PO_4 , CAS: 7778-77-0, #1048731000, Merck Millipore, Kenilworth, NJ, EE. UU. (US).

Proteínasa K de *Tritirachium album* | *Proteinase K from Tritirachium album*. CAS: 39450-01-6, # P6556, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

RedSafe Solución de marcaje de ácidos nucleicos | *Nuclei acid staining solution*. #21141, iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur (South Korea).

D(+)-Sacarosa | *D(+)-Saccharose*. $C_{12}H_{22}O_{11}$, CAS: 57-50-1, #27478365, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

SDS-Dodecil sulfato sódico | *Sodium dodecyl sulfate*. $NaC_{12}H_{25}SO_4$, CAS: 151-21-3, #71729, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Silicona de baja toxicidad Kwik-Sil | *Low toxicity silicone*. #KWIK-SIL, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EE. UU. (US).

Sodio dihidrógeno fosfato dihidrato | *Sodium dihydrogen phosphate dihydrate*. $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, CAS: 13472-35-0, #28014.360, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

di-Sodio hidrogenofosfato dodecahidrato | *di-Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate*. $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, CAS: 10039-32-4, #28028.367, VWR Chemicals, Solon, OH, EE. UU. (US).

Suero fetal bovino inactivado por calor | *Fetal bovine serum HI*. #SV30160.03HI, Hyclone, Logan, UT, EE. UU. (US).

Sulfato de potasio y cromo (III) dodecahidrato | *Chromium (III) potassium sulfate dodecahydrate*. $KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, CAS: 7788-99-0, #141284, Panreac-AppliChem, Castellar del Vallès, España (Spain).

Tripsina-EDTA 0,25 % | *Trypsin-EDTA 0.25 %*. #25200072, Gibco, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Triton X-100. #22.7810, Probus S.A., Badalona, España (Spain).

Trizma base. $NH_2C(CH_2OH)_3$, CAS: 77-86-1, #T6791, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

Trizma HCl. $NH_2C(CH_2OH)_3 \cdot HCl$, CAS: 1185-53-1, #T6666, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE. UU. (US).

SOLUCIONES DE USO COMÚN | COMMONLY USED SOLUTIONS

Fijador Somogyi | *Somogyi fixative*.

Compuesto por paraformaldehído al 4 % (p/v) y ácido pícrico saturado 15 % (v/v), tamponado en PB 0,1 M, pH 7,4.

Composed of 4 % (w/v) paraformaldehyde and 15 % (v/v) saturated picric acid in 0.1 M PB, pH 7.4.

Medio de montaje para fluorescencia "antidesvanecimiento" | *Antifade mounting medium*.

Formado por glicerol al 70 % (v/v), n-propil galato al 5 % (p/v), glicina al 0,42 % (p/v) y azida al 0,03 % (p/v).

Made of 70 % (v/v) glycerol, 5 % (w/v) n-propyl gallate, 0.42 % (w/v) glycine and 0.03 % (w/v) azida.

Mezcla congeladora para secciones | *Freezing mixture for sections.*

Constituida por glicerol al 30 % (v/v) y polietilenglicol al 30 % (v/v) tamponados con PB 0,1 M, pH 7,4.

Composed of 30 % (v/v) glycerol and 30 % (v/v) polyethylene glycol in 0.1 M PB, pH 7.4.

Solución crioprotectora de sacarosa | *Sucrose solution for cryoprotection.*

Se compone de sacarosa al 30 % (p/v) disuelta en PB 0,1 M, pH 7,4.

Composed of 30 % (w/v) sucrose dissolved in 0.1 M PB, pH 7.4.

Solución de lisis de eritrocitos (médula ósea) | *Erythrocyte lysis buffer (bone marrow).*

Compuesto por 140 mM de cloruro de amonio y 17 mM Tris-base pH 7,4.

Composed of 140 mM of ammonium chloride in 17 mM Tris-base pH 7.4.

Solución de lisis de eritrocitos (sangre periférica) | *Erythrocyte lysis buffer (peripheral blood).*

Compuesto por cloruro de amonio al 0,83 % (p/v), bicarbonato potásico al 0,1 % (p/v) y EDTA 0,372 % (p/v) disueltos en H₂O Elix.

Made of 0.83 % (w/v) ammonium chloride, 0.1 % (w/v) potassium bicarbonate and 0.372 % (w/v) EDTA dissolved in H₂O Elix.

Solución para gelatinizar portaobjetos | *Gelatin slide-coating solution.*

Compuesta por gelatina en polvo al 0,45 % (p/v) y sulfato de potasio y cromo III dodecahidrato disueltos en H₂O Elix.

Made of 0.45 % (w/v) of powdered jelly and 0.044 % (w/v) of chromium III potassium sulfate·12H₂O dissolved in H₂O Elix.

Solución salina isotónica | *Isotonic saline solution.*

Se compone de NaCl al 0,9 % (p/v) en H₂O Elix.

Composed of 0.9 % (w/v) NaCl dissolved in H₂O Elix.

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 | *Phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4.*

Se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Para un volumen de dos litros, se disuelven 107,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en 1500 ml de H_2O Elix y 15,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de H_2O Elix. Mezclar hasta el pH deseado de 7,4.

Obtained by mixing 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. For 2 liters, dissolve 107.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 1500 ml Elix H_2O and 15.6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 500 ml Elix H_2O . Mix until pH 7.4.

Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 | *Phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4.*

Se prepara diluyendo la solución de Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 a la mitad en H_2O Elix.

Prepared by diluting Phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4 by half (1:1) in Elix H_2O .

Tampón fosfato salino, pH 7,4 | *Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.*

Para obtener un litro de la solución se disuelven los siguientes componentes en H_2O Elix: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 3.63 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 0,21 g de KH_2PO_4 . Se ajusta el pH a 7,4.

For 1 liter, the following chemicals are dissolved in Elix H_2O : 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ and 0.21 g KH_2PO_4 . pH is adjusted to 7.4.

Tampón Tris-Borato-EDTA 10X | *Tris-Borate-EDTA buffer 10X.*

Para preparar un litro, se disuelven 108 g de Trizma base y 55 g de ácido bórico en 40 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0. Para su uso a 0,5 X, se disuelve la cantidad correspondiente en H_2O Elix.

For 1 liter, dissolve 108 g Trizma base and 55 g boric acid in 40 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0. For 0.5 X concentration, dilute the corresponding volume in Elix H_2O .

SOFTWARE

Adquisición, análisis y procesamiento de imágenes | *Image acquisition, analysis, and processing.*

Adobe Photoshop CC 2015, 2015.0.0, Adobe World, San José, CA, EE. UU. (US).

DP Controller, V1.2.1.108, Olympus Optical Co., Shinjuku, Tokio, Japón (Japan).

DP Manager, V1.2.1.107, Olympus Optical Co., Shinjuku, Tokio, Japón (Japan).

Image J, V1.52A, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU. (US).

Neuroexplorer, V10.30, MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, EE. UU. (US).

NeuroLucida, V10.30, MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, EE. UU. (US).

Adquisición y análisis de registros electrofisiológicos | *Electrophysiological recordings acquisition and analysis.*

Labview, National Instruments, Austin, TX, EE. UU. (US).

Offline Sorter, V2.8, Plexon, Dallas, TX, EE. UU. (US).

Purkinje Cell-MIO-16-XE, National Instruments, Austin, TX, EE. UU. (US).

Simplify3D V4.1.0, Simplify3D, Indeco Dr, Cincinnati, OH, EE. UU. (US).

Adquisición y procesamiento de datos de la técnica qPCR | *qPCR data acquisition and processing.*

QuantStudio Real-Time PCR, V 1.2, Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU. (US).

Análisis y representación de datos | *Data analyses and representation.*

GraphPad Prism, Windows V9.0.2, GraphPad, San Diego, CA, EE. UU. (US).

Microsoft Excel, Microsoft 365 MSO, V2202, Redmond, WA, EE. UU. (US).

SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), Windows V26, International Business Machines Corporation, Armonk, New York, EE. UU. (US).

Diseño de figuras y procesamiento de texto | *Figure design and text processing*

Adobe Photoshop CC 2015, 2015.0.0, Adobe World, San José, CA, EE. UU. (US).

Biorender App, Biorender, Toronto, ON, EE. UU. (US).

Microsoft Word, Microsoft 365 MSO, V2202, Redmond, WA, EE. UU. (US).

WEBSITES

Ensembl-BLAST/BLAT <https://www.ensembl.org/index.html> [10 Jan 2021]

Mouse Genome Informatics <http://www.informatics.jax.org/allele/summary?markerId=MGI:2159437> [4 Feb 2022]

NIH <https://www.niehs.nih.gov/research/supported/health/neurodegenerative/index.cfm> [2 Feb 2022]

WHO https://www.who.int/mental_health/neurology/neurological_disorders_report_web.pdf [2 Feb 2022]

Apéndice II | *Appendix II*

ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD Y LA EFICACIA DE LOS PRIMERS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA
qPCR/SPECIFICITY AND EFFICIENCY ANALYSES OF qPCR PRIMERS

Gen Gene	Bdnf
MGI/NCBI ID	88145/12064
Identificador personal <i>Personal ID</i>	BDNF_1L
Cebador sentido <i>Forward primer</i>	GTGGTGTAAAGCCGCAAAGA
Cebador antisentido <i>Reverse primer</i>	AACCATAGTAAGGAAAAGGATGGTC

Job name: Job 2: RBDNF_1L
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

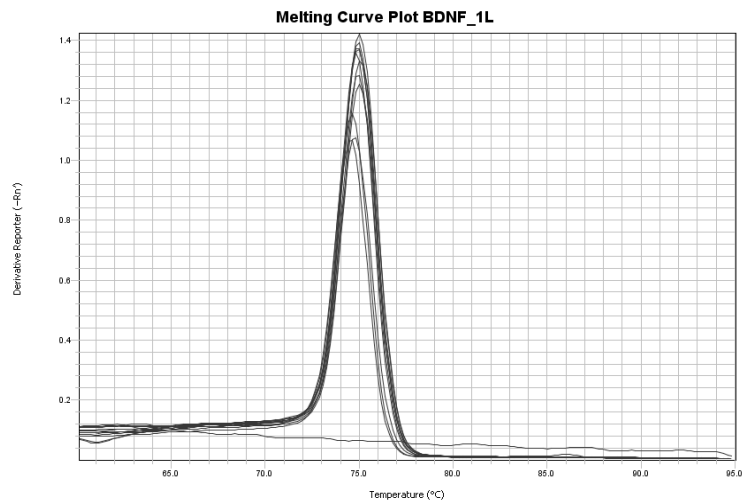
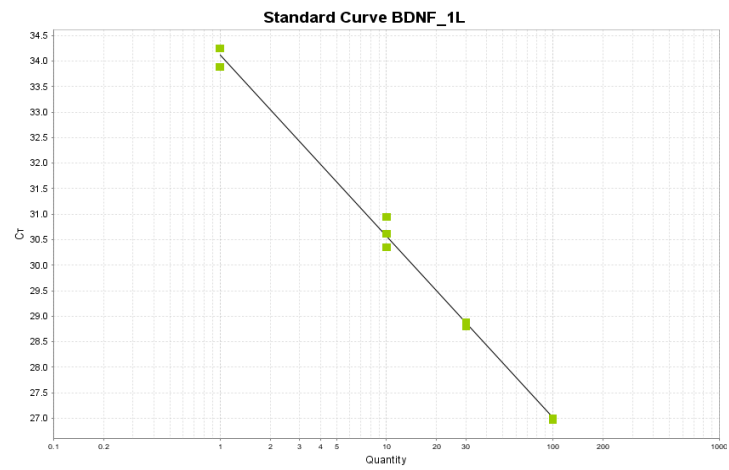
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
2:109723495-109723429 (Sequence)	Bdnf	Reverse	1	25	25 (Sequence)	49.9	7e-05	100.00 (Alignment)
X:114565059-114565078 (Sequence)		Reverse	4	21	18 (Sequence)	36.1	1.0	100.00 (Alignment)
16:59726024-59726041 (Sequence)	Epha6	Reverse	4	21	18 (Sequence)	36.1	1.0	100.00 (Alignment)

Job name: Job 1: FBDNF_1L
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
2:109676375-109676393 (Sequence)	Gm45346, Bdnf	Forward	1	19	19 (Sequence)	38.1	0.087	100.00 (Alignment)
X:145325531-145325549 (Sequence)	Lhfp1	Forward	1	19	19 (Sequence)	30.2	21	94.74 (Alignment)
17:44550474-44550488 (Sequence)	Rumx2	Reverse	5	19	15 (Sequence)	30.2	21	100.00 (Alignment)



Gen Gene	Cox2 (Ptgs2)
MGI/NCBI ID	977798/19225
Identificador personal Personal ID	COX-2_2
Cebador sentido Forward primer	GGTCATTGGTGGAGAGGTGTA
Cebador antisentido Reverse primer	TGAGTCTGCTGGTTTGAATAG

Job name: Job 3 FCOX-2_2
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)
[Download results file](#) [New job](#)

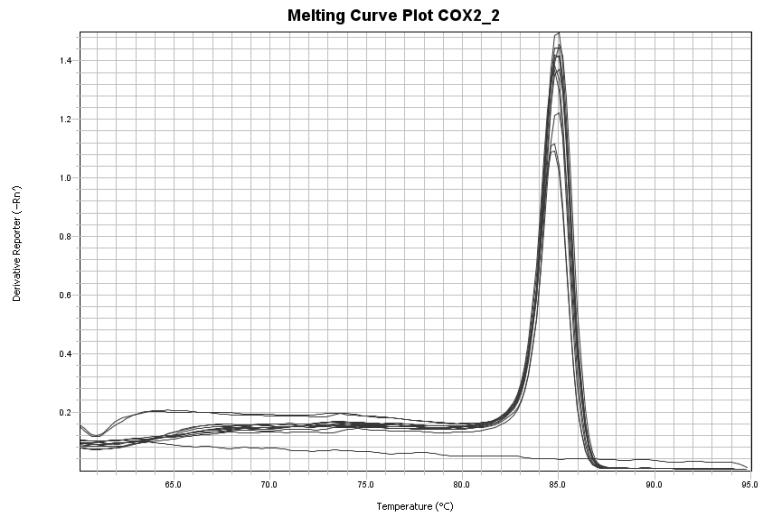
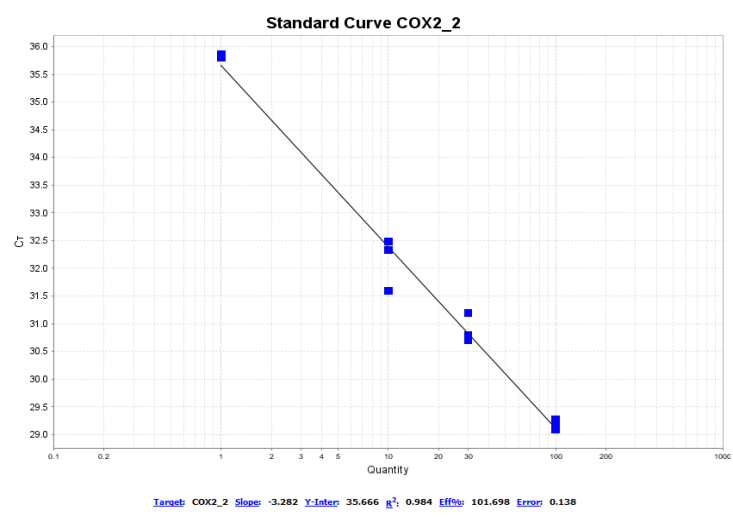
Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
1.150193888-1.150193888 (sequence)	Ptgs2	Forward	1	21	21 (sequence)	42.0	0.000	100.00 (sequence)
1.926700718-1.926700718 (sequence)	Gab3rf2	Forward	4	19	16 (sequence)	32.1	0.0	100.00 (sequence)
1.92674038-1.92674038 (sequence)	Gab3rf2	Forward	4	19	16 (sequence)	32.1	0.0	100.00 (sequence)

Job name: Job 4 RCOX-2_2
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)
[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
1.150184985-1.150184985 (sequence)	Ptgs2	Reverse	1	22	22 (sequence)	44.0	0.002	100.00 (sequence)
11.61972866-11.61972866 (sequence)	Sapcc1	Forward	1	16	16 (sequence)	36.1	0.51	100.00 (sequence)
13.9521179-13.9521179 (sequence)		Forward	1	17	17 (sequence)	34.1	2.0	100.00 (sequence)



Gen Gene	Gap43
MGI/NCBI ID	95639/14432
Identificador personal <i>Personal ID</i>	GAP43_1
Cebador sentido <i>Forward primer</i>	GCTGGTGCATCACCTTCT
Cebador antisentido <i>Reverse primer</i>	TGGTGTCAAGCCGGAAGATAA

Job name: Job 1: FGAP43_1
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

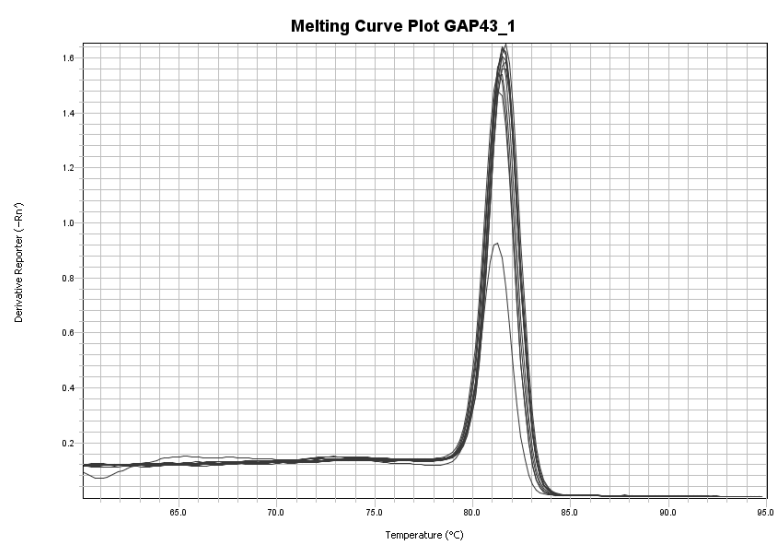
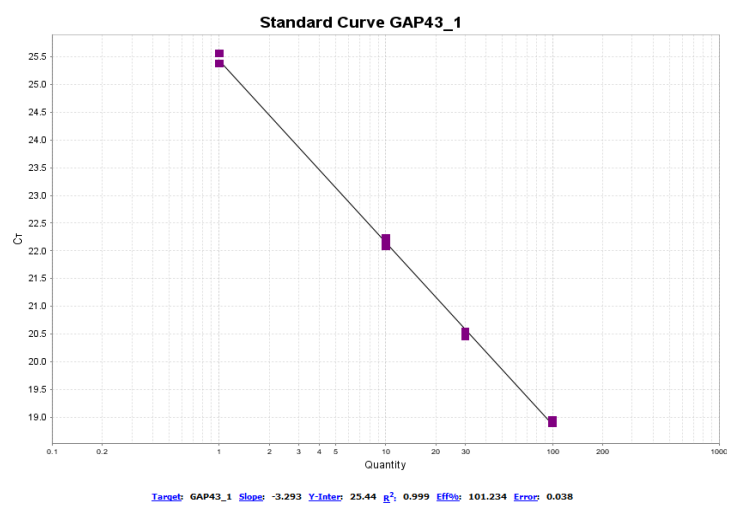
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
16.42292308-42292328 (Sequence)	Gap43	Reverse	1	21	21 (Sequence)	42.0	0.008	100.00 (Alignment)
12.24739180-24739194 (Sequence)		Forward	5	19	15 (Sequence)	30.2	31	100.00 (Alignment)
8.60636513-60636531 (Sequence)	Mfac3l	Reverse	3	21	19 (Sequence)	30.2	31	94.74 (Alignment)

Job name: Job 2: RGAP43_1
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
16.42292215-42292233 (Sequence)	Gap43	Forward	1	19	19 (Sequence)	38.1	0.087	100.00 (Alignment)
18.6067036-6067051 (Sequence)		Reverse	2	17	16 (Sequence)	32.1	5.3	100.00 (Alignment)
11.48269878-48269893 (Sequence)		Forward	2	17	16 (Sequence)	32.1	5.3	100.00 (Alignment)



Gen Gene	Ifny
MGI/NCBI ID	107656/15978
Identificador personal Personal ID	IFNg_5
Cebador sentido Forward primer	CAGCAACAGCAAGGCGAAAAAGG
Cebador antisentido Reverse primer	TTTCCGCTTCCTGAGGCTGGAT

Job name: Job 3: F IFNg_5
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

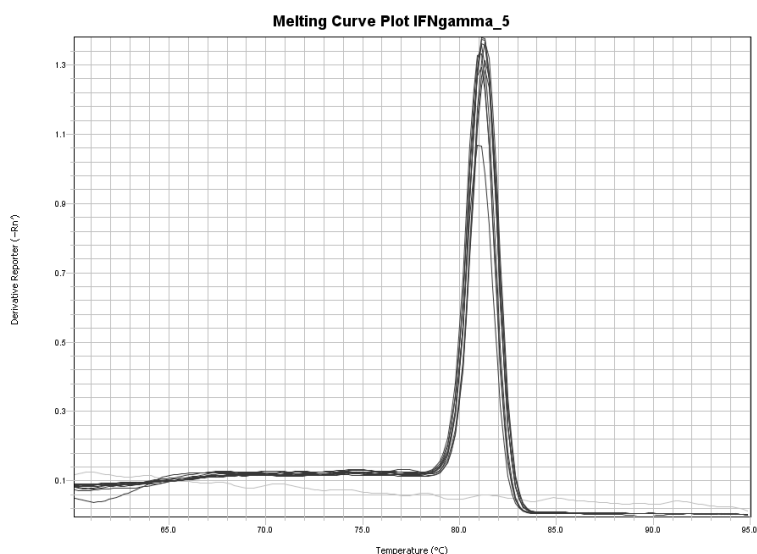
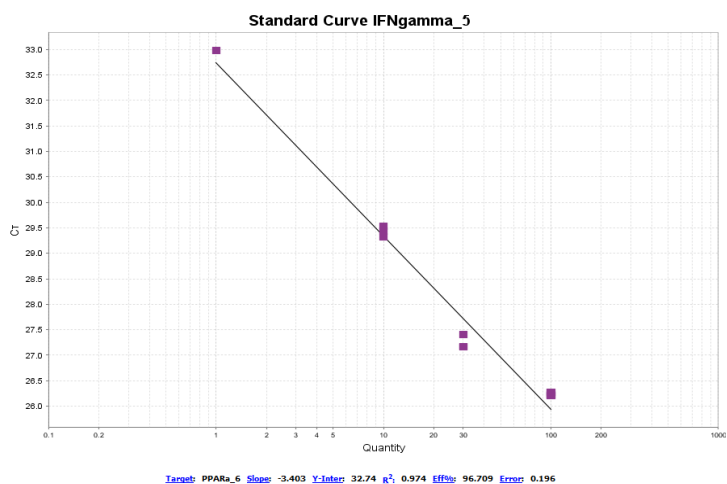
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
10.118442744-118442756 (Sequence)	Ifng_Gm497s1	Forward	1	23	23 (Sequence)	46.0	7e-04	100.00 (Assignment)
6.88084544-88084560 (Sequence)	Ron1	Reverse	1	17	17 (Sequence)	34.1	2.7	100.00 (Assignment)
6.122692286-122692301 (Sequence)	ApoBec1	Reverse	1	16	16 (Sequence)	32.1	11	100.00 (Assignment)

