



## **EVALUACIÓN DE NEUROPROTECTORES BASADOS EN ACILETANOLAMIDAS EN MODELOS ANIMALES DE HIPOXIA CEREBRAL PERINATAL Y ADULTA**

**Rafael Maldonado López**

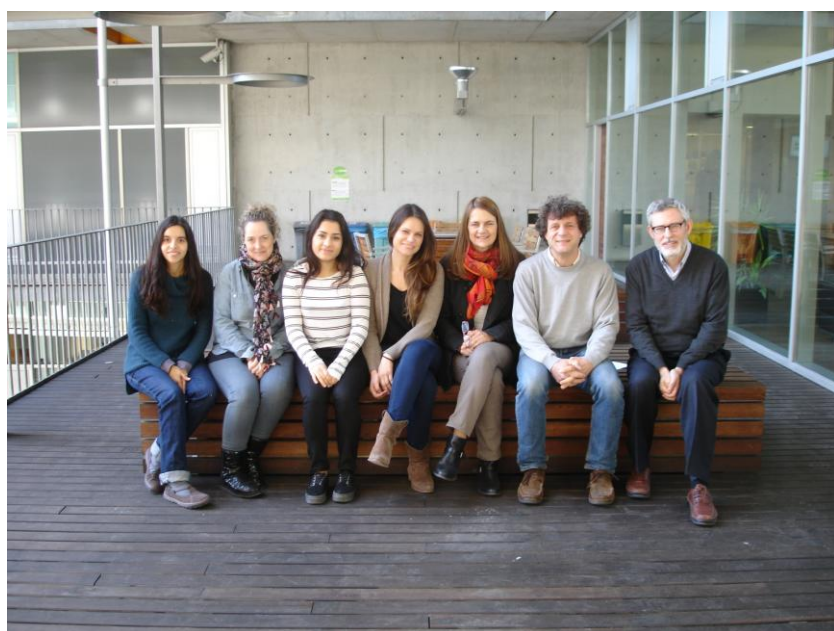
Laboratori Neurofarmacologia-Neurophar UPF

**Fernando Rodríguez de Fonseca**

Hospital Carlos Haya Málaga

**Manuel Portavella García**

Facultad de Medicina Universidad de Sevilla





## 1. Resumen del proyecto

Las aciletanolamidas oleoiletanolamida y palmitoiletanolamida son compuestos lipídicos con propiedades neuroprotectoras en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, su rol como neuroprotectores en el daño cerebral derivado de hipoxia aguda sigue aún por determinar. En este proyecto se evalúan los roles de estos lípidos en: a) modelos animales de infarto por hipoxia-isquemia, esto es, hipoxia aguda derivada del pinzamiento de la arteria carótida seguida de estrés hipóxico, y b) un modelo de hipoxia perinatal que se asemeja a la parálisis cerebral producida por un parto distócico en humanos. Los estudios evalúan los efectos del pretratamiento y postratamiento con aciletanolamidas en los resultados a nivel conductual y fisiológico en sujetos experimentales que sufren alguno de los dos modelos de hipoxia. Los estudios se realizan en ratas y ratones normales, y también en animales genéticamente modificados deficientes en los receptores para la aciletanolamida, básicamente PPAR-alfa y TRPV1. Adicionalmente, el consorcio evalúa la eficacia farmacológica de los análogos de aciletanolamidas. Para ello, se emplean derivados sulfamoil, patentados por el consorcio, que muestran actividad neuroprotectora. El objetivo final del proyecto es entender el rol de estos lípidos en la hipoxia del cerebro y aprovechar sus funciones protectoras para el desarrollo de terapias eficientes que puedan atenuar el impacto de la hipoxia en la función cerebral, tanto en adultos como en recién nacidos.

Los **objetivos específicos** del proyecto son:

1. **Evaluar los roles de la oleoiletanolamida (OEA) y la palmitoiletanolamida (PEA) en modelos animales (rata y ratón) de infarto por hipoxia-isquemia perinatal**, esto es, hipoxia aguda derivada del pinzamiento de la arteria carótida seguida de estrés hipóxico. Los estudios evaluarán los efectos del pretratamiento y postratamiento con estas aciletanolamidas en los sujetos experimentales a nivel conductual y fisiológico.
2. **Evaluar las funciones de OEA y PEA en modelos de hipoxia perinatal en rata, que se asemejan a la parálisis cerebral producida por un parto distócico en los seres humanos**. Los estudios evaluarán los efectos del pretratamiento y postratamiento con acitelanolamidas en los sujetos experimentales a nivel conductual y fisiológico.

