ANALES DE LA
Academia de Ciencias de Cuba



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo original de investigación

Efecto neuroprotector de JM-20 en modelos preclínicos de la enfermedad de Parkinson

Luis Arturo Fonseca-Fonseca [1] https://orcid.org/0000-0001-6904-5854
Nancy Pavón Fuentes [2] https://orcid.org/0000-0003-0998-8601
Jeney Ramírez Sánchez [1] https://orcid.org/0000-0001-6904-5854
Alejandro Saúl Padrón Yaquis [1] https://orcid.org/0000-0002-4182-8168
Tiago Fleming Outeiro [3] https://orcid.org/0000-0003-1679-1727
Estael Ochoa Rodríguez [4] https://orcid.org/0000-0002-0541-1816
Yamila Verdecia Reyes [4] https://orcid.org/0000-0003-4152-4209
Abel Mondenlo Rodríguez [1] https://orcid.org/0000-0003-3318-1787
Víctor Diogenes Amaral da Silva [5] https://orcid.org/0000-0001-8032-9663
Silvia Lima Costa [5] https://orcid.org/0000-0002-8975-3871
Yanier Núñez-Figueredo [1*] https://orcid.org/0000-0001-5633-4518

[1] *Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. La Habana, Cuba*
[2] *Centro Internacional de Restauración Neurológica. La Habana, Cuba*
[3] *Departamento de Neurodegeneración Experimental, Centro de Imágenes Bioestructurales de la Neurodegeneración, Universidad Médica de Göttingen. Göttingen, Alemania*
[4] *Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Química, Universidad de La Habana. La Habana, Cuba*
[5] *Laboratorio de Neuroquímica y Biología Celular, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Bahía. Salvador Bahía, Brasil*

[*] *Autor para la correspondencia:* yanier.nunez@cidem.cu

RESUMEN

Introducción: El JM-20 es una molécula híbrida, obtenida por síntesis química, la cual presenta varias pruebas preclínicas que validan su potencial terapéutico como fármaco modificador de la enfermedad de Parkinson. **Objetivos:** Mostrar bases para el desarrollo de un nuevo candidato terapéutico para los pacientes con la enfermedad de Parkinson. **Métodos:** Se llevaron a cabo estudios in vitro, in silico e in vivo, así como una correlación entre variables morfológicas y moleculares con la conducta motora para evaluar el efecto del JM-20 sobre la α-sinucleína y en modelos de parkinsonismo inducido por neurotoxinas. **Resultados:** Se mostró el claro efecto protector del JM-20 en diferentes modelos celulares relacionados con la enfermedad de Parkinson. Además, los estudios de acoplamiento y dinámica in silico demostraron que el JM-20 interactúa con la α-sinucleína, lo que induce la formación de oligómeros no tóxicos de la proteína. En modelos animales en dosis orales de 40 mg/kg, evitó el daño conductual característicos de los modelos neurotóxicos empleados. Por otro lado, los estudios ex vivo en cerebros de ratas confirmaron que la administración intragástrica de JM-20 mejoraba los parámetros oxidativos en la sustancia negra y el estriado. **Conclusiones:** Esta revisión proporciona evidencia farmacológica de la actividad neuroprotectora de esta nueva molécula, lo que respalda su utilidad para el desarrollo de nuevos fármacos antiparkinsonianos.

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Darwin A. Arduengo García
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Premio Nacional Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2024

Palabras clave: α-sinucleína; disfunción mitocondrial; enfermedad de Parkinson; estrés oxidativo y JM-20.

Neuroprotective activity of JM-20 in preclinical models of Parkinson's disease

ABSTRACT

Introduction: JM-20 is a hybrid molecule obtained through chemical synthesis, which has undergone several preclinical trials that validate its therapeutic potential as a disease-modifying drug for Parkinson's disease. The complexity and multiplicity of the pathophysiological events associated with this disease are at the heart of the challenges posed by the development of effective treatments that reverse, halt, or slow the course of neurodegeneration. **Objective:** To show the basis for the development of a new therapeutic candidate for patients with Parkinson's disease. **Methods:** In vitro, in silico and in vivo studies, as well as a correlation between morphological and molecular variables with motor behavior were carried out to evaluate the effect of JM-20 on α-synuclein and in models of neurotoxin-induced parkinsonism. **Results:** The results showed a clear protective effect of JM-20 in different cellular models related to Parkinson's disease. In addition, in silico docking and dynamics studies demonstrated that JM-20 interacts with α-synuclein, inducing the formation of non-toxic oligomers of the protein. In animal models, JM-20, at oral doses of 40 mg/kg, prevented the behavioral damage characteristic of the neurotoxic models used. Furthermore, ex vivo studies in rat brains confirmed that intragastric administration of JM-20 improved oxidative parameters in the substantia nigra and striatum. **Conclusions:** This review provides pharmacological evidence of the neuroprotective activity of this new molecule, supporting its usefulness for the development of new anti-Parkinson's drugs.