Job name: Job 4: R IFNg_5
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
10.118445225-118445246 (Sequence)	Ifng	Reverse	1	22	22 (Sequence)	44.0	0.002	100.00 (Assignment)
15.97777534-97777550 (Sequence)		Forward	6	22	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Assignment)
7.127866783-127866799 (Sequence)	Zfp668	Forward	6	22	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Assignment)



Gen Gene	IL1β
MGI/NCBI ID	96543/16176
Identificador personal Personal ID	IL-1B_2
Cebador sentido Forward primer	TGCTCATGTCCTCATCCTGGAAGG
Cebador antisentido Reverse primer	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG

Job name: Job 3: FIL-1B_2
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

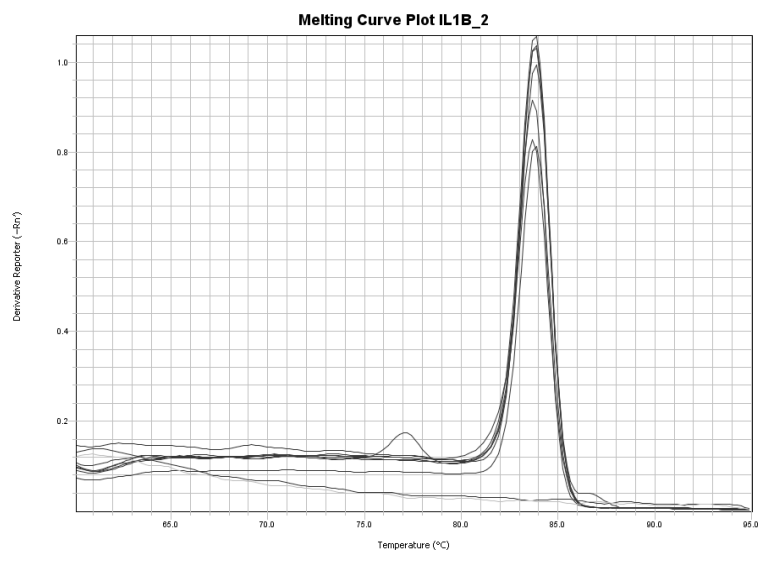
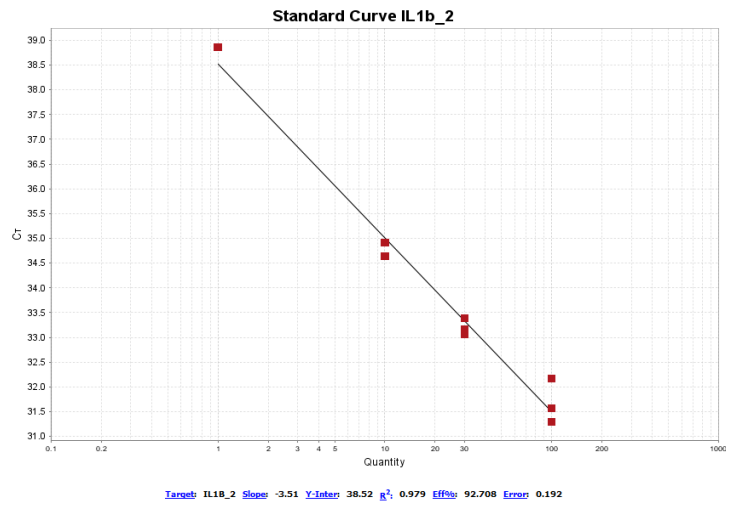
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
2:129358079-129360101 (Sequence)	Il1b	Reverse	1	23	23 (Sequence)	46.0	7e-04	100.00 (Alignment)
CHR_M04190_PATCH1740651727406532 (Sequence)		Reverse	0	23	16 (Sequence)	32.1	11	100.00 (Alignment)
17:7535084-7535099 (Sequence)		Reverse	8	23	16 (Sequence)	32.1	11	100.00 (Alignment)

Job name: Job 4: RIL-1B_2
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
2:129367984-129368007 (Sequence)	Il1b	Forward	1	24	24 (Sequence)	48.0	2e-04	100.00 (Alignment)
2:24873612-24873628 (Sequence)	Ehmt1	Forward	6	22	17 (Sequence)	34.1	3.4	100.00 (Alignment)
2:50624565-50624581 (Sequence)		Forward	3	19	17 (Sequence)	34.1	3.4	100.00 (Alignment)



Gen Gene	<i>Il6</i>
MGI/NCBI ID	96559/16193
Identificador personal <i>Personal ID</i>	IL-6_3
Cebador sentido <i>Forward primer</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
Cebador antisentido <i>Reverse primer</i>	AAGTGCATCATCGTTGTCATACA

Job name: Job 5: IL-6_3
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
5,30013465-30013487 (Sequence)	<i>Il6</i>	Forward	1	23	23 (Sequence)	46.0	7e-04	100.00 (Alignment)
7,133653834-133653851 (Sequence)	<i>Edn1</i>	Reverse	6	23	18 (Sequence)	36.1	0.69	100.00 (Alignment)
CHR_MIG3530_PATCH.67271492-67271508 (Sequence)	<i>Nrb2</i>	Forward	3	19	17 (Sequence)	34.1	2.7	100.00 (Alignment)

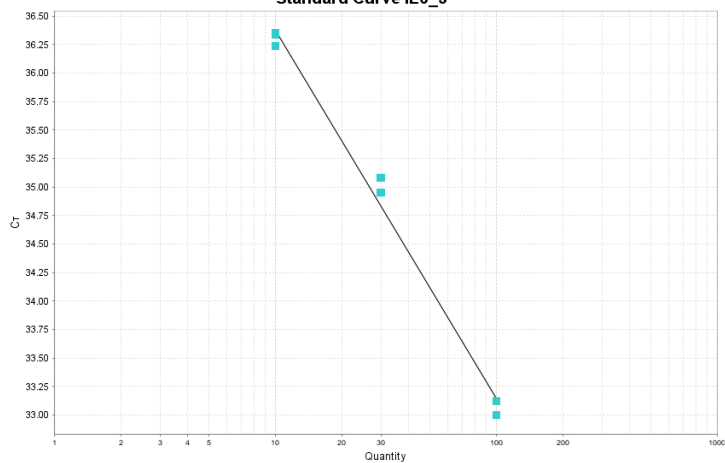
Job name: Job 6: IIL-6_3
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

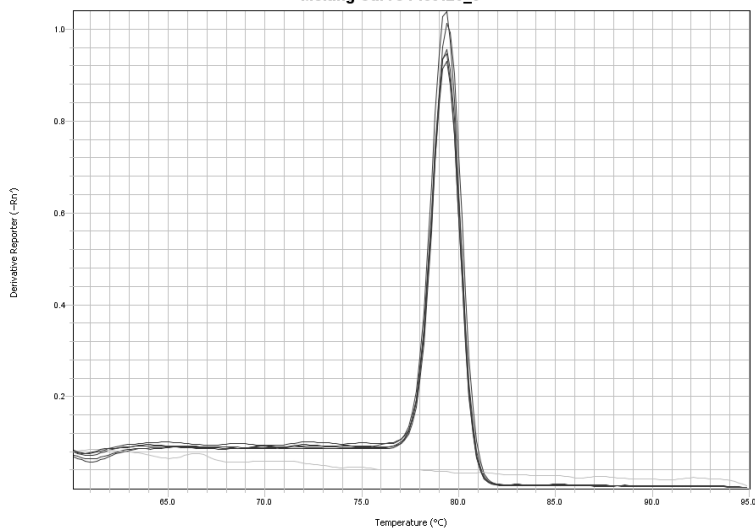
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
5,30014853-30014876 (Sequence)	<i>Il6</i>	Reverse	1	24	24 (Sequence)	48.0	2e-04	100.00 (Alignment)
16,16197868-16197883 (Sequence)		Forward	6	21	16 (Sequence)	32.1	13	100.00 (Alignment)
3,71623326-71623341 (Sequence)		Reverse	9	24	16 (Sequence)	32.1	13	100.00 (Alignment)

Standard Curve IL6_3



Target: IL6_3 Slope: -3.229 Y-Inter: 39.603 R^2 : 0.991 Eff%: 104.043 Error: 0.14

Melting Curve Plot IL6_3



Gen Gene	iNos (Nos2)
MGI/NCBI ID	97361/18126
Identificador personal <i>Personal ID</i>	iNOS_D
Cebador sentido <i>Forward primer</i>	CTTGCCACGGACGAGAC
Cebador antisentido <i>Reverse primer</i>	AACTCCAGTCATTGTACTCTGAGG

Job name: Job 1: FINOS_D
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

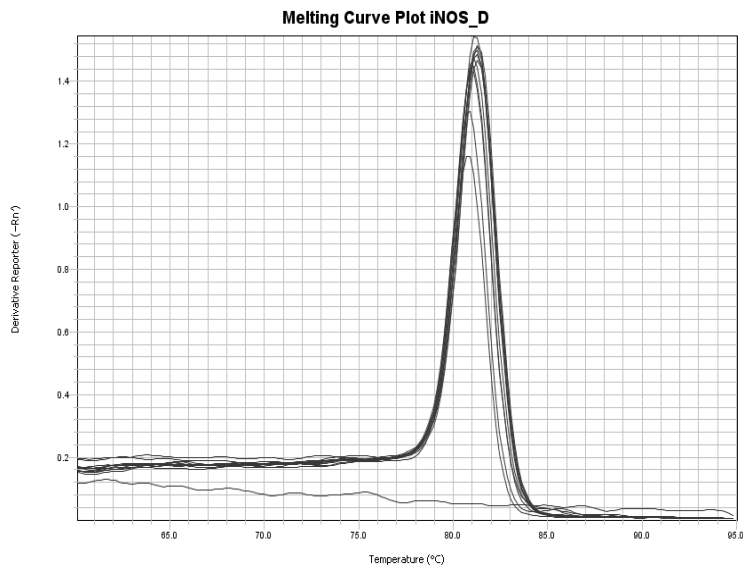
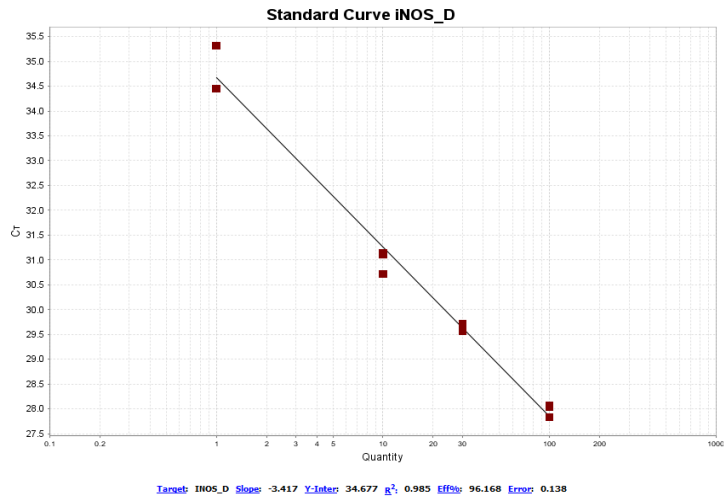
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
11.78951210-78951227 (Sequence)	Nos2	Forward	1	18	18 (Sequence)	36.1	0.34	100.00 (Alignment)
5.37554037-37554051 (Sequence)	Sik3zb	Forward	4	18	15 (Sequence)	30.2	21	100.00 (Alignment)
3.17677861-17677874 (Sequence)		Reverse	5	18	14 (Sequence)	28.2	62	100.00 (Alignment)

Job name: Job 2: RINOS_D
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
11.78952804-78952828 (Sequence)	Nos2	Reverse	1	25	25 (Sequence)	49.9	7e-05	100.00 (Alignment)
9.25633893-25633910 (Sequence)	Eopd1	Forward	8	25	18 (Sequence)	36.1	1.0	100.00 (Alignment)
X.99111652-99111673 (Sequence)		Reverse	2	22	22 (Sequence)	34.1	4.0	95.45 (Alignment)



Gen Gene	Map2
MGI/NCBI ID	97175/17756
Identificador personal Personal ID	MAP2_8
Cebador sentido Forward primer	GCTGTAGCAGTCCTGAAAGGTG
Cebador antisentido Reverse primer	CTTCTCCACTGTGGCTGTTG

Job name: Job 1: F MAP2_8

Species: Mouse (Mus musculus)

Assembly: GRCm38

Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
1.65359430-66359451 (Sequence)	Map2	Forward	1	22	22 (Sequence)	44.0	0.002	100.00 (Alignment)
13.109058951-109058967 (Sequence)	Ptdc4d	Forward	4	20	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Alignment)
5.51897597-51897613 (Sequence)		Forward	4	20	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Alignment)

Job name: Job 2: R MAP2_8

Species: Mouse (Mus musculus)

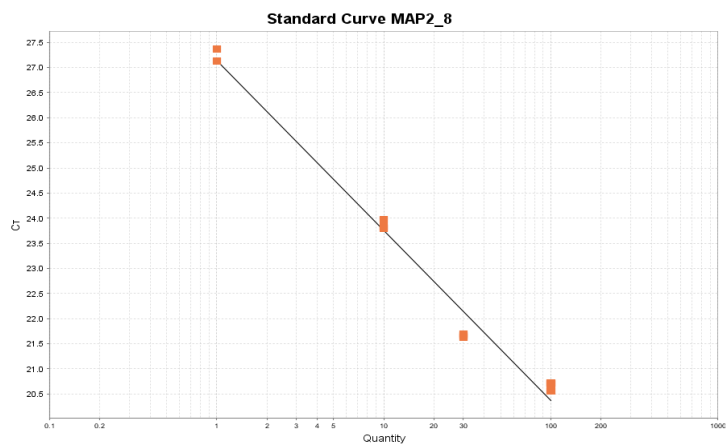
Assembly: GRCm38

Search type: BLASTN (NCBI Blast)

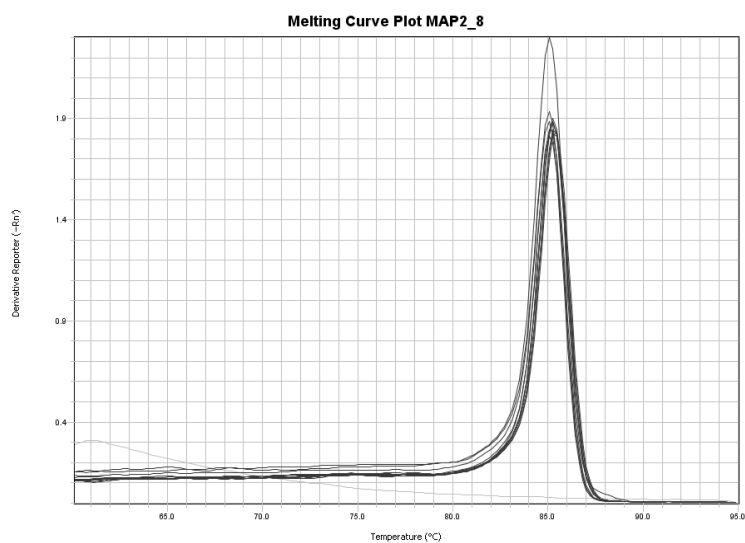
[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
1.66401500-66401521 (Sequence)	Map2	Reverse	1	22	22 (Sequence)	44.0	0.002	100.00 (Alignment)
7.110892973-110892990 (Sequence)	Mxi1	Reverse	1	18	18 (Sequence)	36.1	0.51	100.00 (Alignment)
5.127433533-127433550 (Sequence)	Tmem132c	Forward	1	18	18 (Sequence)	36.1	0.51	100.00 (Alignment)



Target: MAP2_8 Slope: -3.39 Y-Inter: 27.143 R²: 0.982 Effici: 97.247 Error: 0.151



Gen Gene	Nfkb
MGI/NCBI ID	1914300/67050
Identificador personal Personal ID	NFKB_3
Cebador sentido Forward primer	GCTGCCAAAGAAGGACACGACA
Cebador antisentido Reverse primer	GGCAGGCTATTGCTCATCACAG

Job name: Job 5: F NFKB_3
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

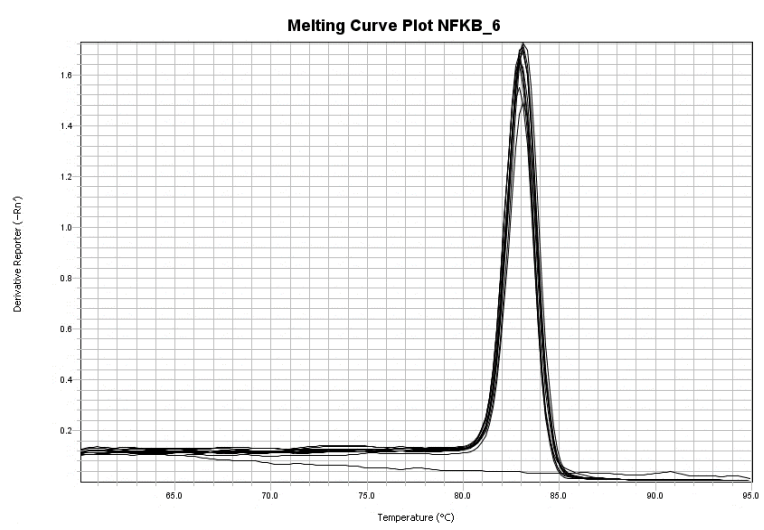
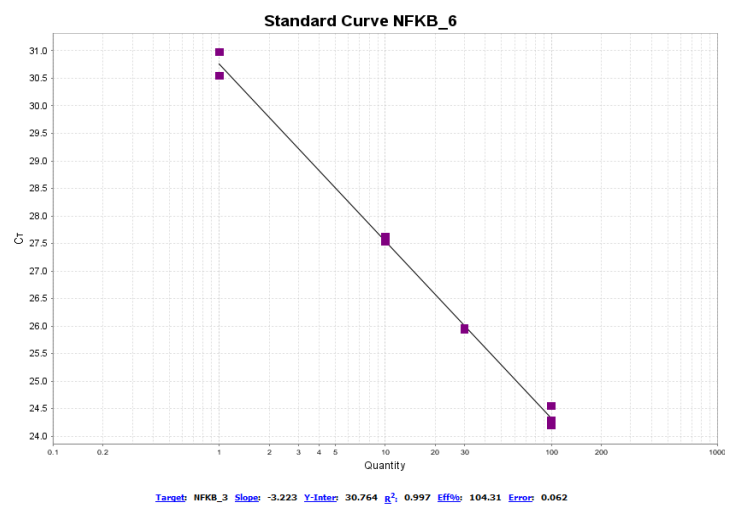
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
1:135594911-135594952 (Sequence)	Nfkb1	Reverse	1	22	22 (Sequence)	44.0	0.002	100.00 (Alignment)
12:84380205-84380221 (Sequence)	Estpd5	Reverse	1	17	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Alignment)
11:82735770-82735786 (Sequence)	Cct5b	Forward	2	18	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Alignment)

Job name: Job 6: R NFKB_3
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

[Download results file](#) [New job](#)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
3:135594336-135594367 (Sequence)	Nfkb1	Forward	1	22	22 (Sequence)	44.0	0.002	100.00 (Alignment)
9:112092346-112092362 (Sequence)	Arpp21	Forward	6	22	17 (Sequence)	34.1	2.0	100.00 (Alignment)
3:7679587-7679602 (Sequence)	Gm16685	Reverse	5	20	16 (Sequence)	32.1	8.0	100.00 (Alignment)



Gen Gene	Ppara
MGI/NCBI ID	104740/19013
Identificador personal Personal ID	PPAR-alpha_6
Cebador sentido Forward primer	ATGCCAGTACTGCCGTTTTC
Cebador antisentido Reverse primer	TTGCCAGAGATTTGAGTTC

Job name: Job 9 FPPAR-alpha_5
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

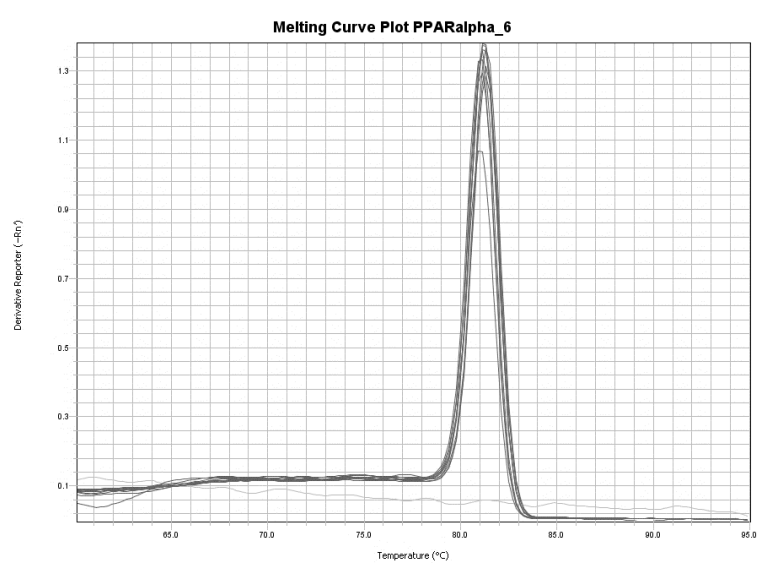
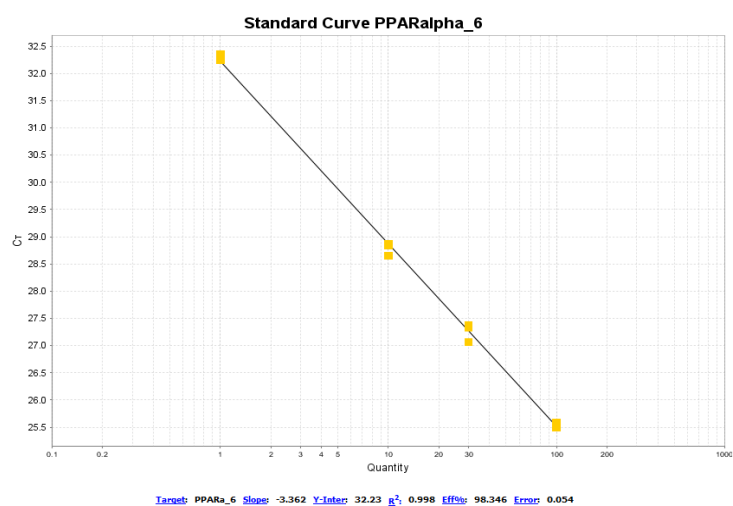
Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
15.85789095-15.799084 (Sequenced)	Ppara	Forward	1	20	20 (Sequenced)	40.0	0.022	100.00 (Aligned)
13.7499995-17.499999 (Sequenced)	Moln1a	Forward	5	20	16 (Sequenced)	32.1	5.3	100.00 (Aligned)
1.15296543-1.15296527 (Sequenced)		Forward	1	15	15 (Sequenced)	30.2	21	100.00 (Aligned)

