

Workshop SEF Inflammation and pharmacological targets:

Targeting neuroinflammation for CNS treatment Disorders

25th January 2023



Sociedad Española
de Farmacología

SALA  PAGODA



ABSTRACT BOOK

WORKSHOP TARGETING NEUROINFLAMMATION FOR CNS TREATMENT DISORDERS

January 23th 2023. Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Madrid (UAM, Pagoda Building)



Sociedad Española
de Farmacología



Fundación
Española de Farmacología

PROGRAMA

10h Bienvenida del presidente

10h 15' Implication of microglial heme-oxygenase I (HO-1) in aging and neurodegenerative diseases. Manuela G. López (Universidad Autónoma de Madrid)

10h 55' Neuroinflamación y patología psiquiátrica. Oportunidades terapéuticas. Juan Carlos Leza (Universidad Complutense de Madrid)

11h 35' CAFE

12h 00' Sigma receptors and Alzheimer's Disease. Manuel Merlos (WeLab)

12h 40' Drug screening in neuropathic pain employing phenotypic neuronal-like models. José Manuel Brea, Antón L Martínez, María Isabel Loza (Universidad de Santiago de Compostela)

13 h 20' comida

14h 30' Neuropathic pain and neuroinflammation: role of sigma-1 receptors Francisco Nieto (Universidad de Granada)

15h 10' Neuroinflammation during rheumatoid arthritis pain: role of sigma-1 receptors. Miguel Ángel Huerta Martínez (Universidad de Granada)

15h 40' Epigenetic new approaches for Alzheimer's treatment: TET2 activators and G9a inhibitors. Christian Griñán-Ferré (Universidad de Barcelona)

16h 10' Presentación de comunicaciones orales

O.1. ¿Cannabis sativa como agente neuroprotector y antioxidante?
Guillermo Cásedas (Universidad San Jorge)

16h 30' Conclusiones finales

O.1. Implication of microglial heme-oxygenase I (HO-1) in aging and neurodegenerative diseases

Manuela G. Lopez

Institute Teofilo Hernando. Department of Pharmacology. School of Medicine. Autonomous University of Madrid. Madrid. Spain.

Aging is the primary risk factor for the development of neurodegenerative diseases (NDDs) such as Alzheimer's Disease (AD). However, oxidative stress (OS), aberrant protein aggregates and neuroinflammation have been identified as common pathophysiological markers in NDDs. In the specific case of AD, neuroinflammation is a key player starting in early stages of the disease. Therefore, strategies aiming at modulating neuroinflammation have gained interest.

The inducible enzyme hemoxygenase-1 (HO-1) has been proposed as therapeutic target as its activity is linked to anti-inflammatory and antioxidant effects. However, the expression pattern of HO-1 and its effects with aging and AD remain controversial. To elucidate the brain expression pattern of HO-1 with aging and AD, wild type (WT) and the 5xFAD (five familial AD mutations) mouse model were used at different ages (4, 8, 12 and 18 months). Total brain expression of HO-1 was increased with aging and particularly in AD progression. HO-1 up-regulation was mainly detected in microglial cells, which are the innate immune cells of the central nervous system (CNS). These findings were corroborated in human postmortem brain samples of AD patients and highlight HO-1 as a potential biomarker or therapeutic target for the treatment of AD. Whether this up-regulation is a compensatory mechanism to confront the subjacent neuroinflammation or is related to disease progression is still unknown. Therefore, we studied the effects of microglial HO-1 under inflammatory conditions, both in adult and aged WT mice and $LysMCreHmox1^{\Delta\Delta}$ ($HMOX1^{M-KO}$) mice that lack HO-1 in microglial cells were used. We observed that microglial HO-1 deletion after an inflammatory insult was linked to increased neuroinflammation, OS, cell death and behavioral alterations in adult animals. However, in aged mice, we observed the contrary. Therefore, strategies aiming at modulating HO-1 to achieve beneficial outcomes should be differently considered depending on the basal expression of this enzyme.

O.2. Neuroinflamación y patología psiquiátrica. Oportunidades terapéuticas.