3. **Evaluar las dianas farmacológicas OEA y PEA por sus efectos en el infarto por hipoxia-isquemia perinatal.** Este problema se solucionará estudiando los efectos de estas aciletanolamidas en animales modificados genéticamente que carecen de los receptores para las aciletanolamidas, incluyendo PPAR-alfa, TRPV1 y CB1, así como la enzima FAAH, que cataliza la degradación de OEA/PEA.
4. **Evaluar la eficacia farmacológica de las aciletanolamidas y sus análogos,** principalmente el neuroprotector octadecilpropil sulfamida, un sulfamoil derivado de OEA con potentes propiedades agonistas PPAR-alfa.

El **objetivo final** del proyecto es generar evidencia científica sobre el papel de estos lípidos importantes en la hipoxia cerebral y definir su papel protector para el desarrollo de terapias eficaces que puedan atenuar el tremendo impacto de la hipoxia sobre la función cerebral, tanto en adultos como en recién nacidos.

## 2. Resultados

- **La palmitoiletanolamida (PEA) es un neuroprotector en modelos de hipoxia-isquemia neonatal en rata.** Los déficits en la memoria de reconocimiento y referencia espacial derivados de la hipoxia-isquemia neonatal fueron prevenidos mediante el tratamiento con 10 mg/kg de PEA administrada una hora después de la lesión. Este tratamiento también revertía los cambios patológicos en el cerebro asociados a la lesión.
- **La eficacia neuroprotectora de oleoiletanolamida (OEA) ha sido verificada en modelos murinos de hipoxia-isquemia perinatal.** Las deficiencias motoras, como hiperreflexia e hiperlocomoción, observadas tras una lesión por hipoxia-isquemia se redujeron mediante el tratamiento con 5 mg/kg de OEA administrada 30 minutos antes del procedimiento. Esta dosis también redujo el volumen del infarto en el hipocampo y en el córtex motor.
- **Se ha estudiado la expresión del sistema PPARalfa-NAPE-PLD en cerebros que han sufrido asfixia.** En un modelo de asfixia perinatal en rata, los datos señalan la existencia de un claro efecto de la hipoxia en la expresión del sistema PPARalfa-NAPE-PLD-FAAH, fundamentalmente en el hipocampo, asociado con alteraciones comportamentales. Sin embargo, ni la administración de PEA ni de OA revirtieron el daño de forma completa.

- **Una nueva nanoemulsión, patentada y publicada (*Nanomedicine*), permite la administración de OEA por vía oral.** La OEA es un mediador lipídico que actúa como factor de saciedad. El principal factor limitante para su administración es su baja solubilidad en agua. Hemos diseñado y caracterizado nuevas nanoemulsiones como sistema de administración para compuestos hidrofóbicos como la OEA. Los componentes y métodos de preparación de la nanoemulsión fueron seleccionados para lograr las propiedades finales deseadas. A continuación se evaluaron las propiedades *in vivo* de las nanoemulsiones como sistemas de transporte de fármacos ensayando los efectos anoréxicos de la OEA en ratas tras su administración, tanto intragástrica como intraperitoneal. La toxicidad *in vivo* de las nanoemulsiones fue evaluada después de 3 semanas de tratamiento. Las nanoemulsiones demostraron ser estables, no tóxicas y sin efectos en el comportamiento de ingesta alimentaria cuando fueron administradas sin la OEA. Los efectos de la OEA fueron observables después de su administración oral y parenteral con las nanoemulsiones a ratas tras 24 h de ayuno, encontrándose una mayor eficacia respecto al vehículo que contenía Tween 20 después de su administración oral. Estos resultados respaldan la eficacia de estas nanoemulsiones en el transporte de fármacos bioactivos muy hidrofóbicos.
- **Se ha llevado a cabo una caracterización completa de la octadecilpropilsulfamida, confirmando sus características como agonista PPAR-alfa.** Nuestros resultados sugieren que la actividad de la OEA en el receptor PPAR-alfa (por ejemplo, en el metabolismo lipídico y en el comportamiento alimentario) puede ser dissociada de otras acciones en dianas alternativas (por ejemplo, en dolor) porque otros ligandos no cannabimiméticos que interaccionan con el PPAR-alfa, como el CC7, no reproducen el abanico completo actividades farmacológicas de la OEA. Estos resultados proporcionan nuevas oportunidades para el desarrollo de fármacos específicos activadores del PPAR-alfa centrados en derivados sulfamidas con cadenas alquilo largas para el tratamiento de desórdenes metabólicos.
- **La octadecilpropil sulfamida revierte los déficits de memoria inducidos por la hipoxia-isquemia (HI) en ratones.** Se observaron lesiones cerebrales inducidas por HI en el hipocampo y en el córtex ipsilaterales de ratones tratados con vehículo y con sulfamida. Sin embargo, el tratamiento con sulfamida mostró una tendencia a disminuir la dimensión del infarto. Asimismo, la sulfamida revirtió significativamente los déficits de memoria observados en el test de reconocimiento de objetos 7 días después de la HI. No se observaron efectos significativos entre grupos en los otros tests comportamentales. Estos datos revelan, por primera vez, las