Job name: Job 10 RPPAR-alpha_5
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
15.85789095-15.799084 (Sequenced)	Ppara	Reverse	1	20	20 (Sequenced)	40.0	0.022	100.00 (Aligned)
16.91548095-16.154802 (Sequenced)		Reverse	3	19	17 (Sequenced)	34.1	1.3	100.00 (Aligned)
17.20453933-17.0453648 (Sequenced)	Dcdc3c	Reverse	1	17	17 (Sequenced)	34.1	1.3	100.00 (Aligned)



Gen Gene	Tnfa
MGI/NCBI ID	104798/21926
Identificador personal <i>Personal ID</i>	TNF-alpha_4
Cebador sentido <i>Forward primer</i>	GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
Cebador antisentido <i>Reverse primer</i>	ATGTCTCAGCCTCTTCATTC

Job name: Job 1: RTNF-alpha_4
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

Download results file | New job

Results table

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	v. E-val	UID
17:35291727-35291749 (Geneset)	Tnf	Reverse	1	22	22 (Geneset)	44.0	0.002	100.00 (Geneset)
18:192735345-192735262 (Geneset)		Reverse	5	22	18 (Geneset)	36.1	0.51	100.00 (Geneset)
9:114945435-114945452 (Geneset)		Reverse	1	16	16 (Geneset)	36.1	0.51	100.00 (Geneset)

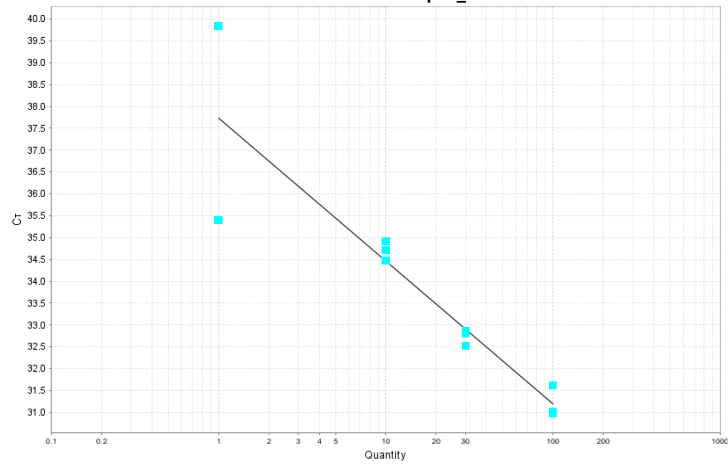
Job name: Job 2: RTNF-alpha_4
 Species: Mouse (Mus musculus)
 Assembly: GRCm38
 Search type: BLASTN (NCBI Blast)

Download results file | New job

Results table

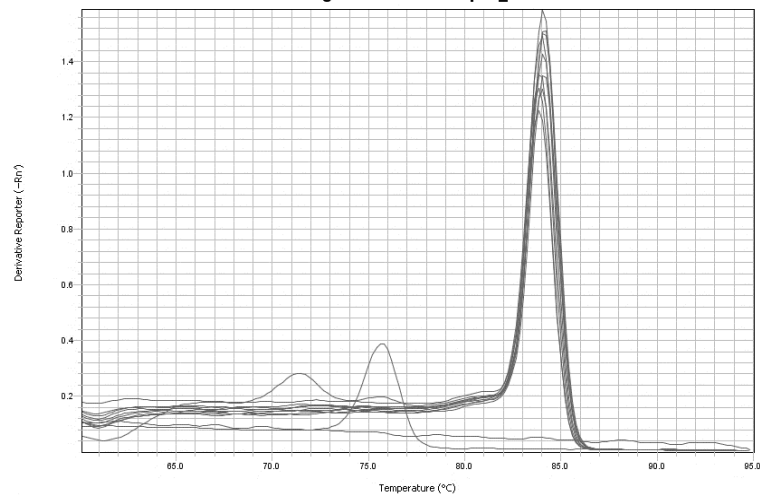
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	v. E-val	UID
17:352916915-352916937 (Geneset)	Tnf	Forward	1	22	22 (Geneset)	44.0	0.002	100.00 (Geneset)
X:82479454-82479460 (Geneset)		Reverse	5	20	16 (Geneset)	32.1	8.0	100.00 (Geneset)
X:82565803-82565818 (Geneset)		Reverse	5	20	16 (Geneset)	32.1	8.0	100.00 (Geneset)

Standard Curve TNFalpha_4



Target: TNFa_4 Slope: -3.267 Y-Inter: 37.731 R²: 0.839 Eff%: 102.327 Error: 0.477

Melting Curve Plot TNFalpha_4



Apéndice III | *Appendix III*

VALORES DE p DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS REALIZADOS EN LA PRESENTE TESIS
DOCTORAL/ p VALUES OF STATISTICAL ANALYSES CARRIED OUT IN THIS DOCTORAL THESIS

ESTRATEGIA I. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON OEA | APPROACH I. OEA PHARMACOLOGICAL TREATMENT

1. Optimización de la ventana temporal terapéutica de la OEA en el ratón PCD | Optimization of the OEA therapeutic temporal window in PCD mice

Área soma Soma area	OEA P14	OEA P12	OEA P10
PCD	0.043	< 0.001	0.003
OEA P14	.	0.005	1.000
OEA P12	.	.	0.003

Longitud árbol dendrítico Dendritic arbor length	OEA P14	OEA P12	OEA P10
PCD	0.032	< 0.001	< 0.001
OEA P14	.	0.042	0.004
OEA P12	.	.	0.006

Longitud dendrita primaria Main dendrite length	OEA P14	OEA P12	OEA P10
PCD	0.035	0.006	0.388
OEA P14	.	0.662	1.000
OEA P12	.	.	0.279

Grosor dendrita primaria Main dendrite width	OEA P14	OEA P12	OEA P10
PCD	0.039	0.009	0.046
OEA P14	.	0.008	0.988
OEA P12	.	.	0.098

Densidad Células Purkinje Purkinje cell density	OEA P14	OEA P12	OEA P10
PCD	0.032	< 0.001	0.168
OEA P14	.	0.014	< 0.001
OEA P12	.	.	< 0.001

2. Efecto neuroprotector de la dosis más efectiva de OEA a largo plazo | Long-term neuroprotective effect of the optimal dose of OEA

Área soma Soma area	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)	P30 vs. P40 (PCD OEA P12)	PCD vs. OEA P12 (P40)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.419 < 0.001	0.024

Longitud árbol dendrítico Dendritic arbor length	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)	P30 vs. P40 (PCD OEA P12)	PCD vs. OEA P12 (P40)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.644 < 0.001	0.551

Longitud dendrita primaria Main dendrite length	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)	P30 vs. P40 (PCD OEA P12)	PCD vs. OEA P12 (P40)
<i>p-value</i>	< 0.001	0.553	0.522	0.942 0.536	0.011

Grosor dendrita primaria Main dendrite width	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)	P30 vs. P40 (PCD OEA P12)	PCD vs. OEA P12 (P40)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.643 < 0.001	0.604

Densidad Células Purkinje Purkinje cell density	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)	P30 vs. P40 (PCD OEA P12)	PCD vs. OEA P12 (P40)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.057

3. Efecto de la OEA en el peso corporal de los animales | OEA effect on animal body weight

Peso corporal a P30 <i>Body weight at P30</i>	PCD	OEA P14	OEA P12	OEA P10
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	1.000	1.000	1.000
OEA P14	.	.	1.000	1.000
OEA P12	.	.	.	1.000

Peso corporal a P40 <i>Body weight at P40</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	1.000

4. Análisis del peso de los hemicerebelos y relación con el peso corporal total | Analysis of hemicerebellar weight and proportion with total body weight

CORTO PLAZO | Short-term (~P12)

Peso hemicerebelos ~P12 <i>Hemicerebellar weight</i>	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	1.000	0.036
3 H Post-OEA (WT)	.	0.039

Hemicerebelo/Peso total ~P12 <i>Hemicerebellum/Total Body weight</i>	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	1.000	0.061
3 H Post-OEA (WT)	.	0.046

MEDIO PLAZO | Medium-term (P20)

Peso hemicerebelos P20 <i>Hemicerebellar weight</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.521

Hemicerebelo/Peso total P20 <i>Hemicerebellum/Total Body weight</i>	PCD	OEA P12
WT	0.004	0.451
PCD	.	0.081

LARGO PLAZO | Long-term (P30)

Peso hemicerebelos P30 <i>Hemicerebellar weight</i>	PCD	OEA P12
WT	0.019	0.023
PCD	.	1.000

Hemicerebelo/Peso total P30 <i>Hemicerebellum/Total Body weight</i>	PCD	OEA P12
WT	0.472	0.029
PCD	.	0.477

5. Cambios en la expresión génica a corto plazo en condiciones fisiológicas | Short-term changes on gene expression in physiological conditions

Cox2	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.459	0.459
3 H Post-OEA (WT)	.	0.459
Ifny	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.829	0.013
3 H Post-OEA (WT)	.	0.007
Il1β	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.004	0.094
3 H Post-OEA (WT)	.	0.234
Il6	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.014	0.957
3 H Post-OEA (WT)	.	0.020
iNos	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.158	0.158
3 H Post-OEA (WT)	.	0.158
Nfkb	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.272	0.272
3 H Post-OEA (WT)	.	0.272
Tnfa	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.003	0.040
3 H Post-OEA (WT)	.	0.358
Bdnf	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.009	0.035
3 H Post-OEA (WT)	.	0.626
Gap43	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.004	0.046
3 H Post-OEA (WT)	.	0.304
Map2	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.004	0.003
3 H Post-OEA (WT)	.	0.914
Ppara	3 H Post-OEA (WT)	24 H Post-OEA (WT)
WT	0.002	0.006
3 H Post-OEA (WT)	.	0.746

6. Cambios en la expresión génica a medio plazo (P20) en el ratón PCD | *Medium-term changes on gene expression in PCD mice at P20*

<i>Cox2</i>	PCD	OEA P12
WT	1.000	0.005
PCD	.	0.080
<i>Ifny</i>	PCD	OEA P12
WT	0.097	0.002
PCD	.	0.143
<i>Il1β</i>	PCD	OEA P12
WT	0.052	0.002
PCD	.	0.838
<i>Il6</i>	PCD	OEA P12
WT	1.000	0.007
PCD	.	0.015
<i>iNos</i>	PCD	OEA P12
WT	0.028	1.000
PCD	.	0.069
<i>Nfkb</i>	PCD	OEA P12
WT	0.231	0.231
PCD	.	0.231
<i>Tnfa</i>	PCD	OEA P12
WT	0.044	0.002
PCD	.	0.583
<i>Bdnf</i>	PCD	OEA P12
WT	0.838	0.080
PCD	.	0.003
<i>Gap43</i>	PCD	OEA P12
WT	0.029	1.000
PCD	.	0.017
<i>Map2</i>	PCD	OEA P12
WT	0.913	0.281
PCD	.	0.021
<i>Ppara</i>	PCD	OEA P12
WT	0.034	0.123
PCD	.	0.059

7. Cambios en la expresión génica a largo plazo (P30) en el ratón PCD | Long-term changes on gene expression in PCD mice at P30

<i>Cox2</i>	PCD	OEA P12
WT	0.587	0.587
PCD	.	0.587
<i>Ifny</i>	PCD	OEA P12
WT	0.035	0.626
PCD	.	0.009
<i>Il1β</i>	PCD	OEA P12
WT	0.002	0.387
PCD	.	0.031
<i>Il6</i>	PCD	OEA P12
WT	0.004	0.589
PCD	.	0.020
<i>iNos</i>	PCD	OEA P12
WT	0.050	0.050
PCD	.	0.050
<i>Nfκb</i>	PCD	OEA P12
WT	0.548	0.548
PCD	.	0.548
<i>Tnfa</i>	PCD	OEA P12
WT	0.002	0.009
PCD	.	0.626
<i>Bdnf</i>	PCD	OEA P12
WT	0.011	0.787
PCD	.	0.005
<i>Gap43</i>	PCD	OEA P12
WT	0.082	0.082
PCD	.	0.082
<i>Map2</i>	PCD	OEA P12
WT	0.330	0.015
PCD	.	0.044
<i>Ppara</i>	PCD	OEA P12
WT	0.012	0.787
PCD	.	0.005

8. Efecto de la OEA en la densidad total de microglía el cerebelo del ratón PCD a P30 | OEA effect on total microglial density in PCD cerebellum at P30

Densidad total de microglía Total microglial density	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	< 0.001

9. Efecto de la OEA en la densidad de microglía por lóbulos (L) en el cerebelo del ratón PCD a P30 | OEA effect on microglial density per lobules (L) in PCD cerebellum at P30

LÓBULOS I AL IX vs. LÓBULO X | Lobules I to IX vs. lobule X

Densidad de microglía L I-IX vs. L X Microglial density L I-IX vs. LX	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.978	< 0.001	< 0.001

LÓBULOS I AL IX | Lobules I to IX

Densidad de microglía L I-IX L I-IX Microglial density	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	< 0.001

LÓBULO X | Lobule X

Densidad de microglía L X L X Microglial density	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.121

10. Efecto de la OEA en la densidad de microglía por capas (C) y lóbulos (L) en el cerebelo del ratón PCD a P30 | OEA effect on microglial density per layers (C) and lobules (L) in PCD cerebellum at P30

(CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa granular; CM, capa molecular; GL, granular layer; ML, molecular layer; PCL, Purkinje cell layer)

CM + CCP vs. CG | ML + PCL vs. GL

Densidad de microglía CM + CCP vs. CG (Total) Microglial density ML+PCL vs. GL (Total)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.025	< 0.001	< 0.001

Densidad de microglía CM + CCP vs. CG (L I-IX) Microglial density ML+PCL vs. GL (L I-IX)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.011	< 0.001	< 0.001

Densidad de microglía CM + CCP vs. CG (L X) Microglial density ML+PCL vs. GL (LX)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.489	< 0.001	< 0.001

CM + CCP | ML + PCL

Densidad de microglía CM+CCP (Total) ML + PCL Microglial density (Total)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	< 0.001

Densidad de microglía CM+CCP (L I-IX) ML + PCL Microglial density (L I-IX)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	< 0.001

Densidad de microglía CM+CCP (L X) ML + PCL Microglial density (L X)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.220

CG | GL

Densidad de microglía CG (Total) GL Microglial density (Total)	PCD	OEA P12
WT	0.002	1.000
PCD	.	0.001

Densidad de microglía CG (L I-IX) GL Microglial density (L I-IX)	PCD	OEA P12
WT	0.004	1.000
PCD	.	0.002

Densidad de microglía CG (L X) GL Microglial density (L X)	PCD	OEA P12
WT	0.008	1.000
PCD	.	0.029

11. Efecto de la OEA en el porcentaje de microglía CD45 positiva en el cerebelo del ratón PCD a P30 | OEA effect on the percentage of CD45 positive microglial in PCD cerebellum at P30

% CD45 (Total)

% Microglía CD45 (Total) % CD45 microglia (total)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	1.000

% CD45 (L I-IX)

% Microglía CD45 (L I-IX) % CD45 microglia (L I-IX)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.875

% CD45 (L X)

% Microglía CD45 (L X) % CD45 microglia (L X)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.218

% CD45 (CM + CCP | ML + PCL)

% Microglía CD45 (CM+CCP) % CD45 microglia (ML+PCL)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	1.000

% CD45 (CG | GL)

% Microglía CD45 (CG) % CD45 microglia (GL)	PCD	OEA P12
WT	0.002	1.000
PCD	.	0.003

% CD45 (L I-IX vs. L X)

% Microglía CD45 (L I-IX vs. L X) % CD45 microglia (L I-LIX vs. L X)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.015	0.158	0.221

% CD45 (CM + CCP vs. CG | ML + PCL vs. GL)

% Microglía CD45 (CM+CCP vs. CG) % CD45 microglia (ML+PCL vs. GL)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.002	< 0.001	< 0.001

12. Efecto de la OEA en el porcentaje de microglía CD16/32 positiva en el cerebelo del ratón PCD a P30 | OEA effect on the percentage of CD16/32 positive microglial in PCD cerebellum at P30

% CD16/32 (Total)

% Microglía CD16/32 (Total) % CD16/32 microglia (total)	PCD	OEA P12
WT	0.001	< 0.001
PCD	.	1.000

% CD16/32 (L I-IX)

% Microglía CD16/32 (L I-IX) % CD16/32 microglia (L I-IX)	PCD	OEA P12
WT	0.001	< 0.001
PCD	.	1.000

% CD16/32 (L X)

% Microglía CD16/32 (L X) % CD16/32 microglia (L X)	PCD	OEA P12
WT	0.016	0.286
PCD	.	0.402

% CD16/32 (CM + CCP | ML + PCL)

% Microglía CD16/32 (CM+CCP) % CD16/32 microglia (ML+PCL)	PCD	OEA P12
WT	0.001	0.001
PCD	.	1.000

% CD16/32 (CG | GL)

% Microglía CD16/32 (GL) % CD16/32 microglia (GL)	PCD	OEA P12
WT	0.001	0.001
PCD	.	1.000

% CD16/32 (L I-IX vs. LX)

% Microglía CD16/32 (L I-IX vs. L X) % CD16/32 microglia (L I-LIX vs. L X)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.741	0.019	0.011

% CD16/32 (CM + CCP vs. CG | ML + PCL vs. GL)

% Microglía CD16/32 (CM+CCP vs. CG) % CD16/32 microglia (ML+PCL vs. GL)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.148	0.144	0.006

13. Efecto de la OEA en el porcentaje de microglía CD206 positiva en el cerebelo del ratón PCD a P30 | OEA effect on the percentage of CD206 positive microglial in PCD cerebellum at P30

% CD206 (Total)

% Microglía CD206 (Total) % CD206 microglia (total)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.011

% CD206 (L I-IX)

% Microglía CD206 (L I-IX) % CD206 microglia (L I-IX)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.003

% CD206 (L X)

% Microglía CD206 (L X) % CD206 microglia (L X)	PCD	OEA P12
WT	0.005	0.001
PCD	.	0.859

% CD206 (CM + CCP | ML + PCL)

% Microglía CD206 (CM+CCP) % CD206 microglia (ML+PCL)	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.011

% CD206 (CG | GL)

% Microglía CD206 (GL) % CD206 microglia (GL)	PCD	OEA P12
WT	0.431	0.044
PCD	.	0.619

% CD206 (L I-IX vs. LX)

% Microglía CD206 (L I-IX vs. L X) % CD206 microglia (L I-LIX vs. L X)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.287	0.743	0.345

% CD206 (CM + CCP vs. CG | ML + PCL vs. GL)

% Microglía CD206 (CM+CCP vs. CG) % CD206 microglia (ML+PCL vs. GL)	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.368	< 0.001	< 0.001

14. Efecto de la OEA en la infiltración de leucocitos hacia el parénquima cerebeloso a P30 | OEA effect on leukocyte infiltration towards the cerebellar parenchyma at P30

Densidad de leucocitos (Total) <i>Leukocyte density (Total)</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	0.504
PCD	.	< 0.001

LÓBULOS I AL IX vs. LÓBULO X | Lobules I to IX vs. Lobule X

Densidad de leucocitos (L I-IX vs. LX) <i>Leukocyte (L I-IX vs. LX)</i>	WT	PCD	OEA P12
<i>p-value</i>	0.320	0.073	0.591

LÓBULOS I AL IX | Lobules I to IX

Densidad de leucocitos (L I-IX) <i>Leukocyte density (L I-IX)</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	0.477
PCD	.	< 0.001

LÓBULO X | Lobule X

Densidad de leucocitos (L X) <i>Leukocyte density (L X)</i>	PCD	OEA P12
WT	0.009	1.000
PCD	.	0.002

15. Efecto de la OEA en el comportamiento motor a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD | OEA effect on motor behavior throughout the neurodegenerative process of PCD mice

Latencia a la caída <i>Latency to fall</i>	Grupo Experimental (Experimental group)	Edad (Age)	Grupo experimental*Edad (Experimental group*Age)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	PCD	OEA P12	.
WT	< 0.001	< 0.001	.
PCD	.	0.047	.