Juan Carlos Leza

Dpto. Farmacología y Toxicología. Fac. Medicina. Universidad Complutense de Madrid, IIS ImaS12, CIBERSAM, IUIN

Las patologías mentales suponen un problema sanitario de primera magnitud, ya que originan gran carga sanitaria, social y económica. Son de muy elevada prevalencia (una persona de cada cuatro), discapacidad (se pierden más años de vida y años de trabajo por trastornos mentales que por cualquier otra patología) y coste (más de 450 billones de euros al año en Europa). Los trastornos afectivos y psicóticos (depresión mayor y esquizofrenia) están a la cabeza de estas patologías. Se están haciendo muchos esfuerzos por conocer la fisiopatología de estos trastornos más allá de las hipótesis basadas en las acciones de los antidepresivos y los antipsicóticos sobre neurotransmisores, ya que los actuales tratamientos, en el mejor de los casos permiten un control de los síntomas en 2/3 de los pacientes. En los últimos años se han aportado nuevas evidencias y se acepta que tanto la depresión como las psicosis son enfermedades multifactoriales, en las que se ven implicados factores genéticos, prenatales y ambientales, siendo el estrés y la exposición a estímulos inflamatorios o inmunes los que más atención están recibiendo. Numerosos estudios preclínicos y clínicos indican la existencia de una inflamación en el SNC (neuroinflamación) como responsable de las alteraciones estructurales y funcionales que se observan en estas patologías, además de una inflamación sistémica de bajo grado. La experimentación preclínica ha identificado, en los últimos años, una activación de rutas inflamatorias intra- e intercelulares en el cerebro, con un papel regulador central de algunos factores de transcripción tras la activación de receptores de respuesta inmune innata. Una interesante línea de estudio sobre el posible origen de estas señales inflamatorias en el cerebro apunta al estrés y a ciertos componentes de la pared bacteriana provenientes de la microbiota presentes en la circulación tras una disbiosis. La identificación de estas rutas fisiopatológicas en las enfermedades mentales es la base de los numerosos ensayos clínicos en los que se está evaluando el interés de tratamientos antioxidantes y antiinflamatorios añadidos a los tratamientos antidepresivos y antipsicóticos actuales.

O.3: Sigma receptors and Alzheimer's Disease

Manuel Merlos

*Welab Barcelona. Parc Científic de Barcelona
Edifici Clúster II. Planta 4 Baldiri Reixac, 4-8, 08028 Barcelona*

<https://www.welabbarcelona.com>

mmerlos@welab.barcelona

The sigma-1 receptor (σ_1R) is a unique ligand-regulated molecular chaperone. First cloned in 1996, the sequence of the σ_1R does not resemble that of any mammalian protein. σ_1R is located at the ER, mainly in the MAM, and associated to BiP. Under conditions involving stress or dysfunction, the σ_1R is activated and, through physical interaction, exerts a modulatory activity modifying the function of many proteins, including ion channels, GPCRs, growth factor receptors, and others. The role of the σ_1R in several neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), has been clearly evidenced. σ_1R agonists promote neural protection through several mechanisms including neurite outgrowth, increasing anti-apoptotic signaling, inhibiting neuroinflammation, and downregulating cellular stress. σ_1R agonists shows beneficial effects in many in vitro and animal models of AD. The sigma-2 receptor (σ_2R) is known as a separate pharmacological entity respect to σ_1R since the 90's, but it was not identified as TMEM-97 until 2017. Although structurally it is a completely different protein, there are several common features with the σ_1R , including the localization in lipid rafts in the ER, interaction with other proteins, and involvement in the physiopathology of neurodegenerative diseases. In particular, the σ_2R is associated with the LDL receptors and the PGRMC1 in neurons, with a crucial role in the uptake of amyloid beta ($A\beta$) oligomers. Thus, targeting σ_2R inhibits $A\beta$ toxicity in in vitro and in animal models of AD. Other mechanisms recently described include the enhancement of neurotrophic signaling, reduction of neurotoxic microglia stimulation and promotion of neurogenesis. Results with σ_1R and σ_2R ligands in ongoing clinical trials in AD and in other neurodegenerative conditions are eagerly awaited.

O.4. Drug screening in neuropathic pain employing phenotypic neuronal-like models.

Martínez AL^{1,2,3}, Brea J^{1,2,3}, Loza MI^{1,2,3}

¹BioFarma Research Group, Centro CIMUS de Investigación, Universidad de Santiago de Compostela. ²Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela. ³Instituto de Investigaciones Sanitarias (IDIS), Santiago de Compostela.

Despite its high prevalence, neuropathic pain is still an unmet clinical need because new analgesics identified in preclinical studies failed in clinical trials, probably related to the lack of translationality of the HTS assays, where recombinant models are routinely used. To overcome these drawbacks, we developed a sensorial neuron-like model for analgesics HTS employing an immortalized cell line.