Keywords: α-synuclein; mitochondrial dysfunction; Parkinson's disease; oxidative stress and JM-20.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) idiopática es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central (SNC), que aparece en la edad adulta y constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (EA). [1] Actualmente la etiología de la EP idiopática es desconocida, pero se sabe que una serie de mecanismos patológicos se encuentran implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas, tales como: el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la desregulación en la homeostasis del calcio, la neuroinflamación, la apoptosis y la excitotoxicidad. [2] La complejidad y multiplicidad de eventos asociados a la muerte neuronal en la EP pueden explicar la carencia de terapias efectivas contra esta enfermedad. [1] A pesar de todo el conocimiento acerca la fisiopatología de la EP, no existe ningún fármaco capaz de detener o revertir la muerte y degeneración de la vía nigroestriatal. El tratamiento contemporáneo se basa en la utilización de fármacos que intentan compensar el déficit dopaminérgico nigroestriatal. [3]

Debido a la carencia de fármacos efectivos y a la gran diversidad de eventos fisiopatológicos en los últimos años se ha sugerido la combinación en una molécula de varios grupos estructurales con dianas farmacológicas variadas y conocidas. En este último enfoque se diseña un único compuesto que actúe, simultáneamente, en 2 o más blancos farmacológicos específicos, implicados en el desarrollo de la EP. [4] La administración de una sola molécula, que actúe sobre varios blancos, puede disminuir considerablemente los efectos secundarios derivados de las interacciones entre los fármacos y podría tener un perfil farmacocinético más predecible, en comparación con los fármacos administrados en combinación. [5,6,7]) Siguiendo esta lógica de diseño, el laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana (UH) en conjunto con el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), diseñaron y sintetizaron la molécula: 3-etoxicarbonil-2-metil-4-(2-nitrofenil)-4,11-dihidro-1H-pirido [2,3-b][1,5]-benzodiacepina, en lo adelante JM-20. Una benzodiacepina químicamente fusiona-

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

da a un anillo dihidropiridínico. Este compuesto fue químicamente diseñado para el tratamiento de la isquemia cerebral, demostrándose varios mecanismos neuroprotectores. [8] Estudios previos demostraron que el JM-20 preserva la función mitocondrial luego de un daño mitocondrial por un exceso de calcio, presenta acción antioxidante y protectora ante un aumento no fisiológico de las concentraciones intracelulares de calcio, inhibe la excitotoxicidad mediada por glutamato, presenta actividad antiinflamatoria, antiapoptótica e inhibe la formación de agregados tóxicos de α-sinucleína. [9,10,11,12,13,14,15] Además de los efectos neuroprotectores antes descritos, se demostró su capacidad protectora en modelos de demencia/déficit cognitivo y traumatismo craneoencefálico. [16,17.18]

Las propiedades neuroprotectoras, demostradas para la nueva molécula, ofrecen evidencias farmacológicas sobre las potencialidades del JM-20 para incidir en varios mecanismos patológicos que median la aparición clínica de los síntomas descritos en la EP. Teniendo en cuenta lo anterior, el trabajo que aquí se presenta tiene como objetivo general: evaluar mecanismos moleculares asociados al efecto terapéutico; así como el efecto neuroprotector del JM-20 en modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de EP.

MÉTODOS

Diseño experimental

El estudio se dividió en 4 fases: ensayos *in vitro* (I y II) para evaluar el efecto neuroprotector del JM-20; ensayo *in silico* (III) para evaluar la estructura molecular del JM-20 y la α-sin; ensayos *in vivo* (IV) para indagar el efecto de la administración sistémica del JM-20 sobre la conducta motora en modelos de parkinsonismo inducido por las neurotoxinas: 6-OHDA y rotenona; y ensayos morfológicos y de estrés oxidativo (V) para evaluar el efecto sobre el número de células dopaminérgicas, la presencia de astrocitos y parámetros oxidativos cerebrales. Finalmente se realizaron estudios de correlación entre variables morfológicas y moleculares con la conducta motora (VI) representados con líneas rojas discontinuas (figura 1).