Latencia a la caída a P15 <i>Latency to fall at P15</i>	PCD	OEA P12
WT	0.247	0.958
PCD	.	1.000

Latencia a la caída a P17 <i>Latency to fall at P17</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	0.005
PCD	.	0.451

Latencia a la caída a P22 <i>Latency to fall at P22</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	0.003
PCD	.	0.048

Latencia a la caída a P30 <i>Latency to fall at P30</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.019

Latencia a la caída a P40 <i>Latency to fall at P40</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.374

16. Efecto de la OEA en el comportamiento general a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD | OEA effect on general behavior throughout the neurodegenerative process of PCD mice

Limpiezas/Alzadas/Desplazamiento a P15 <i>Grooming/Exploration/Displacement at P15</i>	PCD	OEA P12
WT	0.854 / 0.712 / 1.000	1.000 / 0.372 / 0.835
PCD	.	0.702 / 0.314 / 0.145

Limpiezas/Alzadas/Desplazamiento a P17 <i>Grooming/Exploration/Displacement at P17</i>	PCD	OEA P12
WT	1.000 / 0.120 / 1.000	1.000 / 0.268 / 0.768
PCD	.	1.000 / 0.486 / 0.256

Limpiezas/Alzadas/Desplazamiento a P22 <i>Grooming/Exploration/Displacement at P22</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001 / < 0.001 / < 0.001	< 0.001 / < 0.001 / 0.450
PCD	.	< 0.001 / < 0.001 / 0.035

Limpiezas/Alzadas/Desplazamiento a P30 <i>Grooming/Exploration/Displacement at P30</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001 / < 0.001 / < 0.001	< 0.001 / 0.001 / < 0.001
PCD	.	0.036 / < 0.001 / 0.041

Limpiezas/Alzadas/Desplazamiento a P40 <i>Grooming/Exploration/Displacement at P40</i>	PCD	OEA P12
WT	< 0.001 / < 0.001 / < 0.001	< 0.001 / < 0.001 / 0.005
PCD	.	0.955 / 0.230 / 0.052

17. Efecto de la OEA en la memoria de reconocimiento a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD | OEA effect on recognition memory throughout the neurodegenerative process of PCD mice

PORCENTAJE DE INTERACCIÓN | Interaction percentage

% Interacción objeto novedoso vs. conocido % Interaction novel object vs. familiar one	WT	PCD	OEA P12
P17 p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
P22 p-value	< 0.001	0.002	< 0.001
P30 p-value	< 0.001	0.847	< 0.001
P40 p-value	< 0.001	0.263	0.310

ÍNDICE DE DISCRIMINACIÓN | Discrimination Index

Índice de Discriminación a P17 Discrimination Index at P17	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.002	1.000
	PCD	.	< 0.001
Índice de Discriminación a P22 Discrimination Index at P22	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.002	1.000
	PCD	.	0.001
Índice de Discriminación a P30 Discrimination Index at P30	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.003	0.787
	PCD	.	0.002
Índice de Discriminación a P40 Discrimination Index at P40	WT	PCD	OEA P12
	WT	< 0.001	0.001
	PCD	.	0.048

NÚMERO DE VISITAS | Number of visits

Número de visitas a P17 Number of visits at P17	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.103	0.103
	PCD	.	0.103
Número de visitas a P22 Number of visits at P22	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.106	0.106
	PCD	.	0.106
Número de visitas a P30 Number of visits at P30	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.103	0.103
	PCD	.	0.103
Número de visitas a P40 Number of visits at P40	WT	PCD	OEA P12
	WT	0.011	0.238
	PCD	.	0.047

18. Efecto de la OEA en la preferencia social a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD | OEA effect on social preference throughout the neurodegenerative process of PCD mice

PORCENTAJE DE INTERACCIÓN | Interaction percentage

% Interacción animal vs. objeto % Interaction animal vs. object	WT	PCD	OEA P12
P15 p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001
P17 p-value	< 0.001	0.058	< 0.001
P22 p-value	< 0.001	0.062	< 0.001
P30 p-value	< 0.001	0.478	< 0.001
P40 p-value	< 0.001	0.166	0.320

ÍNDICE DE SOCIABILIDAD | Sociability Index

Índice de Sociabilidad a P15 Sociability Index at P15	PCD	OEA P12
WT	0.002	1.000
PCD	.	0.001
Índice de Sociabilidad a P17 Sociability Index at P17	PCD	OEA P12
WT	0.009	1.000
PCD	.	0.006
Índice de Sociabilidad a P22 Sociability Index at P22	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	0.061
PCD	.	0.030
Índice de Sociabilidad a P30 Sociability Index at P30	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	0.001
PCD	.	< 0.001
Índice de Sociabilidad a P40 Sociability Index at P40	PCD	OEA P12
WT	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.045

NÚMERO DE VISITAS | Number of visits

Número de visitas a P15 Number of visits at P15	PCD	OEA P12
WT	0.096	0.096
PCD	.	0.096
Número de visitas a P17 Number of visits at P17	PCD	OEA P12
WT	0.091	0.091
PCD	.	0.091
Número de visitas a P22 Number of visits at P22	PCD	OEA P12
WT	0.343	0.343
PCD	.	0.343
Número de visitas a P30 Number of visits at P30	PCD	OEA P12
WT	0.268	1.000
PCD	.	0.046
Número de visitas a P40 Number of visits at P40	PCD	OEA P12
WT	0.022	0.416
PCD	.	0.496

19. Implicación del receptor PPAR α en los efectos de la OEA a nivel histológico de la administración de OEA en el ratón PCD a P30 | Involvement of PPAR α receptors in the histological effects of OEA in PCD mice at P30

Área soma <i>Soma area</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	< 0.001	1.000
	OEA P12	.	< 0.001

Longitud árbol dendrítico <i>Dendritic arbor length</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	< 0.001	0.028
	OEA P12	.	< 0.001

Longitud dendrita primaria <i>Main dendrite length</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	0.001	1.000
	OEA P12	.	0.008

Grosor dendrita primaria <i>Main dendrite width</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	< 0.001	1.000
	OEA P12	.	0.001

Densidad Células Purkinje <i>Purkinje cell density</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	0.002	0.011
	OEA P12	.	< 0.001

20. Implicación del receptor PPAR α en los efectos de la OEA a nivel de comportamiento en el ratón PCD a P30 | Involvement of PPAR α receptors in the OEA effects on PCD mouse behavior at P30

Latencia a la caída a P30 <i>Latency to fall at P30</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	0.004	1.000
	OEA P12	.	0.041

Limpiezas/Alzadas/Desplazamiento a P30 <i>Grooming/Exploration/Displacement at P30</i>		OEA P12	GW6471 + OEA P12
	PCD	0.001 / < 0.001 / 0.048	1.000 / 0.324 / 1.000
	OEA P12	.	0.003 / 0.034 / 0.030

% Interacción objeto novedoso vs. conocido <i>% Interaction novel object vs. familiar one</i>	PCD	OEA P12	GW6471 + OEA P12
P30 p-value	0.847	< 0.001	0.105

% Interacción animal vs. objeto <i>% Interaction animal vs. object</i>	PCD	OEA P12	GW6471 + OEA P12
P30 p-value	0.478	< 0.001	0.796

ESTRATEGIA II. TRATAMIENTO COMBINADO OEA Y BMSC | APPROACH II. OEA AND BMSC COMBINED TREATMENT

21. Análisis de la reconstitución de la médula ósea tras la mieloablación y el tratamiento combinado | Bone marrow reconstitution after myeloablation and combined treatment

% de células GFP+ en sangre periférica % GFP+ cells in peripheral blood	P35	P40
P30	0.363	0.179
P35	.	1.000

22. Efecto del tratamiento combinado OEA + BMSC en comportamiento motor de los animales PCD | Effect of OEA + BMSC combined treatment on PCD motor behavior

Latencia a la caída Latency to fall	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)
<i>p-value</i>	0.312	0.294	0.002
	PCD	OEA	OEA + BMSC
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.047	0.049
OEA	.	.	1.000

Latencia a la caída a P22 Latency to fall at P22	PCD	OEA	OEA + BMSC
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.048	1.000
OEA	.	.	1.000

Latencia a la caída a P30 Latency to fall at P30	PCD	OEA	OEA + BMSC
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.019	0.003
OEA	.	.	0.396

Latencia a la caída a P40 Latency to fall at P40	PCD	OEA	OEA + BMSC
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.540	0.348
OEA	.	.	1.000

EXCLUYENDO EL GRUPO EXPERIMENTAL WT | Excluding WT experimental group

Latencia a la caída a P22 Latency to fall at P22	OEA	OEA + BMSC
PCD	< 0.001	0.008
OEA	.	0.106

Latencia a la caída a P30 Latency to fall at P30	OEA	OEA + BMSC
PCD	0.008	< 0.001
OEA	.	0.043

Latencia a la caída a P40 Latency to fall at P40	OEA	OEA + BMSC
PCD	< 0.001	< 0.001
OEA	.	0.983

23. Efecto del tratamiento combinado OEA + BMSC a nivel histológico a P30 | Effect of OEA + BMSC combined treatment at a histological level at P30

Área soma <i>Soma area</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	< 0.001	< 0.001
	OEA	.	0.222

Longitud árbol dendrítico <i>Dendritic arbor length</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	< 0.001	0.067
	OEA	.	< 0.001

Longitud dendrita primaria <i>Main dendrite length</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	0.001	0.294
	OEA	.	0.077

Grosor dendrita primaria <i>Main dendrite width</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	< 0.001	0.004
	OEA	.	0.810

Densidad Células Purkinje <i>Purkinje cell density</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	0.005	0.011
	OEA	.	1.000

24. Efecto del tratamiento combinado OEA + BMSC a nivel histológico P30 vs. P40 | Effect of OEA + BMSC combined treatment at a histological level P30 vs. P40

Área soma Soma area	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	OEA	OEA + BMSC	.
PCD	< 0.001	< 0.001	.
OEA	.	0.247	.

Longitud árbol dendrítico Dendritic arbor length	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	OEA	OEA + BMSC	.
PCD	< 0.001	1.000	.
OEA	.	< 0.001	.

Longitud dendrita primaria Main dendrite length	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)
<i>p-value</i>	< 0.001	0.624	0.742
	OEA	OEA + BMSC	.
PCD	< 0.001	0.033	.
OEA	.	0.044	.

Grosor dendrita primaria Main dendrite width	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	0.001
	OEA	OEA + BMSC	.
PCD	< 0.001	< 0.001	.
OEA	.	1.000	.

Densidad Células Purkinje Purkinje cell density	Tratamiento (Treatment)	Edad (Age)	Tratamiento*Edad (Treatment*Age)
<i>p-value</i>	< 0.001	< 0.001	0.016
	OEA	OEA + BMSC	.
PCD	< 0.001	0.002	.
OEA	.	1.000	.

25. Efecto del tratamiento combinado OEA + BMSC a nivel histológico a P40 | Effect of OEA + BMSC combined treatment at a histological level at P40

Área soma <i>Soma area</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	0.048	0.016
	OEA	.	1.000

Longitud árbol dendrítico <i>Dendritic arbor length</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	1.000	0.012
	OEA	.	0.032

Longitud dendrita primaria <i>Main dendrite length</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	0.014	0.174
	OEA	.	0.742

Grosor dendrita primaria <i>Main dendrite width</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	1.000	0.002
	OEA	.	0.008

Densidad Células Purkinje <i>Purkinje cell density</i>		OEA	OEA + BMSC
	PCD	0.311	0.049
	OEA	.	0.330

26. Efecto del tratamiento combinado OEA + BMSC en el peso corporal de los animales | Effect of OEA + BMSC combined treatment on animal body weight

Peso corporal a P30 <i>Body weight at P30</i>		PCD	OEA	OEA + BMSC
	WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	PCD	.	1.000	0.002
	OEA	.	.	0.009

Peso corporal a P40 <i>Body weight at P40</i>		PCD	OEA	OEA + BMSC
	WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	PCD	.	1.000	< 0.001
	OEA	.	.	< 0.001

ESTRATEGIA III. TRATAMIENTO COMBINADO OEA Y MSCs | APPROACH III. OEA AND MSCs COMBINED TREATMENT

27. Efecto del tratamiento combinado OEA + MSCs en comportamiento motor de los animales PCD | Effect of OEA + MSCs combined treatment on PCD motor behavior

Latencia a la caída Latency to fall	Grupo Experimental (Experimental group)	Edad (Age)	Grupo experimental*Edad (Experimental group*Age)	
<i>p-value</i>	0.412	0.903	≤ 0.001	
	PCD	OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.041	0.049	1.000
OEA	.	.	1.000	1.000
OEA + BMSC	.	.	.	1.000

Latencia a la caída a P22 Latency to fall at P22	PCD	OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.751	1.000	1.000
OEA	.	.	1.000	1.000
OEA + BMSC	.	.	.	1.000

Latencia a la caída a P30 Latency to fall at P30	PCD	OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
PCD	.	0.976	0.004	1.000
OEA	.	.	0.608	1.000
OEA + BMSC	.	.	.	1.000

EXCLUYENDO EL GRUPO EXPERIMENTAL WT | Excluding WT experimental group

Latencia a la caída a P22 Latency to fall at P22	OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
PCD	< 0.001	0.014	1.000
OEA	.	0.199	0.007
OEA + BMSC	.	.	0.034

Latencia a la caída a P30 Latency to fall at P30	OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
PCD	0.010	< 0.001	0.258
OEA	.	0.047	1.000
OEA + BMSC	.	.	1.000

28. Efecto del tratamiento combinado OEA + MSCs a nivel histológico a P30 | Effect of OEA + MSCs combined treatment at a histological level at P30

Área soma <i>Soma area</i>		OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
	PCD	< 0.001	< 0.001	0.001
	OEA	.	0.377	0.073
	OEA + BMSC	.	.	1.000

Longitud árbol dendrítico <i>Dendritic arbor length</i>		OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
	PCD	< 0.001	0.105	0.264
	OEA	.	< 0.001	< 0.001
	OEA + BMSC	.	.	1.000

Longitud dendrita primaria <i>Main dendrite length</i>		OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
	PCD	0.001	0.503	1.000
	OEA	.	0.118	0.065
	OEA + BMSC	.	.	1.000

Grosor dendrita primaria <i>Main dendrite width</i>		OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
	PCD	< 0.001	0.007	< 0.001
	OEA	.	1.000	0.367
	OEA + BMSC	.	.	0.074

Densidad Células Purkinje <i>Purkinje cell density</i>		OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
	PCD	0.008	0.020	0.048
	OEA	.	1.000	1.000
	OEA + BMSC	.	.	1.000

29. Efecto del tratamiento combinado OEA + MSCs en el peso corporal de los animales | Effect of OEA + MSCs combined treatment on animal body weight

Peso corporal a P30 <i>Body weight at P30</i>		PCD	OEA	OEA + BMSC	OEA + MSCs
	WT	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	PCD	.	1.000	0.002	1.000
	OEA	.	.	0.009	1.000
	OEA + BMSC	.	.	.	0.003

Apéndice IV | *Appendix IV*

ARTÍCULO BASADO EN LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS DOCTORAL/*SCIENTIFIC ARTICLE*
BASED ON THE FINDINGS REPORTED IN THIS DOCTORAL THESIS



Oleoylethanolamide Delays the Dysfunction and Death of Purkinje Cells and Ameliorates Behavioral Defects in a Mouse Model of Cerebellar Neurodegeneration

Ester Pérez-Martín^{1,2} · Rodrigo Muñoz-Castañeda^{1,2} · Marie-Jo Moutin³ · Carmelo A. Ávila-Zarza^{2,4} · José M. Muñoz-Castañeda⁵ · Carlos Del Pilar^{1,2} · José R. Alonso^{1,2,6} · Annie Andrieux³ · David Díaz^{1,2} · Eduardo Weruaga^{1,2}

Accepted: 16 March 2021
© The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc. 2021

Abstract

Oleoylethanolamide (OEA) is an endocannabinoid that has been proposed to prevent neuronal damage and neuroinflammation. In this study, we evaluated the effects of OEA on the disruption of both cerebellar structure and physiology and on the behavior of Purkinje cell degeneration (PCD) mutant mice. These mice exhibit cerebellar degeneration, displaying microtubule alterations that trigger the selective loss of Purkinje cells and consequent behavioral impairments. The effects of different doses (1, 5, and 10 mg/kg, i.p.) and administration schedules (chronic and acute) of OEA were assessed at the behavioral, histological, cellular, and molecular levels to determine the most effective OEA treatment regimen. Our *in vivo* results demonstrated that OEA treatment prior to the onset of the preneurodegenerative phase prevented morphological alterations in Purkinje neurons (the somata and dendritic arbors) and decreased Purkinje cell death. This effect followed an inverted U-shaped time-response curve, with acute administration on postnatal day 12 (10 mg/kg, i.p.) being the most effective treatment regimen tested. Indeed, PCD mice that received this specific OEA treatment regimen showed improvements in motor, cognitive and social functions, which were impaired in these mice. Moreover, these *in vivo* neuroprotective effects of OEA were mediated by the PPAR α receptor, as pretreatment with the PPAR α antagonist GW6471 (2.5 mg/kg, i.p.) abolished them. Finally, our *in vitro* results suggested that the molecular effect of OEA was related to microtubule stability and structure since OEA administration normalized some alterations in microtubule features in PCD-like cells. These findings provide strong evidence supporting the use of OEA as a pharmacological agent to limit severe cerebellar neurodegenerative processes.

Keywords Cerebellum · Endocannabinoid · Neurodegeneration · Neuroprotection · OEA · Purkinje cell

Introduction

Microtubule defects are known to be the basis of several brain diseases [1–9], even causing the death of neural populations [10–13]. Recently, we showed that excess

polyglutamylated induces alterations in both the dynamics and structure of microtubules in Purkinje cell degeneration (PCD) mice [9, 10, 13, 14]. These animals harbor a mutation in the *Nnal/Ccp1* gene, which encodes carboxypeptidase 1 (CCP1), an enzyme responsible for the deglutamylation of microtubules. A lack of activity of this enzyme triggers

These authors Ester Pérez-Martín and Rodrigo Muñoz-Castañeda contributed equally to this work.

✉ David Díaz
ddiaz@usal.es

✉ Eduardo Weruaga
ewp@usal.es

¹ Laboratory of Neuronal Plasticity and Neurorepair, Institute for Neurosciences of Castile and Leon (INCYL), University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

² Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), 37007 Salamanca, Spain

³ GIN, Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Grenoble Institute Neurosciences, Inserm, U121638000 Grenoble, France

⁴ Department of Statistics, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

⁵ Department of Theoretical, Atomic and Optical Physics, University of Valladolid, 47071 Valladolid, Spain

⁶ Universidad de Tarapacá, Arica, Chile

excessive microtubule polyglutamylation and subsequent postnatal Purkinje cell death [10, 13]. The neuronal degeneration caused by the loss of CCPI activity is a complex process involving two clearly distinct phases: a preneurodegenerative stage from postnatal day (P) 15 to P18, which is characterized by nuclear, cytological, and morphological alterations in Purkinje cells, and a neurodegenerative stage from P18 onwards, in which Purkinje cells die [14–16]. Purkinje cell degeneration at these ages contributes not only to motor dysfunction but also to gradual cognitive and social impairments in PCD mice throughout the cerebellar degeneration process, as has been reported in other models in which the cerebellum is affected [14, 17–19]. During preneurodegeneration, the exploratory and social behaviors of PCD mutants on C57BL/DBA background are affected, showing less rearing time and a lack of social preference compared to wild-type (WT) animals [14, 20]. From the beginning of the neurodegeneration stage, PCD mutants were impaired in motor tasks, grooming behavior and memory recognition, showing lower fall latency in the *rotarod* test, differences in the time spent in grooming and a lack of novelty discrimination compared to the behavior of WT mice [14, 19]. This animal model recapitulates key features of the infantile-onset neurodegeneration and cerebellar atrophy observed in humans with a monogenic biallelic mutation in *CCPI* [7, 21]. Thus, the PCD mutant mouse is a very suitable model for exploring and assessing different therapeutic approaches for treating severe human degenerative disorders.

The endocannabinoid system plays an essential role in microtubule-related brain diseases, and some of its components have been reported to exert neuroprotective effects [22–25]. However, to our knowledge, there have been no studies addressing the use of noncanonical endocannabinoids as therapeutic agents for the treatment of these neurodegenerative diseases. In this sense, the endocannabinoid oleoylethanolamide (OEA) has been shown to prevent neuronal damage and neuroinflammation in different animal models of brain disease and mental disorders [26–34]. Moreover, the binding of OEA to peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) [35–38] triggers the expression of different microtubule-associated proteins that may influence the stability of microtubules, preventing neurons from degenerating [39]. Thus, OEA has emerged as a promising therapeutic agent for preventing microtubule-related neurodegeneration and reversing subsequent neurobehavioral impairments.

Therefore, the objective of this work was to examine the effect of OEA on cerebellar degeneration and neurobehavioral defects in PCD mice. To this end, we analyzed the general cerebellar structure and the morphology and survival of Purkinje cells after administering OEA at different dosages to PCD mice *in vivo*. Then, we explored the effect of OEA on motor, cognitive and social functions, which are

impaired in this animal model. Additionally, we assessed the involvement of PPAR α receptors in the effects of OEA observed *in vivo*. Finally, we employed an additional *in vitro* model to identify the cellular mechanisms triggered by OEA, which could not be properly analyzed *in vivo*. To this end, we examined microtubule dynamics and structure in *Ccp1*-KO cells by exposing them to different doses of OEA.

Materials and Methods

Animals

Mice were housed under a 12-h/12-h light/dark cycle at a constant room temperature and humidity and provided *ad libitum* access to water and special rodent chow at the Animal Facilities of the University of Salamanca (Salamanca, Spain) or Joseph Fourier University (Grenoble, France). All animal procedures were approved by Bioethics Committees of both the University of Salamanca and Joseph Fourier University and were performed in accordance with the guidelines established by European (2010/63/UE) and national legislations (Spanish RD53/2013 and Law 32/2007; French permit no. 38 07 11). All efforts were made to minimize animal suffering and to use the fewest animals required to produce statistically relevant results.

WT and mutant *pcd*^{1J} (PCD) mice on a C57BL/DBA background were obtained from Jackson Labs and employed for all the *in vivo* procedures, and WT and *Ccp1*-KO mouse embryos were used to isolate cells for the *in vitro* experiments. *Ccp1*-KO mice are considered equivalent to the standard PCD mouse model since like PCD mice, they lack the expression of *Ccp1* mRNA [10, 14]. The procedures for *Ccp1*-KO-derived cell culture and subsequent *in vitro* analyses (see below) were standardized at Joseph Fourier University to ensure the feasibility of these experiments.

The *in vivo* or *in vitro* studies are described separately below.

In vivo Studies

In vivo Experimental Design

To facilitate the presentation of the *in vivo* procedures performed in this study, we provide a summary of the workflow, experimental groups and sample size for each set of experiments below.

1. Before the start of the *in vivo* OEA experiments, the expression of the endocannabinoid PPAR α receptor in WT and PCD mice during postnatal development period was measured since PPAR α is considered the main receptor through which OEA exerts its action [33].

Animals were sorted on the basis of genotype (WT or PCD) and age at analysis (P7, P15, P17, P22, or P30; $n = 4$ animals per group).