We set up a differentiation protocol for F11 cells (a hybrid of neuroblastoma murine cells and rat DRG neurons) to obtain cells with a phenotype of sensory neurons. We focused our study in two neuronal phenotypic features, the electrical excitability and the outgrowth of neurites.

We observed that the excitability of F11 cells (30 mM KCl) was increased after the exposition to a combination of inflammatory mediators. After an HTS trial employing the Prestwick Chemical Library, we found that four calcium channel inhibitors (felodipine, nimodipine, nicardipine and nitrendipine) and an antidepressant (protriptyline) relieved this increase in excitability. Also, as a secondary screening, we noticed that felodipine and nitrendipine protected differentiated F11 cells against neurite shortening induced by the antitumor drug vincristine and the antiviral drug rilpivirine.

This model was revealed to be of interest for HTS in our research on long-COVID-19: one of the clinical profiles related to this pathology are changes in pain perception due to the deleterious effect of proinflammatory cytokines. In agreement with this, we observed that both TNF α and interferon γ induced a significant decrease in neurite length and that TNF α induced a decrease in the excitability of differentiated F11 cells.

O.5. Dolor neuropático y neuroinflamación: papel del receptor sigma-1

Francisco Rafael Nieto López

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina e Instituto de Neurociencias, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada

Instituto de Investigación Biosanitaria, ibs.Granada, Granada, España

El dolor neuropático es muy incapacitante y afecta al 7-10 % de la población. En la actualidad, los tratamientos disponibles no son totalmente eficaces y presentan numerosos efectos indeseables. La falta de eficacia de estos tratamientos probablemente se deba a que no van dirigidos a atenuar la neuroinflamación asociada a esta patología. El receptor sigma-1 es una chaperona que modula numerosas proteínas que es considerada una diana emergente para el tratamiento del dolor neuropático, sin embargo, los mecanismos por los cuales alivia el dolor neuropático no se conocen al 100%.

Investigaciones de nuestro laboratorio ponen de manifiesto que la inhibición genética o farmacológica del receptor sigma-1 alivia el dolor neuropático inducido por antineoplásicos o la sección parcial del nervio ciático en ratones. También hemos demostrado que cuando se produce la lesión del nervio ciático, el receptor sigma-1 (de localización exclusiva neuronal) se activa y externaliza a la membrana plasmática de las neuronas sensoriales dañadas del ganglio de la raíz dorsal (DRG, de sus siglas en inglés). Además, demostramos que el receptor sigma-1 participa en la interacción neurona-macrófago en el DRG, ya que las neuronas dañadas con el receptor sigma-1 externalizado están mayoritariamente rodeadas de macrófagos. Durante el daño nervioso, la inhibición sigma-1 reduce la infiltración de macrófagos, y el incremento de IL-6 y de CCL-2 (implicado en el reclutamiento de macrófagos). Por otro lado, aunque la lesión del nervio periférico también produce microgliosis y astrocitosis en la médula espinal, la inhibición sigma-1 muestra resultados poco concluyentes, que no nos permiten afirmar que el receptor sigma-1 module la neuroinflamación central. No obstante, otros grupos de investigación si han demostrado que la inhibición sigma-1 reduce la neuroinflamación espinal en otros modelos de dolor neuropático.

En resumen, el receptor sigma-1 tiene un papel clave en la neuroinflamación periférica a nivel del DRG, pero no está tan clara su implicación en la neuroinflamación central, algo que concuerda con la mayor expresión de este receptor en el DRG. La contribución del receptor sigma-1 a la neuroinflamación periférica podría explicar, al menos en parte, su eficacia aliviando el dolor neuropático y otros tipos de dolor crónico. No obstante, se necesitan más estudios para clarificar esta cuestión.

O.6. Neuroinflamación durante el dolor de la artritis reumatoide: papel de los receptores sigma-1

Miguel Ángel Huerta Martínez¹²³, Carlos Gómez-Navas¹²³, Antonia Artacho-Cordón¹²³, Rafael González-Cano¹²³, Enrique J. Cobos¹²³⁴, Francisco R. Nieto^{123'}

1. *Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España.* 2. *Instituto de Neurociencias, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Granada, Granada, España.* 3. *Instituto de Investigaciones Biosanitarias ibs. Granada, Granada, España.* 4. *Instituto Teófilo Hernando I+D del Medicamento, Madrid, España*

El dolor es un síntoma prevalente y el más incapacitante para los pacientes con artritis reumatoide. La inflamación articular y la neuroinflamación participan en gran medida en el dolor artrítico. El receptor sigma-1 es una chaperona moduladora que se expresa en áreas del sistema nervioso central y periférico relevantes para la transmisión del dolor y su bloqueo es eficaz en diversos modelos preclínicos de dolor patológico y en ensayos clínicos para dolor neuropático. Además, sus efectos se asocian a una disminución de la neuroinflamación. Por tanto, hipotetizamos que el receptor sigma-1 podría disminuir el dolor artrítico por su efecto neuroinmunomodulador.