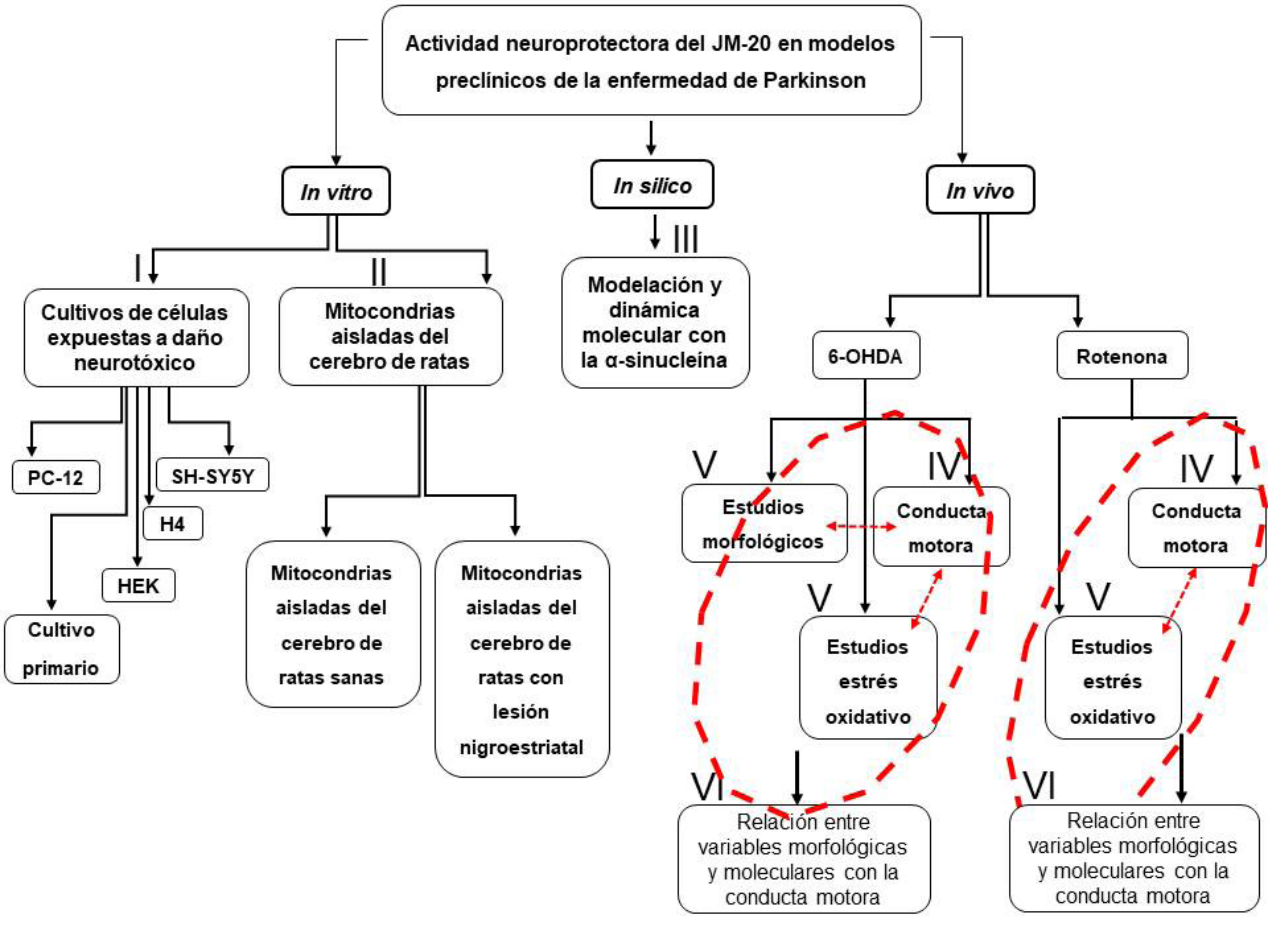


Fig. 1. Diseño experimental. Los números romanos sobre los cuadrantes representan los experimentos realizados correspondientes a los objetivos que se siguieron en el presente trabajo

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Reactivos

Todos los reactivos que fueron empleados son de Sigma-Aldrich® (Alemania), excepto algunos, los cuales serán aclarados en el documento. Para los estudios celulares las soluciones se filtraron con membranas de 0,2 µm (TPP, Suiza), en condiciones asépticas, para eliminar cualquier posible contaminación. El JM-20 fue suministrado por el laboratorio de Síntesis Orgánica del CIDEM.