- To assess the effect of OEA treatment at the histological level, a different set of animals was employed and analyzed at P30. The experiments were divided into two phases, as depicted in Fig. 1. In the first set of experiments (Fig. 1, *Phase I*) we aimed to determine the best drug dose (0, 1, 5, or 10 mg/kg) and schedule of administration (chronically from P7 to P21 or acutely at P14 or P16, which is one day before or one day after the preneurodegenerative process begins, respectively; $n = 4$ animals per group) to identify the optimal therapeutic dosage of OEA. Based on the results obtained, we performed a second experiment (Fig. 1, *Phase II*) in which we refined the critical therapeutic window of OEA by acutely administering the most effective dose (10 mg/kg, see results) of OEA at three different ages: P14, P12 and P10 (i.e., one, three and five days before the onset of preneurodegeneration in PCD mice, respectively; $n = 7$ animals per group). We employed untreated PCD mice as controls in both experiments ($n = 4-7$ animals).
- To verify whether the neuroprotective effect of OEA in PCD mice also translates to an improvement in behavior, WT and untreated and treated PCD mice ($n = 8-9$ animals per group) were subjected a wide set of behavioral tasks (described in detail later). To reduce the number of animals, only the most effective OEA treatment regimen was used based on the histological analyses described above. Moreover, the groups of animals subjected to behavioral tests were also employed for histological evaluation of the long-term effect of OEA treatment at P40.

- Finally, to confirm the direct involvement of PPAR α receptors in the observed *in vivo* OEA effects at both the histological and behavioral levels, an additional group of PCD mice was pretreated with the PPAR α antagonist GW6471 and analyzed at P30 ($n = 7$ animals).

The detailed *in vivo* experimental methodology is described below.

Drug Administration

Both OEA (Calbiochem, San Diego, USA) and the PPAR α antagonist GW6471 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) were freshly prepared on the day of administration to avoid drug degradation. Both compounds were dissolved separately in 100% ethanol v/v and diluted in H₂O Elix. OEA was administered by intraperitoneal injection (i.p.) at a dose of 1, 5 or 10 mg/kg b.w. according to previous studies [26, 28, 29]. When GW6471 was required, it was administered i.p. at a dose of 2.5 mg/kg b.w. 15 min before OEA treatment. PCD control animals were injected i.p. with 0.9% NaCl w/v. All animals were treated in the morning. The body weight of each animal was monitored throughout the entire experiment because OEA has anorexigenic side effects [35, 38, 40].

Tissue Extraction and Preparation

Animals were deeply anesthetized at P7, P15, P17, P22, P30, or P40 (depending on the experiment) with 10 μ l/g b.w. chloral hydrate (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) and intracardially perfused with 0.9% NaCl w/v followed by 5 ml/g b.w. modified Somogyi's fixative consisting of 4%

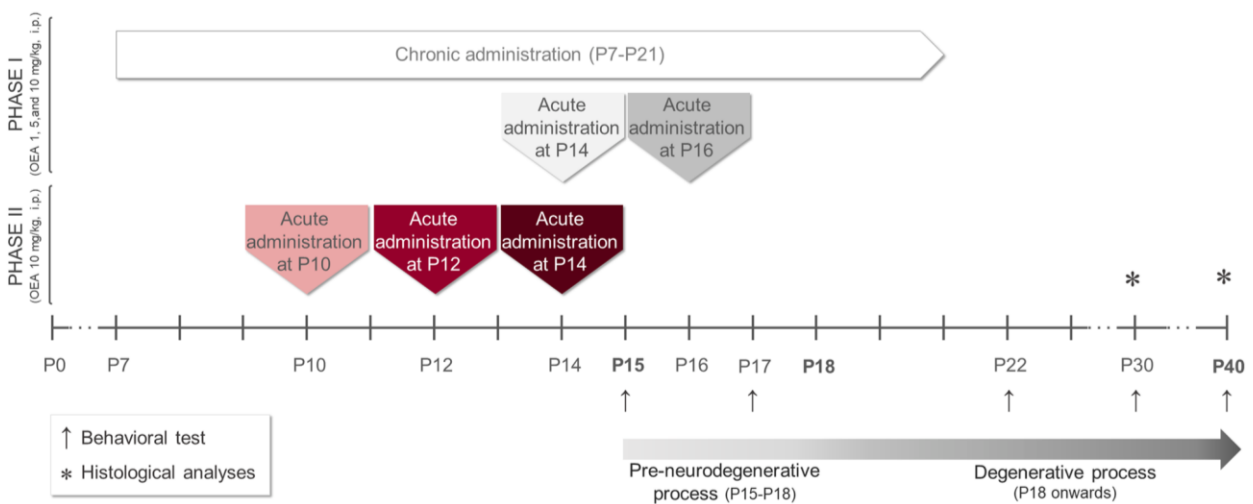


Fig. 1 The experimental *in vivo* paradigm. The timeline details the two sets of experiments of the OEA treatment, the time points for behavioral testing and tissue collection, and their relationship with the neurodegenerative process of the PCD mouse

paraformaldehyde w/v. Cerebella were sectioned sagittally using a freezing-sliding microtome (Leica Jung SM 2000, Nussloch, Germany; 30 μm thick) and washed in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.

Immunofluorescence

Free-floating sections were incubated at 4°C for 72 h under continuous rotation in 0.2% Triton X-100 v/v, 5% normal serum v/v and the following primary antibodies diluted in PBS: guinea pig anti-CB1 (1:1,000; Frontier Institute, Hokkaido, Japan), rabbit anti-PPAR α (1:100; Pierce Antibodies, Rockford, IL, USA), and mouse anti-calbindin D-28k (Cb28k; 1:1000; Swant, Bellinzona, Switzerland). The following primary antibodies were employed for complementary analyses: goat anti-CB2 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and mouse anti-S100 (1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Different combinations of these antibodies were used for each experiment. Then, the sections were incubated with appropriate secondary antibodies conjugated to Cy2, Cy3, or Cy5 (1:500; Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA) for 2 h at room temperature and counterstained with DAPI (1:10,000; Sigma-Aldrich) to identify the cell nuclei. For all histological analyses, four equidistant vermis parasagittal sections were assessed for each mouse.

Quantification of the Endocannabinoid PPAR α

The percentage of Purkinje cells expressing PPAR α in parasagittal sections of the vermis during postnatal cerebellar development (P7, P15, P17, P22, and P30) was analyzed by immunostaining for both PPAR α and Cb28k. Only Purkinje cells with clear Cb28k+ somata and complete nuclei stained with DAPI were counted to avoid biases. Additionally, changes in the percentage of these cells expressing PPAR α in PCD mice were evaluated after OEA treatment at P30.

Density and Morphological Analyses of Purkinje Cells

Both analyses were performed on parasagittal sections of the vermis immunostained for Cb28k. Only Purkinje cells with clear Cb28k+ somata and dendritic arbors and complete nuclei stained with DAPI were analyzed to avoid planimetric biases. Purkinje cell survival was expressed as the Purkinje cell linear density, which was calculated as the number of Purkinje cell somata per mm of the Purkinje cell layer (from lobule I to lobule X of the vermis) in each section. Then, the following morphological parameters were analyzed: (1) soma area, (2) length of Purkinje cell dendritic arbors (i.e., molecular layer thickness), and (3) length and (4) width of the primary dendrite. These analyses were performed at both P30 and P40 and carried out

using NeuroLucida (MBF Bioscience, Williston, Vermont, USA) and ImageJ (NIH, USA) software, as previously described [14].

Behavioral Analyses

A battery of tests of behaviors associated with cerebellar function was performed at P15, P17, P22, P30, and P40 between 9:00 am and 1:00 pm. Video recordings were obtained and meticulously analyzed by a researcher blinded to the experimental conditions (E P-M). After each trial, the various apparatuses and objects were cleaned with 70% ethanol v/v.

The *rotarod test* (Panlab, Barcelona, Spain) was used to assess motor coordination as previously described [14]. The rod accelerated at a rate of 0.06 rpm/s from 4 to 40 rpm for 10 min (rod diameter = 30 mm). The latency to fall off was measured in seven trials per day with 20-min intervals between trials. The mean latency was calculated for each mouse on each day of the task.

Home-cage behavior analysis was used to characterize general behavior [14]. After 10 min of habituation, grooming time (innate stereotyped behavior), rearing time (environmental exploratory behavior), time spent moving (general movement), time in activity and resting time were analyzed. Each animal was assigned to an individual home cage to avoid the influence of odor emitted from the other animals.

The *novel object recognition (NOR) test* was performed to evaluate long-term object recognition memory in rodents [41, 42]. On the first day (P15), two identical objects placed in opposite corners of a cage were presented to a single animal for 10 min. Then, in each of the following sessions (at P17, P22, P30, and P40), the animals were returned to the cage, which contained the familiar object and a novel one. All objects were made of plastic and were of different colors and shapes but of similar size. Two different measures of discriminatory behavior were analyzed. The first measure was the percentage of time exploring the novel (T_N) and familiar (T_F) objects, which was calculated as follows:

$$\%T_N = \frac{T_N}{T_N + T_F}, \%T_F = \frac{T_F}{T_N + T_F}.$$

The second measure was the discriminatory index (DI), which was calculated as follows:

$$DI = \frac{T_N - T_F}{T_N + T_F}.$$

The DI can vary between +1 and -1, with a positive score indicating more time spent exploring the novel object, a negative score indicating more time spent exploring the familiar object, and zero indicating a lack of preference [43].

The *three-chambered social preference test* was performed to assess sociability in a white Plexiglas box (50 × 29 cm) divided into three connected chambers [14, 44]. After 10 min of habituation, each mouse was placed in the three-chambered box containing either a mouse of the same age and sex or an object, both of which covered by a similar drilled pencil cup and placed in each of the lateral rooms of the box. The results were expressed as two different measures of sociability and preference. The first was the percentage of time spent interacting with the animal (T_A) and the object (T_O), which was calculated as follows:

$$\%T_A = \frac{T_A}{T_A + T_O}, \%T_O = \frac{T_O}{T_A + T_O}.$$

Analogous to the DI, the sociability index (SI) was calculated as follows:

$$SI = \frac{T_A - T_O}{T_A + T_O}.$$

In this case, the SI can also vary between +1 and -1, with a positive score indicating a preference for social interaction, a negative score indicating an avoidance of social interaction and zero indicating the lack of any preference concerning socialization.

In vitro Study

Cell Culture and Transfection

To study whether the effect of OEA is related to changes in microtubule stability, which is affected in PCD cells, we employed a standardized *in vitro* system based on mouse embryonic fibroblasts (MEFs) since this approach allows visualization of individual microtubules and measurement of parameters related to their morphology and dynamics [14]. The cell culture and transfection techniques required for these analyses compromise the viability of PCD-derived neurons and thus the ability to obtain reliable data [14]. For this reason, *Ccp1*-KO MEFs were employed for these analyses. The animal source of these cells is considered equivalent to PCD mice since they also lack mRNA expression of *Ccp1* [10, 14]. All the procedures were standardized in these PCD-like cells at Joseph Fourier University to ensure the feasibility and reliability of these experiments. MEFs from the brains of 13.5-day-old WT and *Ccp1*-KO mouse embryos were isolated following standard procedures as previously described [14, 45, 46]. Briefly, MEFs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) until they reached 80% confluence. Afterwards, to

visualize microtubules, MEFs were transfected with different plasmids; Nucleofector™ Kits for MEFs (Amaxa Biosystems) were used to transfect cells with GFP-EB3 to visualize microtubule plus-ends in green (provided by N. Galjart, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands) and m-cherry α -tubulin to visualize the entire microtubule structure in red (provided by F. Saudou, Curie Institute, Paris, France) as previously described [14].

Cell Culture Treatments

Cells were divided into experimental groups (n = 3 embryos per group) on the basis of genotype (WT or PCD) and the concentration of OEA administered (0, 0.1, 0.5, or 1.0 μ M) based on previous works [26]. OEA was dissolved in 100% DMSO and stored at -80°C. On the day of the experiment, OEA was diluted in culture medium (DMEM + 10% FBS) at the appropriate concentration and added to the cells. Control (untreated) cells from WT and PCD animals were also cultured with the same concentration of DMSO to avoid possible confounding effects.

Analysis of Microtubule Structure and Dynamics

Microtubule dynamics were analyzed using images from time-lapse videos of GFP-EB3 staining and plusTipTracker software [47]. Time-lapse videos of transfected MEFs were captured with an inverted microscope (Axio-vert 200 M; Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany) and a × 100 NA 1.3 Plan-Neofluar oil objective that was controlled with MetaMorph software (MDS Analytical Technologies, CA, USA). Images were captured with a charge-coupled device camera (CoolSNAP HQ; Roper Scientific, Vianen, The Netherlands) every 3 s for 5 min. The parameters that were analyzed were growth and shrinking speed; growth and shrinking mean length; percentage of time in pause, growing, and shrinking; frequency of catastrophes (changes from growing to shrinking); frequency of rescues (changes from shrinking to growing); microtubule curvature (statics); and microtubule trajectory curvature (movement) based on previous studies [14, 46, 47]. Briefly, parameters related to growth and shrinking processes were analyzed using the complete sequence images time-lapse videos of GFP-EB3 (labels microtubule plus-ends) staining, whereas for static microtubule curvature analysis, the first image of each video time-lapse video of m-cherry α -tubulin (labels the entire microtubule) staining was employed. Additionally, for GFP-EB3 labeling, we obtained the maximum projection of the entire time-lapse video, allowing us to reconstruct the movement trajectory curvatures of the microtubule plus-ends as previously described [14].

Statistical Analysis

The results are expressed as the means \pm standard errors of the mean (SEMs). Homoscedasticity and normality were checked prior to all of the statistical analyses (Kolmogorov–Smirnov’s and Levene’s tests). Due to the complexity and variability of the conditions analyzed in the *in vivo* and *in vitro* experiments and to facilitate comprehension, each statistical test and the variables compared are provided with the results of each corresponding experiment. All analyses were performed using SPSS software for Windows V25 (IBM, NY, USA).

Results

Expression of Endocannabinoid Receptors in PCD Mice

Before starting the *in vivo* OEA experiment, we analyzed the expression of components of the endocannabinoid system throughout postnatal cerebellar development, focusing primarily on PPAR α since it is considered the main target through OEA exerts its actions [35]. On the one hand, PPAR α was detected and quantitatively analyzed in the three cerebellar layers of the cerebellum in both genotypes at all analyzed (Fig. 2a–c). However, Student’s *t* test showed that the percentage of Purkinje cells expressing PPAR α was slightly lower in the mutant animals than in the WT animals from P15 onward (Fig. 2d; P15, $p < 0.05$; P17, $p < 0.05$; P22, $p < 0.05$). On the other hand, due to the diffuse expression and distribution of the canonical cannabinoid receptors CB1 and CB2 in the cerebellum, the analysis of their expression was qualitatively performed. CB1 receptors were expressed in the molecular layer from P7 onwards and in the basket cells of “Pinceaux formation” from P17 onwards. However, no qualitative differences in CB1 expression were detected between genotypes at any of the ages analyzed (Fig. 2c). By contrast, the expression of CB2 seemed to increase in the PCD mice during the neurodegenerative process (from P22) and colocalized with the apical radial processes of the Bergmann glial cells (Supplementary Fig. 1). Anyway, the finding that PPAR α is expressed in the cerebellum led us to believe that OEA may exert a neuroprotective effect on Purkinje cells in PCD mice *in vivo*.

OEA Administration Increases PPAR α Expression in PCD Mice

After demonstrating that PPAR α is expressed during postnatal cerebellar development, we assessed the influence of OEA administration on the expression of PPAR α in PCD mice. One-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc

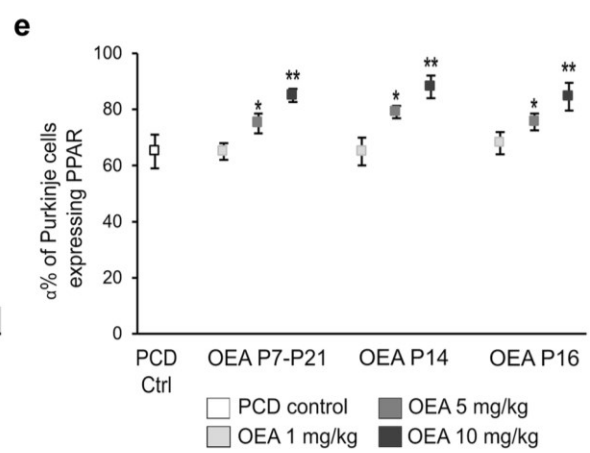
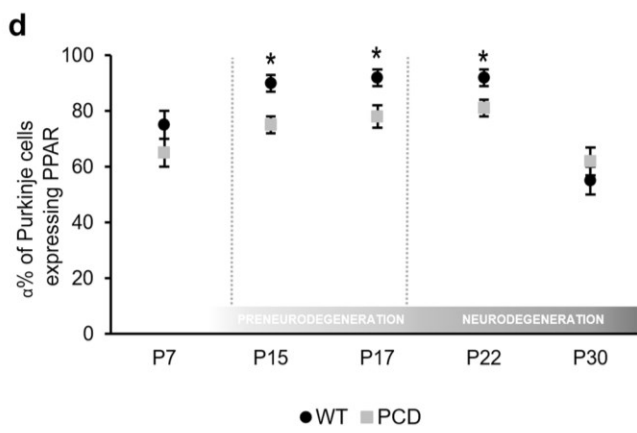
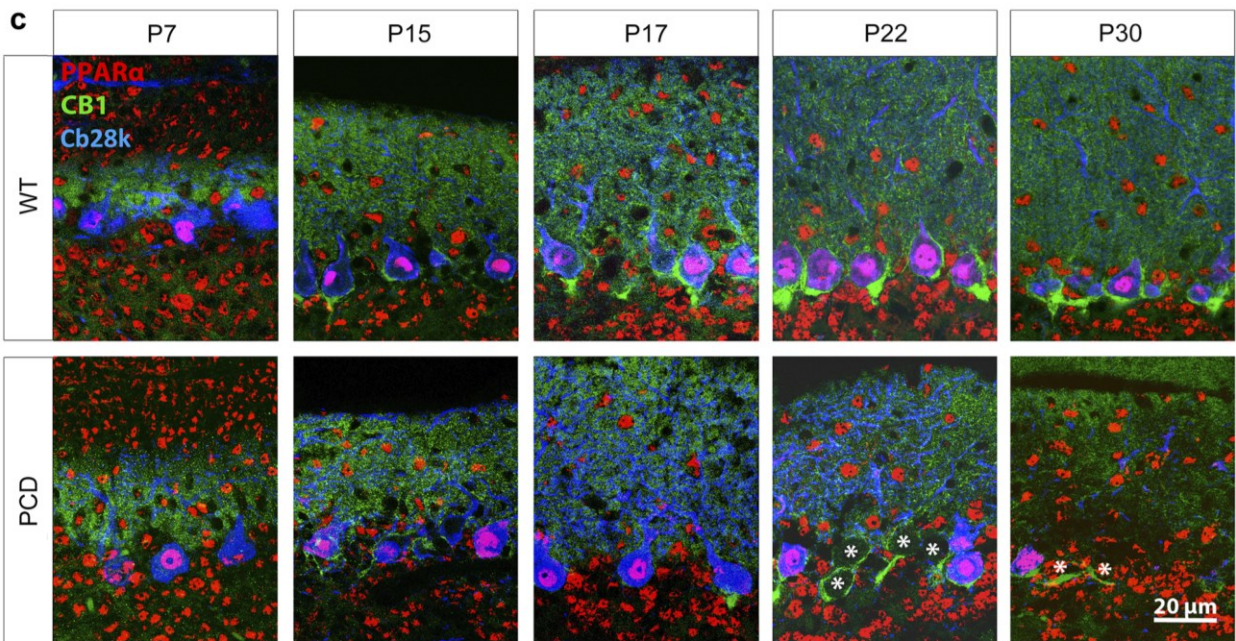
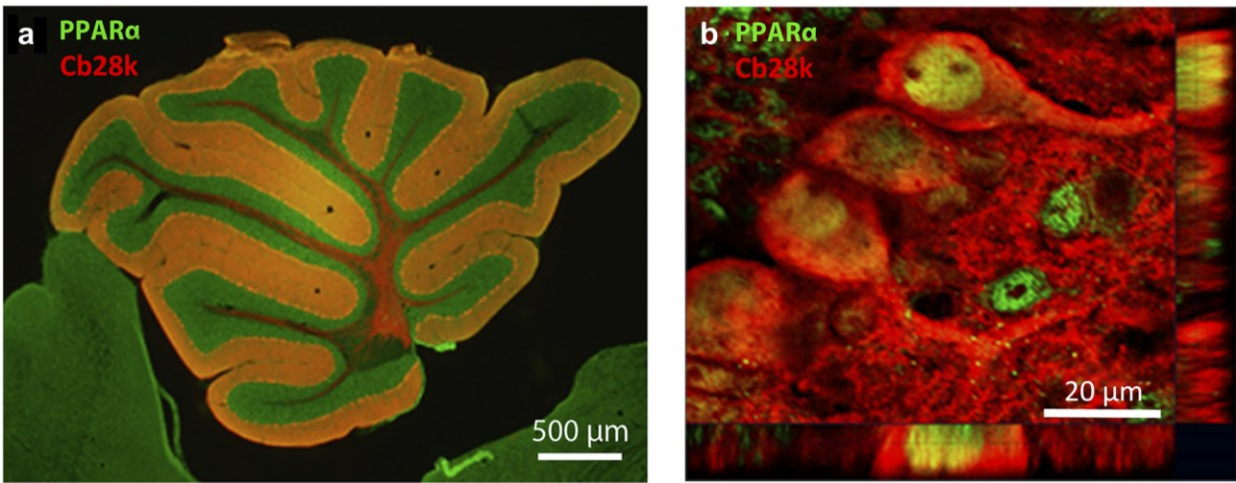
Fig. 2 Expression of the PPAR α endocannabinoid receptor in the cerebellum. **(a, b)** Sagittal section of the vermis of a WT mouse **(a)** and confocal image with tridimensional projection **(b)** showing the co-localization of PPAR α (green) in Purkinje cells (Cb28k, red) at P30. **(c)** Micrographs showing the expression of the PPAR α (red), CB1 receptor (green), and Purkinje cells (Cb28k, blue) in WT and PCD mice throughout the postnatal cerebellar development (P7, P15, P17, P22, P30); PPAR α expression can be observed in the three cerebellar layers at all postnatal ages. The CB1 receptor is expressed in the molecular layer from P7 onwards. In addition, from P15 onward, the CB1 receptor begins to be expressed around Purkinje cell somata (Cb28k positive), leading to the “Pinceaux formation.” **(d)** Quantification of the percentage of Purkinje cells expressing PPAR α at different time points of the postnatal cerebellar development; note that this value is lower in PCD mice than in WT from P15 to P22. **(e)** Quantification of the percentage of PCD’s Purkinje cells expressing PPAR α at P30 after different OEA dosages; OEA administration leads to an increase in the number of Purkinje cells expressing PPAR α in the three different treatments at doses of 5 and 10 mg/kg. Data are represented as mean \pm SEM; $n = 4$ each experimental group; Student’s *t* test for **(d)**; one-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test for **(e)**; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

test revealed an increase in the percentage of Purkinje cells expressing PPAR α in PCD mice when OEA was administered at doses of 5 and 10 mg/kg, independent of the schedule of administration (Fig. 2e, Supplementary Fig. 2; 5 mg/kg, $p < 0.05$; 10 mg/kg, $p < 0.01$).