propiedades neuroprotectoras de la octadecilpropil sulfamida, y sugieren que el postratamiento con este compuesto después de la lesión por HI puede ser beneficioso en la prevención de alteraciones cognitivas concomitantes.

- **Se ha demostrado un mecanismo molecular crucial implicado en el papel neuroprotector de los receptores cannabinoides CB2 (CB2R) después de hipoxia-isquemia (HI).** Se ha estudiado la implicación de los CB2R en el sustrato comportamental y bioquímico del daño cerebral inducido por HI en el ratón adulto. Se observó daño cerebral ipsilateral inducido por HI por ligadura de la carótida en ratones *wild type* control (WT) en áreas hipocampales y en las cortezas sensoriales, entorrinales y piriformes. En los ratones *knockout* (KO) deficientes en CB2R se apreció un mayor daño cerebral. Se observaron déficits comportamentales en el test de Irwin en ambos genotipos. Sin embargo, mientras que los ratones WT mostraron una recuperación parcial hacia el día 7, los animales KO no lo hicieron. Solo los ratones KO mostraron alteraciones en aprendizaje motor, coordinación y equilibrio, y no se recuperaron con el tiempo. También se observaron déficits profundos de memoria en el test de reconocimiento de objetos 72 h después de inducir la HI en ratones KO y WT sin que se viera recuperación en ningún genotipo, lo cual sugiere que hay un efecto techo en esta función. Asimismo, tanto los ratones KO como los WT mostraron una expresión amplia de la microglía en las áreas lesionadas y alrededor de la zona de penumbra en las áreas lesionadas y en las no lesionadas. Sin embargo, en ratones KO la expresión de la microglía en zonas no lesionadas fue más extensa. Se observó la expresión de TIM-3 en ratones WT en áreas lesionadas asociadas con la microglía activada y en áreas no lesionadas, como el estriado y el córtex motor. En ratones KO, la expresión de TIM-3 aumentó en áreas lesionadas y se extendió a otras no lesionadas, como el tálamo, el septo lateral y el tubérculo olfatorio. Nuestros resultados indican que los receptores CB2 pueden tener un papel neuroprotector crucial después de la inducción de HI a través de la modulación de la proteína inflamatoria TIM-3 en microglía.

- **Los receptores cannabinoides CB1 (CB1R) están implicados específicamente en neuroprotección de la memoria de reconocimiento tras lesiones cerebrales inducidas por hipoxia-isquemia (HI).** Los ratones CB1R *knockout* (KO) y sus controles (WT) fueron sometidos a la ligadura permanente de la arteria carótida común izquierda y a hipoxia. Se observaron lesiones inducidas por la HI en ambos genotipos en hipocampo y córtex ipsilaterales, sin que hubiera diferencias significativas entre ambos genotipos. En los estudios comportamentales, los ratones

WT y KO mostraron déficits de memoria en el test de reconocimiento de objetos 72 h después de la HI. Sin embargo, los ratones WT recuperaron esas funciones 7 días después de la inducción de la HI, mientras que los ratones KO no lo hicieron. Se observaron déficits en el aprendizaje funcional y motor en ambos genotipos después de 24 h, pero se recuperaron 7 días después de la HI. Estos resultados sugieren que los CB1R podrían modular de forma específica los déficits de memoria dependiente del hipocampo asociados con el daño cerebral tras la inducción de HI.