Preparación del JM-20

El JM-20 para los experimentos *in vitro* fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). [8] Se emplearon un amplio rango de concentraciones (0,0001-100) µM. Todas las diluciones se realizaron partiendo de la solución madre (en DMSO al 100 %). Esto garantizó que el DMSO, en cada pozo de cultivo, constituyera sólo el 1 % (1/1000) del volumen total.

El JM-20 para los experimentos *in vivo* fue suspendido en CMC al 0,05 % a temperatura ambiente. Se empleó un mortero donde al JM-20 se le añadió, paulatinamente, la suspensión de CMC hasta lograr la concentración deseada. Para las diferentes dosis, las concentraciones se ajustaron con el objetivo de administrar un volumen constante de 10 mL/kg de peso. El compuesto fue preparado inmediatamente antes de su uso, y la suspensión fue transferida a un tubo de centrífuga de 15 mL (Corning, EE. UU) y mantenida a temperatura ambiente hasta su administración. En todos los casos el compuesto se administró por vía oral, mediante una cánula intragástrica acoplada a una jeringuilla de 5 mL (BD, Jeripak, México). Antes de administrar a cada animal la suspensión fue resuspendida, para garantizar la homogeneidad de esta.

Animales de experimentación

Los estudios *in vivo* se realizaron con ratas (*Rattus norvegicus*) machos adultos de la línea Wistar, con pesos entre 200 g y 250 g al comienzo del experimento, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Mayabeque, Cuba. Los animales se mantuvieron en el bioterio del CIDEM, en cajas plásticas traslúcidas a una temperatura media de 24 ºC (±2), con suministro de alimentos y agua *ad libitum* y períodos de luz y oscuridad de 12 h. Las ratas se mantuvieron en grupos de siete7 por caja, después de la cirugía.

Consideraciones éticas

En este estudio se respetaron todas las normas establecidas en el código para la ética de la experimentación animal. Se garantizó la autenticidad genética de los animales, lo cual se logró adquiriendo los animales en centros de cría reconocidos. La importancia de la calidad genética para las investigaciones, desde el punto de vista biológico, radica en que los resultados de cualquier experimento pueden ser reproducibles en cualquier otro lugar donde se repita y desde el punto de vista ético, se garantiza la utilización de un menor número de animales.

Por otro lado, se llevó a cabo el control de la calidad higiénica, dado que esta influye directamente sobre la validez del experimento, al reducir la variabilidad de los resultados y por ende la posibilidad de cometer errores. Para ello, en el curso de la investigación, los animales se manipularon y atendieron por un personal calificado, buscando disminuir el estrés, dado que este provoca alteraciones en la homeostasis del animal y por lo tanto una variabilidad en las respuestas fisiológicas y conductuales.

Los experimentos se realizaron evitando en todo momento el sufrimiento de los animales y se utilizaron los métodos menos cruentos posibles para cada maniobra en particular, minimizando el dolor, el número de animales empleados y garantizando una muerte incruenta por eutanasia. Todos los protocolos de experimentación fueron aprobados y monitoreados por el comité de ética y el grupo de control de calidad del CIDEM.

Estudios *in vitro*

Ensayos de agregación de la proteína α-sinucleína

La α-sinucleína fue purificada según el protocolo descrito por Coelho-Cerqueira et al. (2013). [19] Para evaluar el efecto del JM-20 sobre la formación de amiloide se incubaron la α-sin (120 µM) en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4; NaN3 0,02 %) con o sin JM-20 en una proporción de 1:1 o 1:10 en agitación (rotación a 24 rpm) a 37 °C durante 3 días. A las 24 h, 48 h y 72 h de incubación con JM-20 se realizó un ensayo de unión al rojo Congo según r Palhano *et al.* (2009), con algunas modificaciones. [15,20])