OEA Prevents Alterations in the Morphology of Purkinje Cells

We then analyzed the effect of OEA administration on progressive morphological alterations in PCD Purkinje cells. Our first objective was to determine the effectiveness of different OEA doses (1, 5, or 10 mg/kg) and administration schedules (chronically from P7–P21 or acutely at P14 or P16) on the maintenance of Purkinje cell morphology (Fig. 3a–h). One-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test was performed to compare each dose and administration schedule vs. control treatment. Analysis of the data at P30 showed that chronic and acute administration of both 5 and 10 mg/kg OEA prior to the preneurodegenerative stage ameliorated morphological alterations in Purkinje cells (Fig. 3i–l). In contrast, when OEA was administered at P16, only the highest dose, 10 mg/kg, was effective in alleviating some of the morphological changes (Fig. 3i–l).

Then, we carried out a second set of experiments to improve further the therapeutic effect of OEA *in vivo*. Based on the previous results and to reduce animal suffering, we administered a single injection of the most effective dose of OEA (10 mg/kg) prior to preneurodegeneration. We compared the effect of OEA administration at three time points (P14, P12, P10, i.e., one, three or five days before the onset of neurodegeneration in PCD mice, respectively) by one-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test (Fig. 4). The results of this analysis showed that acute administration at



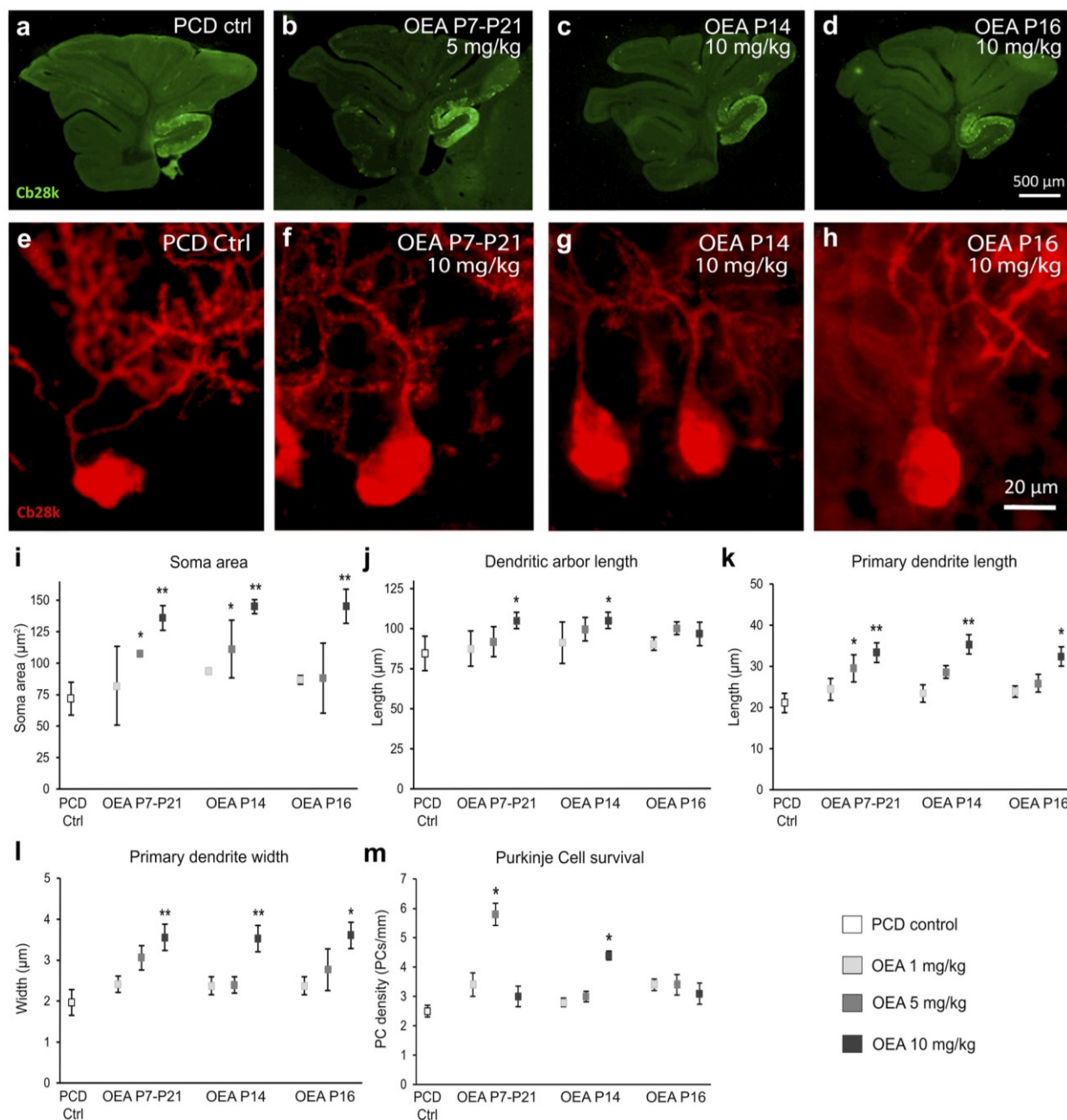


Fig. 3 *In vivo* effect of different OEA dosages on the morphology and survival of the Purkinje cells of the PCD mouse analyzed at P30 (first set of experiments). **(a–d)** Micrographs of PCD cerebellar vermis slices labeled with calbindin (Cb28k, green) after different OEA treatments: control **(a)**, chronic administration from P7 to P21 of 5 mg/kg **(b)**, acute administration of 10 mg/kg at P14 **(c)**, acute administration of 10 mg/kg at P16 **(d)**. **(e–h)** Micrographs of Purkinje cells labeled with calbindin (Cb28k; red) in PCD animals treated with different dosages of OEA: control **(e)**, chronic administration from P7 to P21 of 10 mg/kg **(f)**, acute administration of 10 mg/kg at P14 **(g)**, acute administration of 10 mg/kg at P16 **(h)**. **(i–l)** Quanti-

fication of the OEA effect on different morphological parameters of PCD Purkinje cells; note that the chronic and acute administration at P14 have a stronger neuroprotective effect than the acute administration at P16 in all the parameters evaluated. **(m)** Quantification of PCD Purkinje cell survival at different OEA dosages; note that both chronic administration at a dose of 5 mg/kg and acute administration at P14 at a dose of 10 mg/kg prevented Purkinje cell death. Data are represented as mean \pm SEM; $n=4$ each experimental group; one-way ANOVA followed by Dunnett’s post hoc test for **(i–m)** * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

the three time points prevented morphological alterations at P30 (Fig. 4i–l). Furthermore, this neuroprotective effect followed an inverted U-shaped time-response curve, with acute administration at P12 being the most effective administration time point for preventing Purkinje cell morphological alterations, as the morphological parameters reached values similar to those of WT animals (Fig. 4i–l). Next, we decided to determine whether this neuroprotective effect of OEA administered at P12 was maintained over time. However, the results at P40 showed that the values of only two of the parameters analyzed (soma area and primary dendrite length) were maintained (Supplementary Fig. 3).

OEA Administration Decreases Purkinje Cell Death

One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was performed to compare the effect of different OEA doses used in the first set of experiments on Purkinje cell survival. The results showed that chronic administration of OEA at a dose of 5 mg/kg ($p < 0.05$) but not 1 or 10 mg/kg from P7–P21 had a preventive effect on Purkinje cell death (U-shaped response). OEA administration at P14 also ameliorated this degeneration, but only at a dose of 10 mg/kg ($p < 0.05$). In contrast, when OEA was administered at P16, that is, after preneurodegeneration had already started, the treatment had no effect on Purkinje cell death (Fig. 3m). Thus, similar to the findings related to Purkinje cell morphology, OEA seems to increase Purkinje cell survival only when it is administered prior to the onset of preneurodegeneration. As before, we compared the effect of acute preventive treatment at P14, P12, and P10 on Purkinje cell survival by performing one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. The results confirmed that acute administration of OEA (10 mg/kg) reduced Purkinje cell degeneration when administered prior to the onset of preneurodegeneration at either P12 ($p < 0.01$) or P14 ($p < 0.05$). This effect also followed an inverted U-shaped time-response curve, with OEA administration at P12 being the most effective treatment (Fig. 4m; $p < 0.01$). OEA administration at P10 had no effect on Purkinje cell density. Moreover, the number of Purkinje cells in animals treated at P10 seemed to be even lower than that in untreated PCD mice, probably due to the deleterious effects of OEA at very early stages (Fig. 4m). Indeed, the weight of the PCD animals treated at P10 was significantly lower than that of the rest of the PCD animals (Supplementary Table 1).

Effect of OEA on Motor Coordination

Once both the neuroprotective properties of OEA were demonstrated histologically and the most effective therapeutic time window was identified, we wondered whether

the cellular neuroprotective effects of OEA could be translated into an improvement in behavioral impairments in PCD mice. To answer this question and to reduce the number of animals employed in the study, we analyzed the effect of only the most effective OEA treatment regimen (10 mg/kg, i.p. at P12) on the motor, cognitive, and social behavior of PCD mice throughout the entire neurodegenerative process (at P15, P17, P22, P30, and P40). First, to study motor coordination, we subjected mice in the three experimental groups (WT mice, PCD mice and PCD mice treated at P12) to the *rotarod* test (Fig. 5a). One-way repeated-measures ANOVA results revealed that *rotarod* data test violated sphericity (p Mauchly's test < 0.01). They exhibited statistically significant differences within the 'day of testing' factor ($p < 0.01$) and the 'experimental group' factor ($p < 0.01$) separately; and in the interaction between both factors 'experimental group' * 'day of testing' ($p < 0.01$), for the four criteria of the multivariate analysis (Pillai's trace, Wilks' Lambda, Hotelling's trace and Roy's largest root). Graphic representation of the *rotarod* test data showed that the general motor performance of the three experimental groups diverged over time (which can explain the interaction between factors, see "Discussion"), with the most significant differences being between the WT and PCD mice (Fig. 5b). The performance of the WT mice in the *rotarod* test gradually improved until P30 and then stabilized, probably due to learning (Fig. 5b). However, treated PCD mice showed similar behavior as WT mice until P22 but then gradually exhibited motor behavior that was more similar to that of untreated PCD animals (Fig. 5b). To evaluate further the possible differences between the three experimental groups within each day of testing, we performed one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test on each day of *rotarod* testing. These results revealed that the motor behavior of WT, untreated PCD and treated PCD mice was similar at P15 ($p > 0.05$), but differed from each other from P17 onwards (Fig. 5b; P17, $p < 0.01$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$; P40, $p < 0.01$). First, the motor coordination of PCD mice (both untreated and treated) was affected compared to that of WT animals since the beginning of preneurodegeneration except for P15 (untreated PCD mice: $p < 0.01$ for P17, P22, P30, and P40; treated PCD mice: $p < 0.01$ for P17, P22, P30 and P40). However, PCD animals treated with OEA showed an improvement in the performance of the *rotarod* test at P22 and P30 compared to untreated PCD mice (Fig. 5b; P22, $p < 0.05$; P30, $p < 0.05$). Unfortunately, this amelioration was not detected at P40 when motor behavior of both treated and untreated PCD were similar and no differences were detected between these two experimental groups ($p > 0.05$). These finding indicates that although OEA treatment did not completely restore the normal motor coordination of PCD mice, it contributed to improving it since the motor behavior of

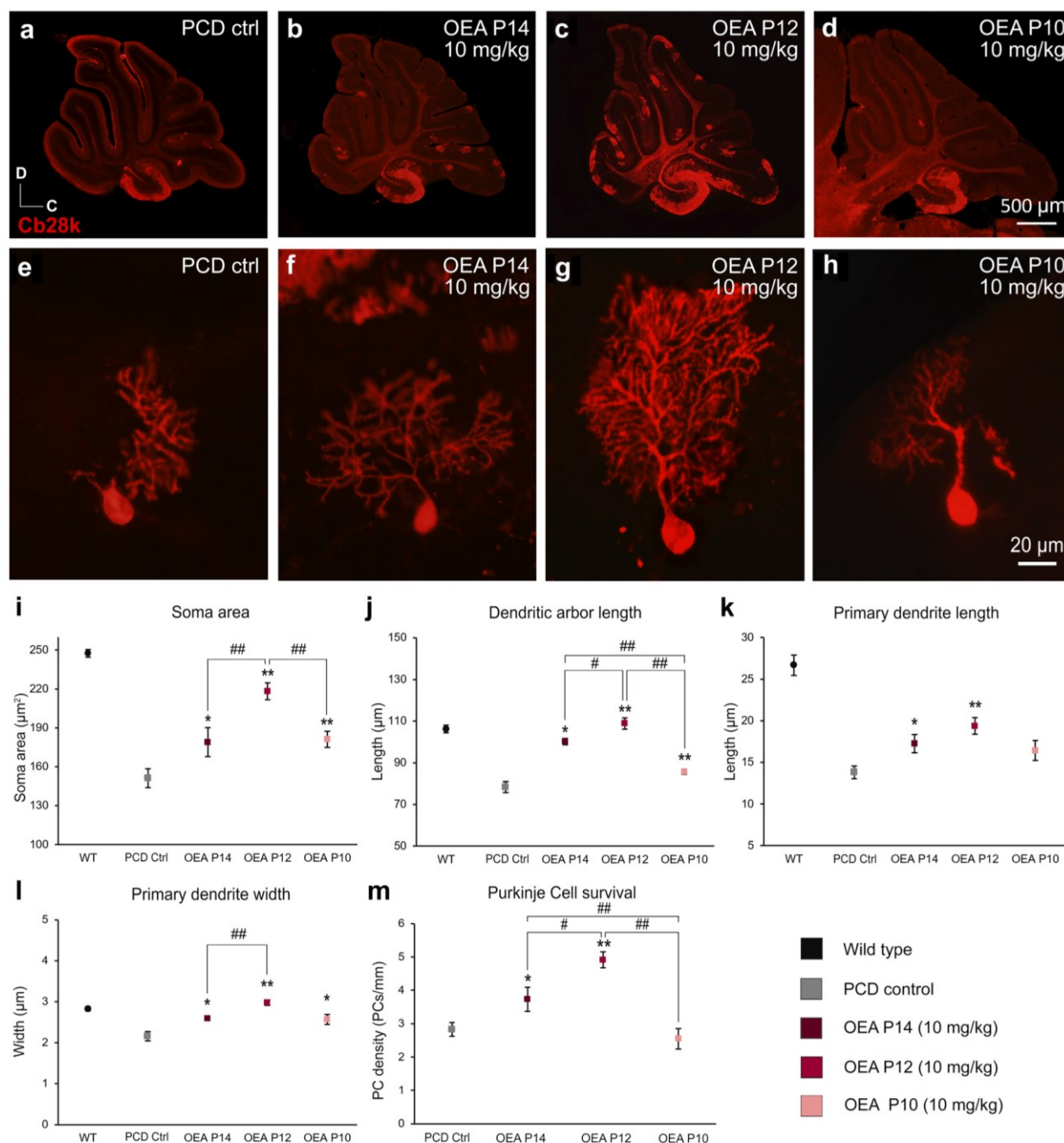


Fig. 4 *In vivo* effect of different acute administration of OEA on the morphology and survival of the Purkinje cells of the PCD mouse analyzed at P30 (second set of experiments). (a–d) Micrographs of PCD cerebellar vermis slices labeled with calbindin (Cb28k, red) at different OEA acute administrations at a dose of 10 mg/kg: control (a), at P14 (b), at P12 (c), and at P10 (d); an increase in the Purkinje cell density can be qualitatively observed when OEA is administered at P12. (e–h) Micrographs of Purkinje cells labeled with calbindin (Cb28k; red) in PCD animals administered with OEA (10 mg/kg) at P14 (f), P12 (g), and P10 (h); a notable improvement in the Purkinje cell arborization can be qualitatively observed when OEA is administered at P12. (i–l) Quantification of the effect of OEA on Purkinje

cells morphology; note that the neuroprotective effect of OEA administered acutely follows an inverted U-shaped time-response curve, with acute administration of OEA at P12 being the most effective treatment for stabilizing Purkinje cell morphology, as the morphological parameters reached values similar to those of WT animals. (m) Quantification of the effect of OEA on Purkinje cell survival. Data are represented as mean ± SEM; *n* = 7 each experimental group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for (i–m); **p* < 0.05, ***p* < 0.01 for differences between experimental group and control group (PCD without treatment); #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 for differences between the different OEA treatments. Data from WT animals has been used only as a reference, not to compare

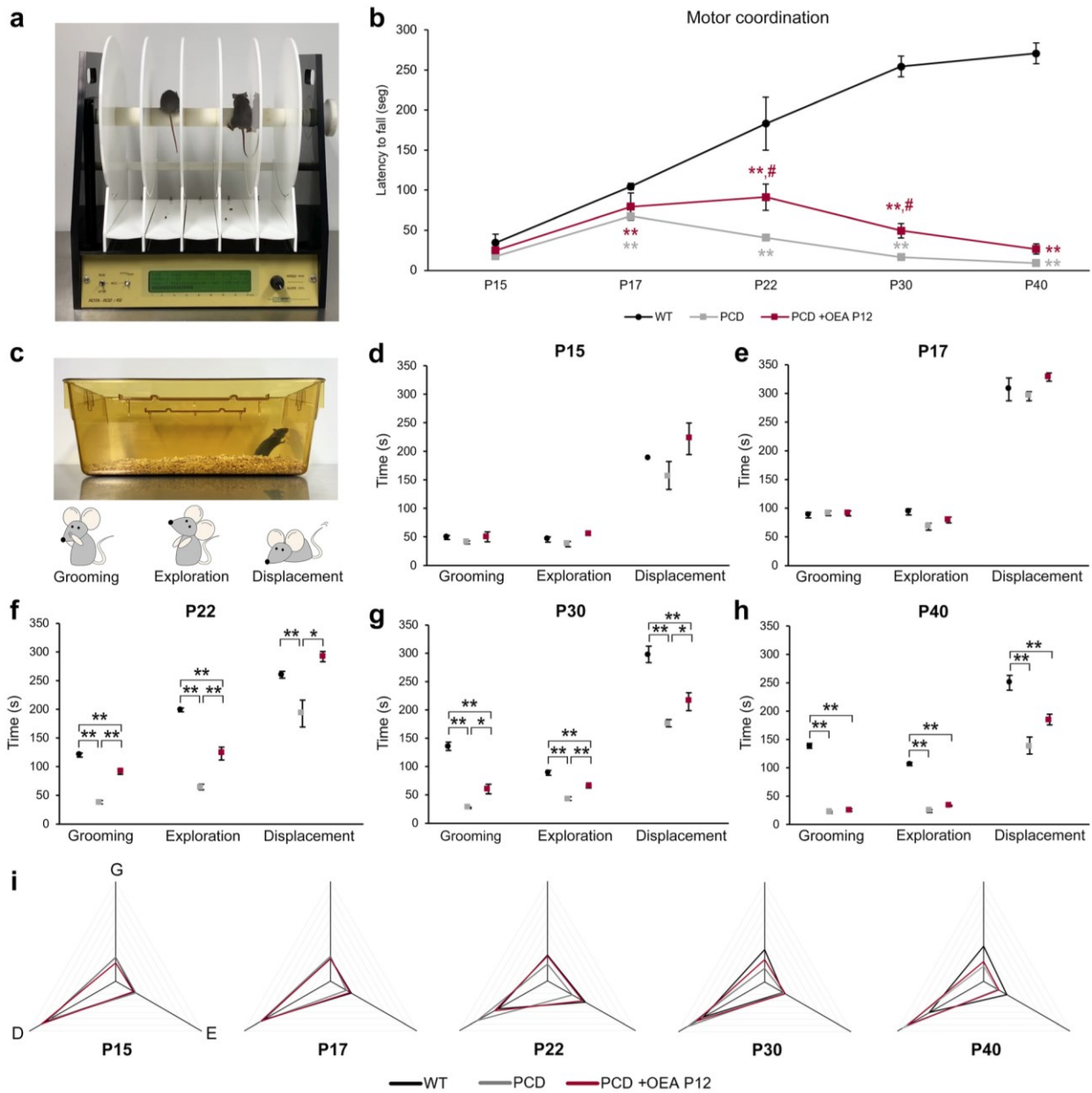


Fig. 5 Analysis of the effect of OEA on motor coordination and general behavior along cerebellar degeneration. **(a, b)** Representation and quantification of the *rotarod* test at different ages for WT, PCD, and treated PCD mice; note that both treated and untreated PCD motor behavior was impaired from P17 onward; however, OEA treatment improve the *rotarod* motor task of PCD animals at P22 and P30 although it did not completely restore it. In this graph, ** $p < 0.01$ for differences between WT and PCD experimental groups; # $p < 0.05$, for differences between PCD experimental groups (i.e., treated and untreated PCD). **(c–h)** Representation and quantification of the parameters analyzed in the home-cage behavior analysis at different

ages; note that the general behavior is similar for the three experimental groups until P17. From P22 onward treated PCD behavior is always halfway between WT and nontreated PCD until P40, at which time no OEA effect was observed. **(i)** Profile representation of the percentage of time displacing, grooming, and rearing with respect to the total amount of time active; note that WT and treated PCD behave similarly at all ages analyzed until P30. Data are represented as mean \pm SEM; $n = 8–9$ each experimental group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for **(b), (d–h)**; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