Para validar esta hipótesis, empleamos el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas Wistar. Para bloquear el receptor sigma-1 empleamos una estrategia genética (ratas KO para sigma-1) y otra farmacológica (antagonista sigma-1 S1RA). Se evaluó el dolor mediante el test de von Frey (alodinia mecánica), el test de acetona (alodinia al frío), el Hargreaves test (alodinia al calor) y el grip strength (fuerza de agarre) y la neuroinflamación mediante citometría de flujo (FACS) e inmunohistoquímica en médula y DRG.

Nuestros resultados sugieren que las ratas KO sigma-1 y las tratadas con S1RA presentan mejoría en diversos parámetros de dolor: alodinia mecánica, alodinia al frío, alodinia al calor y fuerza de agarre. Además, tanto el bloqueo genético como farmacológico redujo la microgliosis espinal y la migración de macrófagos al DRG. Proponemos que parte del efecto analgésico viene mediado por la disminución de la neuroinflamación central (médula) y periférica (DRG) observada tras el bloqueo sigma-1, aunque otros mecanismos podrían contribuir.

En conclusión, el bloqueo del receptor sigma-1 disminuye el dolor asociado a la artritis inducida por colágeno (CIA) y la neuroinflamación. Por tanto, se presenta como una diana terapéutica interesante para el tratamiento del dolor artrítico.

Financiación: Proyecto PID2021-123058NA-I00 de investigación financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa. Proyecto P20_00132 (Proyectos de Excelencia de la Junta de Andalucía) y Proyecto B-CTS-642-UGR20 (Proyectos I+D+i del Programa Operativo FEDER Andalucía). Miguel Ángel Huerta Martínez (Universidad de Granada)

O.7. Epigenetic new approaches for Alzheimer's treatment: TET2 activators and G9a inhibitors

Christian Griñán-Ferré^{1,2}, Mercè Pallàs¹, Aina Bellver-Sanchis¹, Isabel Puig³, Hèctor G. Palmer³, Xavier Barril^{4,5}, Carles Galdeano⁴

1. *Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institut de Neurociències, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII, 27, 08028 Barcelona, Spain.*
2. *Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), National Institute of Health Carlos III, 28029 Madrid, Spain.*
3. *Stem Cells and Cancer Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), CIBERONC, Barcelona, Spain.*
4. *Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology and Physical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain.*
5. *Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona 08010, Spain.*

The regulation of epigenetic mechanisms is essential for human health, brain development, and function, being implicated in neurological disorders. Recent studies suggest that several epigenetic modifications, including mutations and activity changes in several enzymes of the epigenetic machinery, have been associated with age-related cognitive decline and Alzheimer's disease (AD).

Several pieces of evidence indicate that downregulation of the master epigenetic regulator, the ten-eleven translocation (TET2) and its enzyme product 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) is closely related to the occurrence of AD. Recently, some of us have discovered a novel series of small molecules that allosterically activates TET2 and are able to increase 5-hmC levels. [1] In this talk, we will show the chemical structure of 7B, our lead molecule and how this compound is able to improve cognitive capabilities, reducing neuroinflammatory markers as well as β -amyloid plaques in 5XFAD, a well-established AD mice model.

Moreover, we will present our results regarding the upregulation of lysine methyltransferase (G9a) and its repressive mark H3K9me2 in the brains of AD patients and how G9a inhibition treatment promotes the induction of neuronal plasticity and a reduction of neuroinflammation in SAMP8. Strikingly, these neuroprotective effects were reverted by the pharmacological inhibition of Glial Maturation Factor B (GMFB) in mice. Finally, we will show evidence that GMFB activity is controlled by G9a-mediated lysine methylation as well as we identified that G9a directly bound GMFB and catalyzed the methylation at lysine (K) 20 and K25 in vitro. Therefore, our findings confirm undescribed approaches by which epigenetic therapies mediate changes in neuroinflammation promoting neuroprotection in AD.

[1] PCT/EP2022/060579

COMUNICACIONES ORALES

CO.1. ¿*Cannabis sativa* como agente neuroprotector y antioxidante?