Estudios en cultivos primarios y celulares

Los cultivos primarios fueron preparados a partir de tejidos mesencefálicos ventrales de ratas Wistar según el protocolo descrito por Santos *et al.* (2017). [21] Estos se trataron con 10 µM de agregados de α-sin sin o con JM-20 o en condiciones de control durante 48 h y posteriormente se evaluó la muerte celular mediante un ensayo con yoduro de propidio según el procedimiento descrito Santos *et al.* (2022). [15]

Para el trabajo con la línea celular H4 y HEK, se siguió el protocolo descrito por Santos *et al.* (2022). [15] Ambas fueron transfectadas con los plásmidos que codifican α-sinT de tipo salvaje y synphilin-1-V5 y tras 16 h (H4) y 24 h (HEK) de incubación se añadió (1, 5 y 10) µM de JM-20 disuelto en DMSO a los cultivos durante 24 h. Se utilizó un grupo de control expuesto a DMSO para comparar los resultados. Fi-

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

nalmente, los cultivos fueron sometidos a estudios inmunocitoquímicos realizados según los protocolos descritos por Santos *et al.* (2022). [15]

Por otro lado, para el trabajo con las líneas celulares PC-12 y SHSY-5Y se siguió el protocolo descrito por Fonseca Fonseca *et al*. 2019 y 2021, respectivamente. [22,23] Se trataron las células SHSY-5Y con diferentes concentraciones de JM-20 (0,001, 0,01, 0,1 y 1) μM) y se incubaron con rotenona (20 μM). Las células PC-12 se expusieron a 6-OHDA (50-400 μM en ausencia (control) o presencia de JM-20 (0,001-100) μM durante 24 h, mientras que para ambas el grupo de control solo contenía DMSO. Se determinó la citotoxicidad celular inducida por esta toxina a través del ensayo colorimétrico de MTT en diferentes momentos de incubación.

Para los estudios mitocondriales se utilizaron mitocondrias aisladas del cerebro de ratas dañadas con 6-hidroxidopamina o rotenona, según fue descrito por Fonseca Fonseca *et al.*, 2019 y 2021, respectivamente. [22,23] Se determinó el potencial de membrana mitocondrial (ΔΨm) y su hinchazón.

Estudios *in silico*

Los estudios de dinámica molecular se reanalizaron utilizando el programa AutoDock Vina 1.1.2. El gráfico 2D de las interacciones en el sitio de unión aSyn y el JM-20 fue generado por el servidor en línea *Poseview.* [24] Para los estudios de simulación de la dinámica molecular se siguió la metodología descrita por Santos *et al*. (2022). [15]

Estudios *in vivo*

Para la evaluación del efecto del JM-20 en el modelo de parkinsonismo inducido por 6-hidroxidopamina, con el fin de proceder a la denervación dopaminérgica unilateral de la substantia nigra pars compacta (SNpc) (hemisferio derecho), las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.)., (Merck Darmstadt, Alemania) y se colocaron en un marco diseñado para cirugía estereotáctica (Stoelting Instruments, EE.UU.). La SNpc se lesionó por inyección de una solución de salina estéril 0,9 % (DELMED, BIOGALENIC, El Salvador) y 8μg/3μL de 6-OHDA según el protocolo descrito por Fonseca Fonseca et al. (2021). [22]

En la evaluación del efecto del JM-20 en el modelo de parkinsonismo inducido por rotenona con el fin de proceder a la denervación dopaminérgica bilateral las ratas fueron inyectadas intraperitoneal con rotenona (2,5 mg/kg) suspendida en aceite de girasol o el vehículo, con una frecuencia diaria, en el horario de la mañana, y se extendió por 25 días consecutivos, según el protocolo descrito por Fonseca Fonseca *et al.* (2019). [23] Los sujetos experimentales, después de una semana de tratamiento, se asignaron de manera aleatoria a 4 grupos experimentales y comenzaron además a recibir JM-20 (40 mg/kg, i.g.) y vehículo (según el grupo experimental).