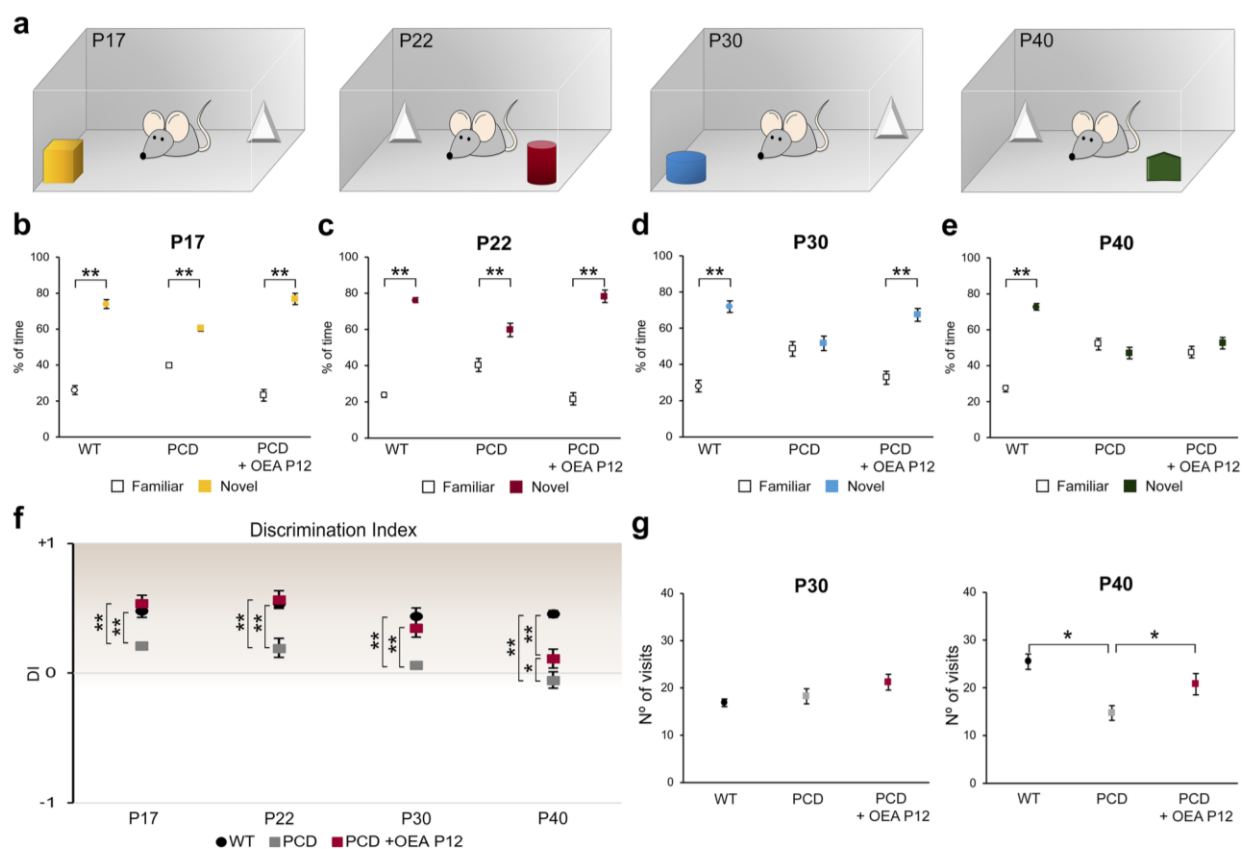


Fig. 6 Analysis of the effect of OEA on recognition memory along cerebellar degeneration. **(a)** Schematic representation of the NOR test and the objects employed. **(b–e)** Analyses of the percentage of time exploring familiar and novel objects at different ages for WT, PCD, and treated PCD animals; the preference for new objects is maintained in treated PCD mice until P30. **(f)** Chart showing the discrimination index at different ages for WT, PCD, and treated PCD mice; note that this index is similar in WT and treated PCD until P30,

always resulting in a positive score greater than zero, which means there is a preference for novel objects. **(g)** Quantification of the number of visits to both objects at P30 and P40; no differences were observed at P30 while at P40 a decrease in the number of visits was detected in nontreated PCD. Data are represented as mean \pm SEM; $n = 8–9$ each experimental group; Student's *t* test for **(b–e)**; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for **(f, g)**; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

treated mice was midway between that of WT and untreated PCD animals at P22 and P30.

OEA Treatment Normalizes the General Behavior of PCD Mice

Second, for the home-cage behavior test (Fig. 5c), one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was performed for each parameter measured. Overall, the three experimental groups showed similar results with respect to grooming time, exploratory behavior and displacement at P15 and P17 (Fig. 5d, e). Conversely, from P22 onward, these three variables were different between the WT and PCD animals (Fig. 5f–h). The grooming time, exploratory behavior, and displacement of the treated PCD mice were increased compared to those of the untreated PCD animals at P22 and P30 (grooming P22, $p < 0.01$; grooming

P30, $p < 0.05$; exploration P22, $p < 0.01$; exploration P30, $p < 0.01$; displacement P22, $p < 0.05$; displacement P30, $p < 0.05$; Fig. 5f, g), being more similar to the values of the WT mice. However, this effect was not maintained at P40, at which time no differences were detected between the groups of PCD mice (Fig. 5h). To allow better visual comprehension, in Fig. 5i, the percentages of time dedicated to grooming, exploration and displacement with respect to total activity time are depicted as a triangle for each experimental group, with each of the vertices representing on the analyzed parameters (grooming, exploration and displacement). Briefly, the general behavior triangles of the WT mice and both groups of PCD mice were similar at P15 and P17. However, at P22, the triangle of the untreated PCD mice started to differ, while that of the treated PCD mice remained identical to that of the WT mice. Finally, at P30 and P40, the triangle of the treated PCD mice was positioned midway

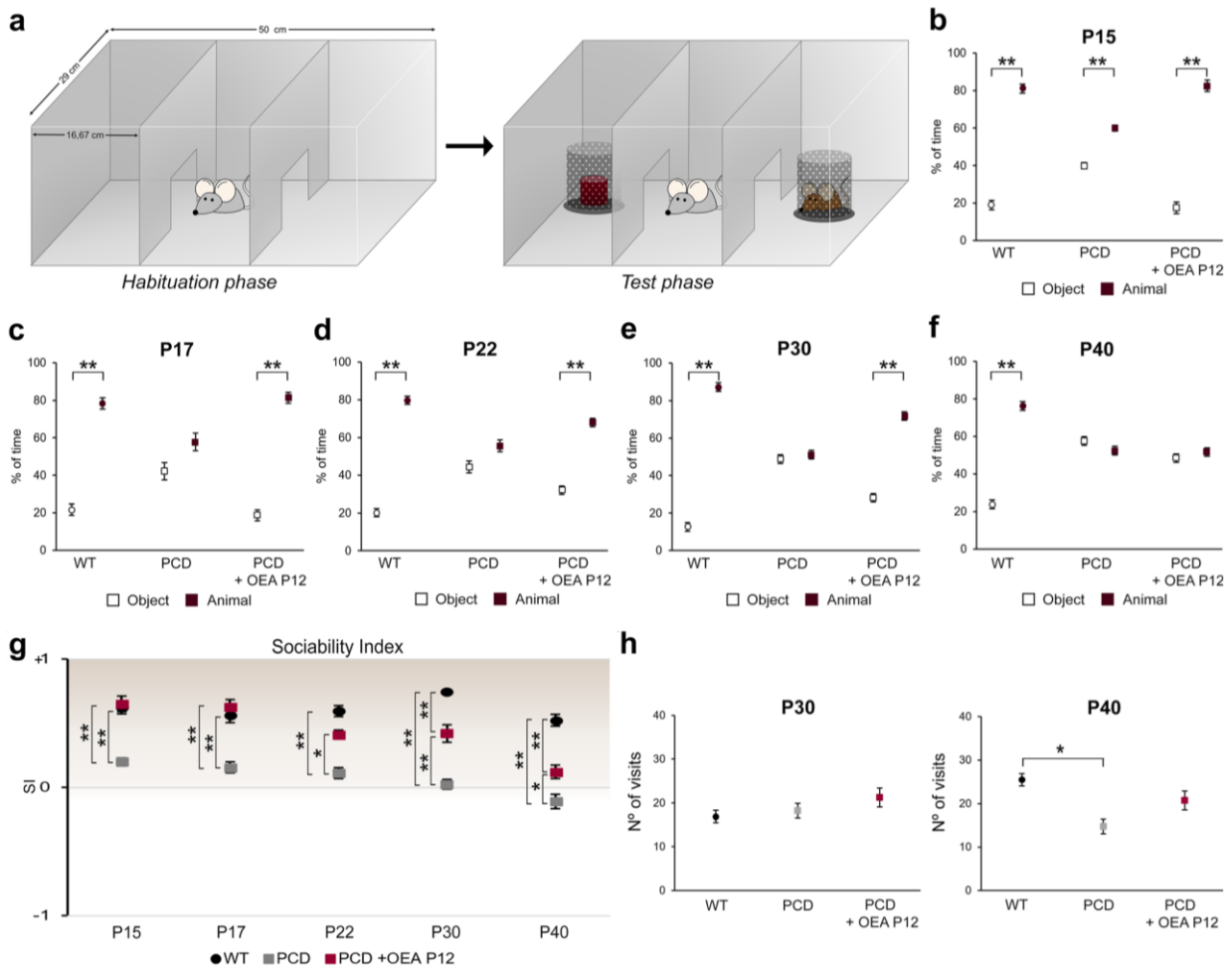


Fig. 7 Analysis of the effect of OEA on social behavior along cerebellar degeneration. **(a)** Schematic representation of the three-chambered social preference test. **(b–f)** Quantification of the percentage of time spent exploring the chamber, containing either an intruder or an object, by WT, PCD, and treated PCD at different ages; note that the normal social behavior was impaired in nontreated PCD mice from P17 onward, whereas treated PCD animals maintained a normal social pattern until P30. **(g)** Chart showing the sociability index at different ages for WT, PCD, and treated PCD animals; similar values were

observed in WT and treated PCD mice until P30, at which time the treated PCD subjects showed an intermediate score between WT and nontreated PCD mice. **(h)** Quantification of the number of visits to both objects at P30 and P40; a decrease in the number of visits was detected in nontreated PCD mice at P40. Data are represented as mean \pm SEM; $n=8-9$ each experimental group; Student's t test for **(b–f)**; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for **(g, h)**; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

between that of the WT and untreated PCD mice, which was consistent with the *rotarod* results and histological analyses.

OEA Administration Prevents Memory Impairments Until P30

Long-term memory recognition was assessed by the NOR test. Comparison of the percentage of time spent exploring the novel and familiar objects by each experimental and age group by Student's t test (Fig. 6a) showed that WT mice spent a greater percentage of time exploring the novel object than the familiar object at all analyzed ages (Fig. 6b–e; P17,

$p < 0.01$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$; P40, $p < 0.01$). PCD mice showed the same behavior at P17 ($p < 0.01$) and P22 ($p < 0.01$), but at P30 and P40, no differences were detected between the time exploring the novel and familiar objects. The treated PCD mice spent a greater percentage of time exploring the new object than the familiar object until P30, indicating that OEA administered at P12 preserved long-term memory recognition (Fig. 6b–e; P17, $p < 0.01$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$). However, at P40, no differences were detected in this group, which is consistent with the histological results and the results of the previous behavioral tests (Fig. 6e and Supplementary Fig. 3).

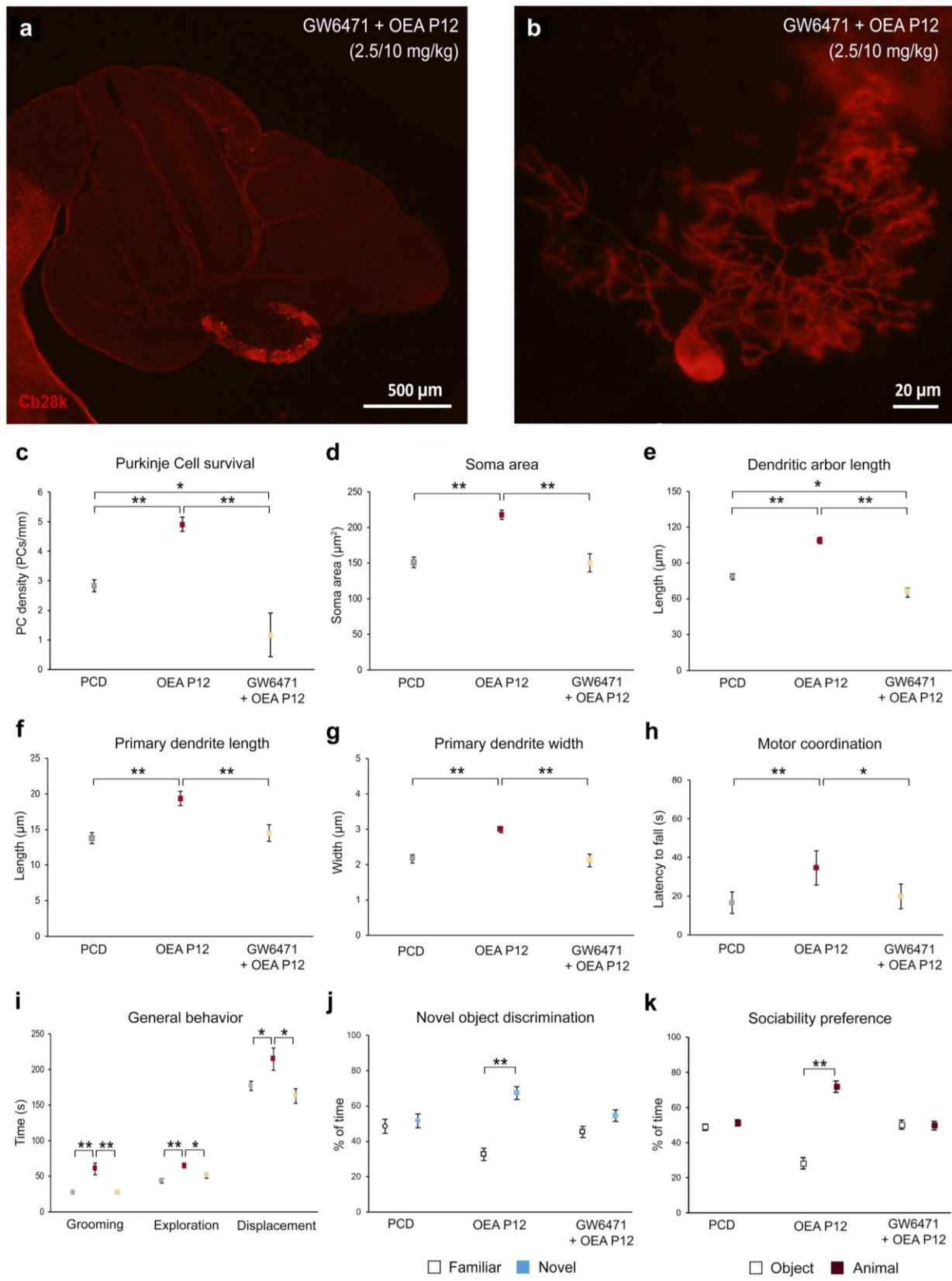


Fig. 8 The neuroprotective effect of OEA treatment is mediated by PPAR α receptors. **(a, b)** Micrographs of cerebellar vermis **(a)** and a Purkinje cell **(b)** labeled with calbindin (Cb28k, red) of a mouse treated with the PPAR α antagonist GW6471 (2.5 mg/kg, i.p.) and OEA (10 mg/kg, i.p. P12). **(c–g)** Histological quantification of the effect of GW6471+OEA at P12 on the Purkinje cell survival **(c)** and on Purkinje cell morphology **(d–g)**; note that the neuroprotective effect of OEA observed was abolished when PPAR α receptor was blocked by GW6471. **(h–k)** Motor, cognitive and social analysis of PCD mice treated with GW6471+OEA at P12; note that animals pretreated with the antagonist of PPAR α showed the same behavior as untreated PCD mice, suggesting that OEA exerts its neuroprotective effect via a PPAR α -dependent pathway. Both histological and behavioral analyses were performed at P30. Data are represented as mean \pm SEM; $n=5$ each experimental group; one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for **(c–i)**; Student's t test for **(j, k)**; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

In parallel, one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was performed to analyze the DI. The results presented in Fig. 6f show no differences between WT and treated PCD animals from P17 to P30; both groups of animals had positive values, indicating that more time was spent examining the novel object. Although a positive DI was maintained for the treated PCD mice at P40, it was between the DIs of WT and untreated PCD mice. Finally, the DIs of untreated PCD mice were positive until P30, when they became negative, indicating that the mice exhibited no preference toward the novel object.

The number of visits to both objects was analyzed at all ages to avoid possible biases derived from motor alterations in PCD mice. ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test did not reveal differences in the number of visits between the experimental groups at P17, P20 and P30. However, at P40, the number of times that PCD mice visited both objects was lower than the number of times WT or treated PCD animals visited the objects (Fig. 6g). This finding showed that ataxia affected the ability of PCD mice to perform this task at P40, which may have interfered with the results obtained at this age (see "Discussion").

Normal Social Behavior Is Maintained After OEA Administration Until P30

Social behavior was assessed by the three-chambered social preference test. The percentage of time interacting spent with a hidden animal or object was compared by each experimental and age group using Student's t test. The results of this test (Fig. 7a) showed a preference for social contact in WT animals at all ages (Fig. 7b–f; P15, $p < 0.01$; P17, $p < 0.01$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$; P40, $p < 0.01$), while PCD mice showed a nonsocial preference from P17 onward, spending the same percentage of time exploring the compartment containing the mouse as the one containing the object (Fig. 7b–f; P17, $p > 0.05$; P22, $p > 0.05$; P30,

$p > 0.05$; P40, $p > 0.05$). Conversely, treated PCD mice spent a larger percentage of time exploring the chamber containing the mouse than the one containing the object until P30, indicating recovery of normal social behavior up to this age (Fig. 7b–e; P15, $p < 0.01$; P17, $p < 0.01$; P22, $p < 0.01$; P30, $p < 0.01$). Unfortunately, this effect was not observed at P40, at which point treated PCD mice and untreated PCD mice spent the same percentage of time exploring both compartments (Fig. 7f; $p > 0.05$).

One-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test was performed to analyze the SI. The results presented in Fig. 7g show that the SIs of WT mice remained positive at all ages analyzed. Likewise, the treated PCD mice had similar SIs as WT animals until P30, at which point the SIs of treated PCD mice remained positive but diverged from the SIs of WT mice. Finally, the SIs of PCD mice were close to 0 or negative at all ages analyzed, indicating that these mice preferred to behave in a nonsocial manner.

The number of visits to both compartments was also analyzed at all ages. ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test revealed differences only at P40, at which point the total number of visits made by the PCD animals was lower than that made by the WT and treated PCD mice (Fig. 7h). This result may have distorted the results of the three-chambered test at P40.

The *In vivo* Neuroprotective Effects of OEA Are Mediated by PPAR α

To test whether the endocannabinoid PPAR α mediates the neuroprotective effects of OEA observed in PCD mice at both the histological and behavioral levels, the PPAR α antagonist GW6471 (2.5 mg/kg b.w., i.p.) was injected into an additional group of mice 15 min before OEA treatment (10 mg/kg b.w., i.p.). Histological and behavioral experiments were performed as described above. The results of histological analyses at P30 (Fig. 8) showed that the administration of the PPAR α antagonist fully blocked the neuroprotective effect of OEA on all the parameters related to Purkinje cell morphology and survival (Fig. 8a–g; $p < 0.01$ for all histological parameters). Regarding Purkinje cell survival, a lower density of Purkinje cells was observed in animals pretreated with GW6471 than in untreated PCD mice (Fig. 8c; $p < 0.01$). Therefore, the PPAR α antagonist not only abolished the neuroprotective effect of OEA on Purkinje cell survival but also increased Purkinje cell death. In addition, the improvements in motor, cognitive and social behavior observed in treated PCD mice were fully suppressed when PPAR α was blocked prior to OEA treatment (Fig. 8h–k). These results indicate that PPAR α is the main receptor involved in the actions of OEA in PCD mice.