Guillermo Cásedas* (gcasedas@usj.es), Henar Rojas-Márquez (henar.rojas@ehu.eus)
Cristina Moliner (acmoliner@usj.es), Francisco Les (fles@usj.es), Carlota Gómez (cgomez@usj.es), Víctor López (ilopez@usj.es)

Universidad San Jorge. Murcia

Introducción: *Cannabis sativa* L. es una planta medicinal que contiene numerosos constituyentes químicos entre los que se incluyen cannabinoides como el trans- Δ -9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC) y el cannabidiol (CBD), pero también flavonoides, como derivados de luteolina y apigenina. En particular, la fracción polar del cáñamo, que incluye muchos compuestos fenólicos, se ha pasado por alto en los estudios de investigación comparación con la fracción más lipofílica que contiene cannabinoides [1]; sin embargo, estudios recientes han demostrado que la planta *C. sativa* alberga un alto contenido en polifenoles [2]. Estos compuestos se han utilizado y comercializado durante décadas debido a su actividad antioxidante y la capacidad de reducir las especies reactivas de oxígeno (ROS) [3–5].

Objetivo: evaluar la capacidad antioxidante y neuroprotectora de un extracto polifenólico de cannabis y de combatir el estrés oxidativo en células neuronales.

Material y métodos: la actividad antioxidante se evaluó *in vitro* empleando diversos métodos (DPPH, radical superóxido, FRAP, ORAC), su potencial neuroprotector sobre enzimas que son dianas farmacológicas en el sistema nervioso central como acetilcolinesterasa (AChE) y monoamino oxidasa A (MAO-A). También se comprobó la citotoxicidad del extracto acuoso en la línea neuronal N2a de neuroblastoma de ratón mediante la técnica MTT y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En la línea humana SH-SY5Y mediante la técnica de Western Blot, se cuantificó la expresión de proteínas antioxidantes PRDX1 y PRDX3 y el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) así como la expresión génica por RT-qPCR del factor nuclea kappa B (NFKB) y la proteína BCL2.

Resultados: el extracto acuoso mostró una buena capacidad antioxidante *in vitro* y en ensayos de inhibición enzimática, mostró actividad inhibitoria de AChE y MAO-A. Los ensayos en Neuro-2a demostraron que el extracto polifenólico no era citotóxico y exhibió propiedades citoprotectoras propiedades frente al peróxido de hidrógeno y en la producción de ROS [6]. Posteriormente, se observó cómo las proteínas antioxidantes PRDX1 y PRDX3, así como el factor nuclear-eritroide 2 (Nrf2), aumentaban su expresión en las células tratadas con el extracto polifenólico con respecto a las células sin tratar. Por otro lado, la qPCR reveló que NFKB disminuía su expresión génica en estas células, así como la proteína BCL2 aumentaba los niveles con respecto a las células control.

Conclusiones: Los polifenoles presentes en *Cannabis sativa* tienen un gran potencial antioxidante y neuroprotector ya que produjeron efectos citoprotectores en ambas líneas celulares modulando la respuesta frente al estrés oxidativo.

Referencias

1. Andre, C.M.; Hausman, J.F.; Guerriero, G. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 19.
2. Mazzara, E.; Carletti, R.; Petrelli, R.; Mustafa, A.M.; Caprioli, G.; Fiorini, D.; Scortichini, S.; Dall'Acqua, S.; Sut, S.; Nuñez, S.; et al. Green extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) using microwave method for recovery of three valuable fractions (essential oil, phenolic compounds and cannabinoids): a central composite design optimization study. *J. Sci. Food Agric.* 2022.
3. Cásedas, G.; Bennett, A.C.; Burgos, E.G.; Serranillos, M.P.G.; López, V.; Smith, C.; Smith, C. Polyphenol - associated oxidative stress and inflammation in a model of LPS - induced inflammation in glial cells: do we know enough for responsible compounding? *Inflammopharmacology* 2018.
4. Cásedas, G.; Les, F.; González-Burgos, E.; Gómez-Serranillos, M.P.; Smith, C.; López, V. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits different enzymes involved in central nervous system pathologies and type-2 diabetes. *South African J. Bot.* 2018, 120, 241–246.
5. Les, F.; Arbonés-Mainar, J.M.; Valero, M.S.; López, V. Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. *J. Ethnopharmacol.* 2018, 220, 67–74.
6. Cásedas, G.; Moliner, C.; Maggi, F.; Mazzara, E.; López, V. Evaluation of two different *Cannabis sativa* L. extracts as antioxidant and neuroprotective agents. *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 1–11.