### 3. Relevancia y posible impacto

- La PEA es neuroprotectora en un modelo de hipoxia-isquemia neonatal en rata, reduciendo los déficits de memoria y los cambios patológicos en el cerebro asociados con la lesión. En el modelo de hipoxia-isquemia perinatal en ratón, la OEA podría tener efectos neuroprotectores. La PEA se comercializa en la actualidad para tratar el dolor neuropático y estos resultados podrían facilitar su implementación en la clínica.
- En el modelo de hipoxia-isquemia perinatal en rata, los datos revelan la existencia de un efecto claro de la lesión inducida por hipoxia en la expresión del sistema PPAR $\alpha$ -NAPE-PLD-FAAH, principalmente en el hipocampo, asociado con alteraciones comportamentales. Sin embargo, ni la administración de PEA ni la de OEA revirtieron completamente el daño observado.
- Los análogos de OEA-PEA recientemente desarrollados y caracterizados son dianas terapéuticas prometedoras para el daño cerebral inducido por isquemia.
- En el modelo de hipoxia-isquemia en el adulto, los agonistas CB1 y la octadecilpropil sulfamida son potenciales candidatos terapéuticos para proporcionar neuroprotección de los déficits de memoria asociados al daño cerebral después de la HI.
- El papel neuroprotector de los CB2R se ha asociado con un mayor resultado funcional y menores déficits en aprendizaje motor, coordinación y equilibrio tras la inducción de HI. Una terapia combinada con agonistas CB2R y antagonistas TIM-3 podría proporcionar nuevas dianas para disminuir la inflamación durante la HI y para la reducción de déficits funcionales y motores relacionados.

## 4. Publicaciones

### Artículos científicos

1. Perez Martin, M; Rivera P, Blanco E, Loreface, C.; Decara, J; Pavón FJ, Serrano, A., Rodriguez de Fonseca, F.; Suarez J, (2016).  
*Environmental Enrichment, Age, and PPARalpha interact to regulate neurogenic niches.*  
**Front Neurosci.** (en prensa, 2016) doi: 10.3389/fnins.2016.00089.
2. Blanco E, Galeano P, Holubiec MI, Romero JI, Logica T, Rivera P, Pavón FJ, Suarez J, Capani F, Rodríguez de Fonseca F (2015).  
*Perinatal asphyxia results in altered expression of the hippocampal acylethanolamide/endocannabinoid signaling system associated to memory impairments in postweaned rats.*  
**Front Neuroanat.** 9:141. doi: 10.3389/fnana.2015.00141.
3. Galeano P, Blanco E, Logica Tornatore TM, Romero JI, Holubiec MI, Rodríguez de Fonseca F, Capani F.  
*Life-long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia.*  
**Front Behav Neurosci.** 2015 Jan 5; 8:406. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00406.  
eCollection 2014.
4. Fresno N, Macías-González M, Torres-Zaguirre A, Romero-Cuevas M, Sanz-Camacho P, Elguero J, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Goya P, Pérez-Fernández R. (2015)  
*Novel Oxazolidinone-Based Peroxisome Proliferator Activated Receptor Agonists: Molecular Modeling, Synthesis, and Biological Evaluation.*  
**J Med Chem.** 2015 Aug 27; 58(16):6639-52. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00849.  
Epub 2015 Aug 12. PubMed PMID: 26226490.
5. Galeano P, Romero JI, Luque-Rojas MJ, Suárez J, Holubiec MI, Bisagno V, Santín LJ, De Fonseca FR, Capani F, Blanco E. (2013).  
*Moderate and severe perinatal asphyxia induces differential effects on cocaine sensitization in adult rats.*  
**Synapse.** 67(9): 553-67. doi: 10.1002/syn.21660.