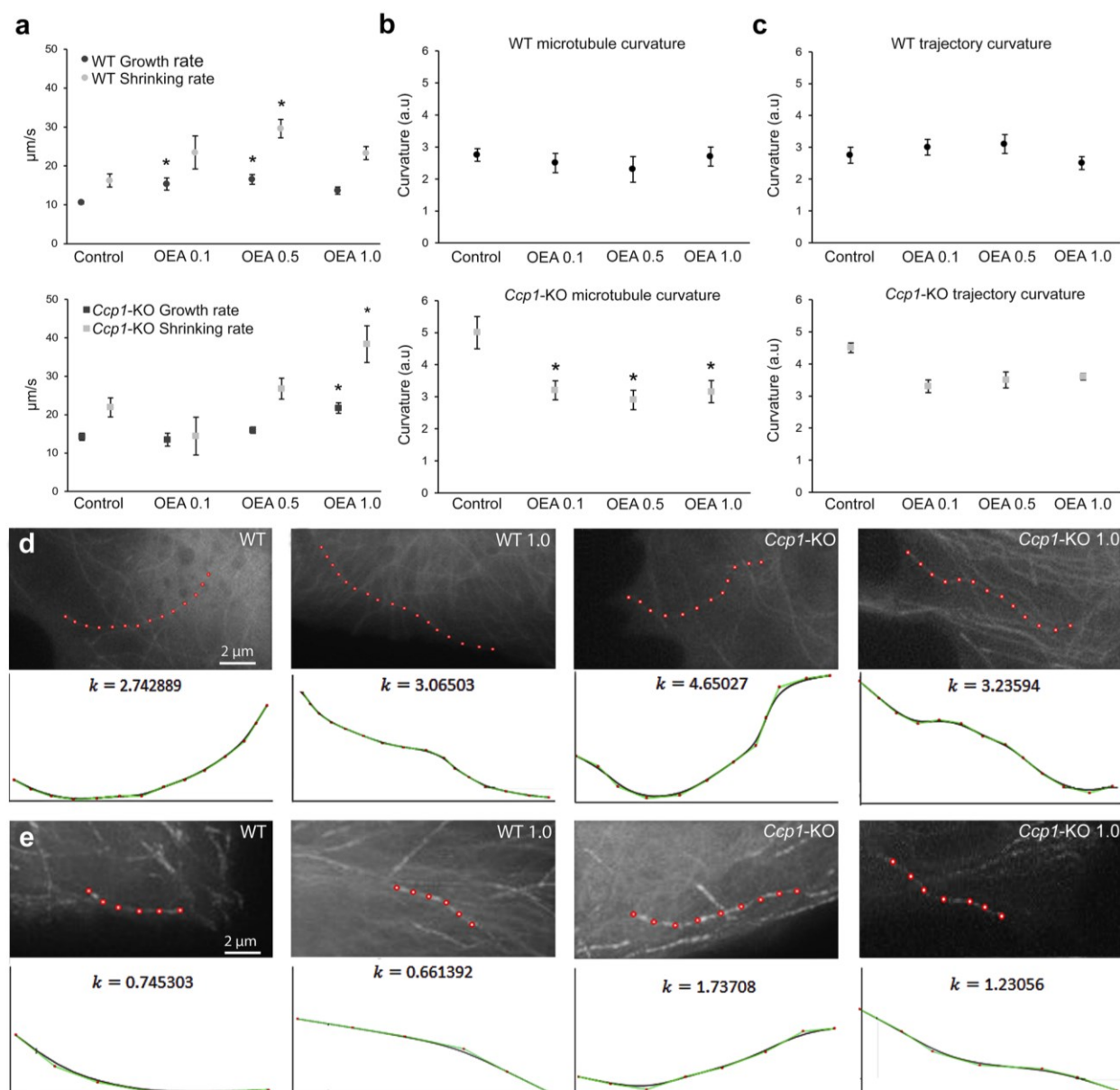


Fig. 9 *In vitro* effect of OEA on WT and *Ccp1*-KO microtubule dynamics of MEFs. (a) Analyses of WT and *Ccp1*-KO microtubule growth and shrinking rates; OEA administration affects both parameters and experimental groups in a dose-dependent manner, although a higher OEA concentration is required in *Ccp1*-KO cells. (b) Analyses of WT and *Ccp1*-KO static microtubule curvature; OEA administration decreased *Ccp1*-KO microtubule curvature but did not affect WT curvature. (c) Analyses of WT and *Ccp1*-KO microtubule trajectory

curvature; OEA did not affect trajectory curvature in any of the two genotypes. (d, e) Examples of WT and *Ccp1*-KO microtubule curvature (d) and trajectory (e) in control and OEA-administered cells (1.0 μM) and the corresponding graphical representation. Data are represented as mean ± SEM; *n* = 3 embryos per experimental group; a.u. = arbitrary units; one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test for (a–c); **p* < 0.05

OEA Increases Microtubule Dynamics and Restores Microtubule Shape *In vitro*

After demonstrating that OEA exerts its neuroprotective effects *in vivo* in PCD mice at both the histological and behavioral levels through PPARα and given that excess

microtubule polyglutamylation in mutant cells triggers alterations in both the dynamics and structure of microtubules [10, 13, 14], we wondered whether the molecular effect of OEA could be related to these microtubule characteristics. To answer this question, we employed an additional *in vitro* MEF model that allowed us to visualize

individual microtubules since these analyses cannot be properly performed *in vivo* due to the structural complexity and highly branched dendritic trees of Purkinje neurons. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was employed to compare the effect of the different OEA doses vs. control treatment (untreated WT and untreated *Ccp1*-KO cells) separately for each genotype. The results showed that OEA modified the dynamics and structure of microtubules in cells of both genotypes (Fig. 9). Regarding microtubule dynamics, OEA increased the growth and shrinkage rates of both WT ($p < 0.05$) and *Ccp1*-KO ($p < 0.05$) microtubules (Fig. 9a). However, the OEA concentration required for a significant effect was higher in *Ccp1*-KO cells (1.0 μM) than in WT cells (0.1 and 0.5 μM). Similarly, the mean growth and shrinkage lengths were also increased in cells of both genotypes after OEA treatment, and the same OEA concentration was required (Supplementary Table 2). In contrast, WT microtubules underwent a decrease in the percentage of growing time ($p < 0.05$) and an increase in the percentage of time in pause ($p < 0.05$), whereas no effect on these parameters was seen for *Ccp1*-KO microtubules (Supplementary Table 2). Regarding microtubule structure, OEA did not affect the static curvature of WT microtubules at any concentration (Fig. 9b). Conversely, OEA decreased *Ccp1*-KO microtubule curvature at all the concentrations tested (Fig. 9b; $p < 0.05$ for all analyses), making the microtubules appear similar to WT microtubules. Last, OEA did not seem to affect the curvature of the microtubule trajectory in cells of any genotype (Fig. 9c). These findings suggest that the molecular effect of OEA may be related to microtubule dynamics and structure since OEA influenced these microtubule features in *Ccp1*-KO (PCD-like) cells.

Discussion

In the present work, we explored the neuroprotective effects of the endocannabinoid OEA and its influence on the cerebellar integrity and behavior of PCD mice on C57BL/DBA background strain. Overall, OEA delayed Purkinje cell degeneration and reversed behavioral impairment through the endocannabinoid receptor PPAR α in this model of cerebellar neurodegeneration.

PPAR α is considered the main target of OEA [35–38]. Its expression was detected in the three layers of the cerebellum in mice of both genotypes. However, in the Purkinje cells of PCD mice, PPAR α receptor expression decreased from P15 to P22, indicating that the *pcd* mutation affects the expression of elements of the endocannabinoid system in both the preneurodegenerative and neurodegenerative stages. Changes in PPAR α expression may reflect plasticity of the cerebellum in an attempt to prevent neuronal death, which is in accordance with previous studies [26, 28,

29, 33]. Nevertheless, the detection of PPAR α expression in Purkinje cells led us to design an experiment to assess the effects of OEA *in vivo*. Indeed, the administration of OEA to PCD animals increases the expression of PPAR α , as previously described [32]. This finding may be related to plasticity of Purkinje cells aimed at preventing neuronal death, which is consistent with the general neuroprotective effects exerted by OEA that we observed in PCD mice. In contrast, the expression of the CB1 and CB2 receptors was not affected. Although a putative effect of OEA on these receptors cannot be excluded, the activity of OEA is considered to be linked to PPAR α [33–35, 37], thus supporting our hypothesis (see also the later discussion of the use of the PPAR α antagonist GW6471).

OEA altered the *in vitro* dynamics and structure of microtubules in cells of both genotypes, causing microtubules from PCD-like cells to be similar to those from WT cells. Since OEA normalizes some of the microtubule characteristics impaired in the microtubules of PCD-like cells, we speculate that the preventive effect of OEA on Purkinje cell morphology alterations may be related to its crucial effects on cytoskeletal structures within these cells. Previous findings have shown that the binding of OEA to PPAR α triggers the expression of different proteins (i.e., MAP-2 and GAP-43) that are related to microtubule stability and structure and neuronal growth [37]. Thus, the re-establishment of PCD microtubule shape by OEA may reflect the maintenance of the morphology of Purkinje cell dendritic arbors and the prevention of Purkinje cell death in PCD mice. The observed effects of OEA *in vivo* are in line with previous results, both in relation to its pharmacokinetics and effective time window [24, 27, 29, 31]. On the one hand, OEA administration prevents Purkinje cell morphological defects and decreases cell loss when it is administered prior to preneurodegeneration (i.e., chronic administration from P7 to P21 and acute administration at P14, P12 and P10). On the other hand, this neuroprotective effect follows an inverted U-shaped time-response curve, with acute administration at P12 being the most effective treatment, especially regarding dendritic arborization maintenance. Specifically, abnormalities in neural arborization are associated with numerous neurological disorders, such as schizophrenia, epilepsy, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder [48–51, 52]. Hence, our findings highlight the potential therapeutic use of OEA as a neuroprotective drug, not only for cerebellar diseases.

Although the cerebellum has long been considered to be a purely motor structure, recent studies have revealed that it also plays an important role in nonmotor functions such as cognitive and affective behavior [14, 17, 18], among others. A previous study conducted in our laboratory demonstrated that cerebellar degeneration at an early age in PCD mice leads to motor, cognitive and social alterations [14, 19, 20], mimicking

the features of human neurodevelopmental disorders in which the cerebellum is involved [7, 18, 21]. It is important to consider that impairments in PCD behavior take place when morphological alterations in Purkinje cells are exacerbated or when these cells are lost, and no other brain regions or neural cell population are affected [14, 53–55]. Thus, the effect of OEA in stabilizing Purkinje cell arborization and increasing Purkinje cell survival should result in functional improvements. Indeed, the results of this study revealed that OEA ameliorated all the behavioral defects observed in the PCD mutant mice until P30, which is in agreement with the histological findings. The results of the *rotarod* test show that the general motor behavior of the treated PCD mice was halfway between that of the WT and untreated PCD mice from P22 to P40. However, the improvements observed in WT mice from P30 onward due to learning [56] was not detected in treated mice. The divergent motor behavior translated into a different trajectory curve in the graph would explain the interaction observed between the analyzed factors. These findings revealed that the neuroprotective effects exerted by OEA at both morphological and cell survival levels contributed to improve the motor task performance of the PCD mice although they were not enough to completely restore its motor defects. Regarding overall behavior, our results are in agreement with previous studies showing that general cerebellar degeneration is manifested as changes in the time spent in grooming, rearing, exploration and displacement [14, 19, 20, 57, 58]. In this sense, the administration of OEA led to reestablishing normal behavioral patterns, with treated PCD mice exhibiting behavior similar to that of WT animals up to P30. In our study, no hypolocomotor effects related to high doses of OEA were observed [29, 40, 59]. In addition, it was recently found that normal cognitive and social abilities require normal cerebellar activity [14, 17, 18, 60, 61]. In this context, the results obtained in the NOR and social preference tests revealed that OEA protects against the impairments observed in the mouse model of cerebellar degeneration employed in this study. These findings are in agreement with those of other studies in which other endocannabinoids mainly restored or improved cognitive function in different mouse models of brain damage [25, 32, 62–65]. Furthermore, it should be noted that, as far as we know, our study is the first to show that OEA has the effect of maintaining normal social behavior in mice with affective deficits related to cerebellar dysfunction.

Overall, OEA was observed to have a neuroprotective effect at both the histological and behavioral levels until P30. Although the changes in two of the five parameters measured were maintained at P40 at the histological level (soma area and primary dendrite length), this was not the case for any behavioral changes. In addition, it should be

noted that motor impairments in PCD mice at this age could be responsible for the results obtained in the memory and the social preference tests at P40; therefore, no conclusive results can be drawn. Regardless of this, it is important to note that we managed to delay the degeneration in PCD mice and increase the temporal window in which other therapeutic approaches could be employed synergistically to fight against rapid and aggressive neurodegeneration [58, 66, 67].

Finally, the neuroprotective effects of OEA treatment in PCD mice were mainly mediated by PPAR α since the administration of the PPAR α antagonist GW6471 fully reversed the OEA-mediated effects at both the cellular and behavioral levels. In the particular case of Purkinje cell survival, our results showed that the inhibition of PPAR α before OEA treatment not only abolished the preventive effect of OEA but also increased Purkinje cell death. This finding may be related to apoptosis since PPAR α inhibition can promote programmed cell death [68]. Although we cannot discard a direct or indirect effect on other different neural cell types and/or the implication of other molecular interactions [29, 69, 70], our findings confirm the direct involvement of PPAR α [36–38] in the neuroprotective effects of OEA observed in this study. Indeed, these results are consistent with the absence of changes in the expression of other classical endocannabinoid receptors in PCD mice.

In conclusion, although the molecular mechanism underlying the effect of OEA requires further study, its neuroprotective effect is apparent at both the histological and behavioral levels. This neuroprotective effect may be related to the re-establishment of cytoskeletal properties and the ensuing maintenance of the structure of Purkinje cells in the cerebellum and, therefore, improvements in impaired behavioral functions. These findings provide evidence supporting the clinical use of OEA as a potential pharmacological molecule for limiting severe neurodegenerative processes.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01044-3>.

Acknowledgements The authors would like to thank the zootechnicians of the Grenoble Institute Neuroscience (GIN) and express their gratitude to M. J. Sánchez-Domínguez for technical support.

Required Author Forms **Disclosure forms** provided by the authors are available with the online version of this article.

Author Contribution EPM, RMC, DD, MJM, AA, JRA, and EW conceived the study and designed the experiments; EPM and RMC performed the *in vivo* experiments; EPM performed and analyzed the behavioral tests; EPM, RMC, and CdP performed the histological analyses; RMC and MJM performed the *in vitro* experiments; RMC and JMMC performed the mathematical analyses of microtubule curvature; EPM, RMC, CCAZ, JRA, DD, and EW interpreted the results; and EPM was a major contributor to the writing of the paper and organization and design of all the figures. All the coauthors revised and approved the final manuscript.

Funding This work was supported by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) (SAF2016-79668-R to EW), the Ministry of Science and Innovation (PID2019-106943RB-I00 to EW), the Ministry of Science and Innovation/Universities (MICINN/MIU) (FPU16/04259 to EPM; FPU14/02963 to CdP), the Regional Government of Castile and Leon (SA178U13 to EW), the Centre for Regenerative Medicine and Cell Therapy of Castile and Leon (EW), the University of Salamanca (EW), Inserm, University Grenoble Alpes, CNRS, CEA, La Ligue Contre le Cancer Comité de l'Isère (MJM), and Fondation France Alzheimer (to MJM).

Declarations

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, et al. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* 2002;16(18):2350–2364.
2. Feinstein SC, Wilson L. Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: A loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1739(2–3):268–279.
3. Fu X, Brown KJ, Yap CC, Winckler B, Jaiswal JK, Liu JS. Doublecortin (Dcx) family proteins regulate filamentous actin structure in developing neurons. *J Neurosci.* 2013;33(2):709–721.
4. Volle J, Brocard J, Saoud M, et al. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits. *Schizophr Bull.* 2013;39(5):969–978.
5. Eira J, Silva CS, Sousa MM, Liz MA. The cytoskeleton as a novel therapeutic target for old neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 2016;141:61–82.
6. Matamoros AJ, Baas PW. Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system. *Brain Res Bull.* 2016;126:217–225.
7. Shashi V, Magiera MM, Klein D, et al. Loss of tubulin deglutamylation CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *EMBO J.* 2018;37(23):e100540.
8. Breuss M, Keays DA. Microtubules and neuro developmental disease: The movers and the makers. *Adv Exp Med Biol.* 2014;800:75–96.
9. Magiera MM, Bodakuntla S, Žiak J, et al. Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *EMBO J.* 2018;37(23):e100440.
10. Rogowski K, Van Dijk J, Magiera MM, et al. A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell.* 2010;143(4):564–578.
11. Baird FJ, Bennett CL. Microtubule Defects & Neurodegeneration. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2013;04(11):203.
12. Bosch Grau M, Masson C, Gadadhar S, et al. Alterations in the balance of tubulin glycylation and glutamylation in photoreceptors leads to retinal degeneration. *J Cell Sci.* 2017;130(5):938–949.
13. Li J, Snyder EY, Tang FHT, Pasqualini R, Arap W, Sidman RL. Nnal gene deficiency triggers Purkinje neuron death by tubulin hyperglutamylation and ER dysfunction. *JCI Insight.* 2020;5(19):e136078.
14. Muñoz-Castañeda R, Díaz D, Peris L, et al. Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors. *Sci Rep.* 2018;8(1):3072.
15. Valero J, Berciano MT, Weruaga E, Lafarga M, Alonso JR. 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.* 2006;33(3):283–295.

16. Baltanás FC, Casafont I, Lafarga V, et al. Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *J Biol Chem.* 2011;286(32):28287–28302.
17. Badura A, Verpeut JL, Metzger JW, et al. Normal cognitive and social development require posterior cerebellar activity. *Elife.* 2018;7:1–36.
18. Carta I, Chen CH, Schott AL, Dorizan S, Khodakhah K. Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science.* 2019;363(6424):eaav0581.
19. Lalonde R and Strazielle C. Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain Research.* 2007;1140: 51-74.
20. Lalonde R, Manseau M and Botez MI. Exploration and habituation in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Research.* 1989;479:201-203.
21. Sheffer R, Gur M, Brooks R, et al. Biallelic variants in AGT-PBP1, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy. *Eur J Hum Genet.* 2019;27:1419-1426.
22. Parolaro D, Realini N, Vigano D, Guidali C, Rubino T. The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol.* 2010;224(1):3–14.
23. Rossi S, Bernardi G, Centonze D. The endocannabinoid system in the inflammatory and neurodegenerative processes of multiple sclerosis and of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol.* 2010;224(1):92–102.
24. Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Bisicchia E, Maccarrone M, Molinari M. The endocannabinoid system: A new entry in remote cell death mechanisms. *Exp Neurol.* 2010;224(1):56–65.
25. Holubiec MI, Romero JI, Suárez J, et al. Palmitoylethanolamide prevents neuroinflammation, reduces astrogliosis and preserves recognition and spatial memory following induction of neonatal anoxia-ischemia. *Psychopharmacology (Berl).* 2018;235(10):2929–2945.
26. Galán-Rodríguez B, Suárez J, González-Aparicio R, et al. Oleoylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology.* 2009;56(3):653–664.
27. Flores JA, Galán-Rodríguez B, Rojo AI, Ramiro-Fuentes S, Cuadrado A, Fernández-Espejo E. Fibroblast growth factor-1 within the ventral tegmental area participates in motor sensitizing effects of morphine. *Neuroscience.* 2010;165(1):198–211.
28. González-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, et al. The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014;17(3):455–468.
29. González-Aparicio R, Moratalla R. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;62:416–425.
30. Joshi U, Evans JE, Joseph R, et al. Oleoylethanolamide treatment reduces neurobehavioral deficits and brain pathology in a mouse model of Gulf War Illness. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–15.
31. Romano A, Micioni Di Bonaventura MV, Gallelli CA, et al. Oleoylethanolamide decreases frustration stress-induced binge-like eating in female rats : a novel potential treatment for binge eating disorder. *Neuropsychopharmacology.* 2020;45:1931–1941.
32. Yang LC, Guo H, Zhou H, et al. Chronic oleoylethanolamide treatment improves spatial cognitive deficits through enhancing hippocampal neurogenesis after transient focal cerebral ischemia. *Biochem Pharmacol.* 2015;94(4):270–281.
33. Sayd A, Antón M, Alén F, et al. Systemic administration of oleoylethanolamide protects from neuroinflammation and

- anhedonia induced by LPS in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016;19(3): pyw004.
34. Zhou Y, Yang LC, Ma A, et al. Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α . *Neuropharmacology*. 2012;63(2):242–249.
 35. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, et al. Oleoylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature*. 2003;425(6953):90–93.
 36. Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, et al. Role of endogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptors alpha in the secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Exp Neurol*. 2005;194(1):267–278.
 37. Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α). *J Biol Chem*. 2004;279(27):27849–27854.
 38. Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin EB, Piomelli D. Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. 2005;48:1147–1153.
 39. Bento-Abreu A, Tabernero A, Medina JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. *J Neurochem*. 2007;103(3):871–881.
 40. Fedele S, Arnold M, Krieger JP, et al. Oleoylethanolamide-induced anorexia in rats is associated with locomotor impairment. *Physiol Rep*. 2018;6(3):e13517.
 41. Ennaceur A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*. 2010;215(2):244–254.
 42. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res*. 1988;31(1):47–59.
 43. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012;13:93–110.
 44. Moy SS, Nadler JJ, Perez A, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav*. 2004;3(5):287–302.
 45. Erck C, Peris L, Andrieux A, et al. A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102(22):7853–7858.
 46. Peris L, Wagenbach M, Lafanechère L, et al. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol*. 2009;185(7):1159–1166.
 47. Applegate KT, Besson S, Matov A, Bagonis MH, Jaqaman K, Danuser G. PlusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *J Struct Biol*. 2011;176(2):168–184.
 48. Bernardinelli Y, Nikonenko I, Muller D. Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Front Neuroanat*. 2014;8:1–9.
 49. Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(9):551–563.
 50. Tampellini D. Synaptic activity and Alzheimer's disease: A critical update. *Front Neurosci*. 2015;9:1–7.
 51. Wu Y, Liu D, Song Z. Neuronal networks and energy bursts in epilepsy. *Neuroscience*. 2015;287:175–186.
 52. Rojek KO, Krzemień J, Doleżyczek H, et al. Amot and Yap1 regulate neuronal dendritic tree complexity and locomotor coordination in mice. *PLOS Biol*. 2019;17(5):e3000253.
 53. Mullen RJ, Eicher EM, Sidman RL. Purkinje cell degeneration: a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976;208–212.
 54. Wang T, Morgan JI. The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Research*. 2007;1140:26–40.
 55. Baltanás FC, Berciano MT, Valero J, et al. Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia*. 2013;61(2):254–272.
 56. Buitrago MM, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem*. 2004;81(3):211–216.
 57. Strazielle C, Lalonde R. Grooming in Lurcher mutant mice. *Physiol Behav*. 1998;64(1):57–61.
 58. Díaz D, Piquer-Gil M, Recio JS, et al. Bone marrow transplantation improves motor activity in a mouse model of ataxia. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(4):e1950–1961.
 59. De Fonseca Rodríguez F, Navarro M, Gómez R, et al. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*. 2001;414:209–212.
 60. Passot JB, Sheynikhovich D, Duvelle É, Arleo A. Contribution of cerebellar sensorimotor adaptation to hippocampal spatial memory. *PLoS One*. 2012;7(4):42–46.
 61. Tsai PT, Hull C, Chu Y, et al. Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*. 2012;488:647–651.
 62. Campolongo P, Roozendaal B, Trezza V, et al. Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(19):8027–8031.
 63. Mazzola C, Medalie J, Scherma M, et al. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR- α nuclear receptors. *Learn Mem*. 2009;16(5):332–337.
 64. D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid-B25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(7):1784–1792.
 65. Mirza R, Sharma B. Selective modulator of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects propionic acid induced autism-like phenotypes in rats. *Life Sci*. 2018;214:106–117.
 66. Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, et al. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant*. 2011;20(8):1179–1192.
 67. Díaz D, del Pilar C, Carretero J, Alonso JR, Weruaga E. Daily bone marrow cell transplantations for the management of fast neurodegenerative processes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1702–1711.
 68. Abu Aboud O, Wettersten HI, Weiss RH. Inhibition of PPAR α Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis, and Synergizes with Glycolysis Inhibition in Kidney Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8(8):1–9.
 69. Proulx K, Cota D, Castañeda TR, et al. Mechanisms of oleoylethanolamide-induced changes in feeding behavior and motor activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(3):R729–737.
 70. Kim SR, Chung YC, Chung ES, et al. Roles of transient receptor potential vanilloid subtype 1 and cannabinoid type 1 receptors in the brain: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Mol Neurobiol*. 2007;35(3):245–254.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.