6. Moreno-Santos I, Pavón FJ, Romero-Cuevas M, Serrano A, Cano C, Suardiáz M, Decara J, Suarez J, de Fonseca FR, Macías-González M (2014).  
*Computational and biological evaluation of N-octadecyl-N'-propylsulfamide, a selective PPARα agonist structurally related to N-acylethanolamines.*  
**PLoS One.** 20;9(3): e92195. doi: 10.1371/journal.pone.0092195.
7. Rivera P, Arrabal S, Vargas A, Blanco E, Serrano A, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J (2014).  
*Localization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) and N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus.*  
**Front. Neuroanat.** 8:12. doi: 10.3389/fnana.2014.00012.
8. Wulff-Pérez M, Pavón FJ, Martín-Rodríguez A, de Vicente J, Alen F, de Fonseca FR, Gálvez-Ruiz MJ, Serrano A (2014).  
*Preparation, characterization and in vivo evaluation of nanoemulsions for the controlled delivery of the antiobesity agent N-oleoylethanolamine.*  
**Nanomedicine (Lond)** 9(18): 2761-72. doi:10.2217/nnm.14.35.
9. Kossatz E, Maldonado R and Robledo P.  
*Exacerbated glial activation and TIM-3 expression of CB2 receptor knockout mice following hypoxia-ischemia insult. March 2016.*  
**European Neuropsychopharmacology** (presentado)
10. Galeano P, Romero JI, Holubiec MI, Herrera I, Logica Tornatore T, Suárez J, Capani F., Blanco E, Rodríguez de Fonseca F (2016).  
*Palmitoylethanolamide exerts neuroprotectant effects in neonatal ischemia by reducing hippocampal inflammation that seems to be mediated by PPARα.*  
Manuscrito en preparación
11. Kossatz E, Maldonado R and Robledo P.  
*Memory deficits induced by hypoxia-ischemia insult in adult mice are aggravated in CB1 receptor knockout mice.*  
Manuscrito en preparación

12. Kossatz E, Maldonado R and Robledo P.

*Role of octadecylpropyl sulfamide in neuroprotection following hypoxia-ischemia insult.*

Manuscrito en preparación

### **Comunicaciones**

Kossatz E, Maldonado R, Robledo P.

Role of cannabinoid CB2 receptors in brain damage following hypoxia-ischemia in adult mice.

16th SEIC Annual Meeting 22-23 septiembre 2015, Granada. Póster.

Kossatz E, Maldonado R, Robledo P.

*Role of cannabinoid CB2 receptors in brain damage following hypoxia-ischemia in adult mice.*

SENC and RTA Scientific Meeting. 22-23 septiembre 2015, Granada. Presentación oral.

Kossatz E, Maldonado R, Robledo P.

*Development of an experimental model of hypoxia-ischemia in adult mice.*

SENC and RTA Scientific Meeting. 24-25 septiembre 2013, Oviedo. Póster y presentación oral.

Kossatz E, Peñalba B, Maldonado R, Robledo P.

*Development of an experimental model of hypoxia-ischemia in adult mice.*

12th FELASA SECAL Congress. 10-13 junio 2013, Barcelona. Póster.

López MV, Rodríguez de Fonseca F, Robledo P, Maldonado R, Fernández Espejo E.

*Oleoylethanolamide and palmitoylethanolamide exert neuroprotection of culture cortical neurons subjected to hipoxia.*

14th SEIC Annual Meeting. 28-30 noviembre 2013, Barcelona. Presentación oral.

Kossatz E, Fernández Espejo E, Rodríguez de Fonseca F, Robledo P, Maldonado R.

*Role of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in brain damage following hypoxia-ischemia in adult mice.*

14th SEIC Annual Meeting. 28-30 noviembre 2013, Barcelona. Póster.

## **Patentes**

Autores: Ruth Pérez, Nieves Fresno, Jose Elguero, Pilar Goya, Ana Belen Torres, Francisco Javier Pavon, Miguel Romero Cuevas, Fernando Rodríguez de Fonseca, Manuel Macias.

Título: Derivados de Oxazolidinona como ligandos PPAR

Número de solicitud: (ES) P201331058

Data de prioridad: 11/07/2013

País de prioridad: Internacional

Entidad titular: Fundación IMABIS y CSIC

Situación: remitida