En la evaluación conductual para determinar el daño motor asociado a la degeneración nigroestriatal inducida por las neurotoxinas 6-OHDA y rotenona, se utilizaron la prueba de campo abierto, la prueba del cilindro o la prueba de exploración vertical según el protocolo descrito por Fonseca Fonseca *et al*., 2019 y 2021. [22,23] En todas las pruebas conductuales realizadas los animales fueron habituados al cuarto donde se iba a realizar la evaluación conductual, por un período de 45 min, antes de comenzar las pruebas. Todos los dispositivos conductuales fueron limpiados con una solución etanol al 70 %, antes de evaluar a cada animal. Los estudios conductuales se realizaron entre las 08:30 h y las 14:00 h; bajo condiciones de poca iluminación, bajos niveles de ruido y temperatura controlada.

En estudios inmunohistoquímicos, de parámetros redox y estrés oxidativo la metodología para la realización de estos estudios se ejecutó según protocolos descritos por Fonseca Fonseca *et al.*, 2019 y 2021. [22,23] Los marcadores oxidativos estudiados fueron la actividad de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), grupos tioles totales (T-SH) y malonildialdehído (MDA), mientras que los marcadores inmunohistoquímicos células positivas a la tirosina hidroxilasa (TH+) y las células positivas a la proteína acida fibrilar glial (GFAP+).

Análisis estadístico

Con vistas a conocer de manera general el comportamiento de los grupos en las diferentes evaluaciones se realizó estadística descriptiva y se procesó toda la información recogida mediante el paquete GraphPadPrism Versión 8.0.2 (263) 2019. En todos los casos se verificó la distribución normal y la homogeneidad de varianza por la prueba de Shapiro-Wilks. Los datos cumplieron con las premisas de distribución normal por lo que se utilizaron pruebas paramétricas. Los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de medida (EEM) y en los ensayos de viabilidad celular, los resultados se expresan como la media ± EEM ó ± desviación estándar (DE) del porcentaje de viabilidad respecto al control de células no tratadas. En el caso de los estudios de correlación los resultados fueron expresados como valores individuales.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, del inglés Analysis of variance) bifactorial seguido de una prueba de Tukey en: a) en los estudios de evaluación del efecto, en el tiempo, del JM-20 sobre la citotoxicidad inducida por 6-OHDA; b) la estandarización de la prueba de cilindro; c) en la evaluación del JM-20 en el modelo de 6-OHDA de largo plazo y d) en el comportamiento de la variable peso en los experimentos con rotenona. En todos los casos los factores que se tuvieron en cuenta fue-

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

ron: grupos de tratamiento y tiempo. Para determinar el efecto de la administración prolongada de JM-20 en sujetos controles se utilizó la prueba t de Student para comparar las medias entre grupos. El porcentaje de supervivencia durante los 26 días que duraron los experimentos con rotenona fue analizado mediante una curva de Kaplan-Meier y luego una prueba de log-rank (Mantel-Cox). La relación entre variables morfológicas y moleculares con la conducta motora de ratas parkinsonizadas y su significación estadística, se determinó mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y la prueba de significación de dicho coeficiente, respectivamente; para $p < 0,05$. En todos los demás análisis estadísticos se realizó un ANOVA de clasificación simple seguido por la prueba de Tukey. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efecto del JM-20 sobre la formación de fibras no tóxicas de α-sinucleína

Para comprobar la actividad de JM-20 sobre la agregación amiloide de α-sinucleína, primero se evaluó la formación de agregados a las 24 h, 48 h y 72 h de incubación. La incubación de α-sinucleína con JM-20 en proporciones de 1:1 y 1:10 (α-sinucleína/JM-20) fue capaz de reducir la agregación de dicha proteína. El efecto inhibidor fue evidente antes de las 24 h, y el mayor efecto inhibitorio a las 72 h. Estudios de microscopía electrónica de transmisión demostraron que el JM-20 inducía la formación de fibrillas amiloides heterogéneas. Las fibrillas formadas en presencia de JM-20 no fueron tóxicas para los cultivos primarios mesencefálicos.

Efecto del JM-20 en modelos *in vitro* asociados a la enfermedad de Parkinson

Se muestra el efecto del JM-20 para inhibir la muerte celular y la disfunción mitocondrial in vitro asociada a diferentes daños neurotóxicos estrechamente relacionados con la EP. El JM-20 a concentraciones de 1 μM y 10 μM fue capaz de inhibir la citotoxicidad inducida por la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a partir de las 4 h ($p < 0,05$) de cotratamiento y hasta las 24 h ($p < 0,0001$) en comparación con el control tratado con 6-OHDA. ([22]) De manera similar concentraciones similares 0,01 μM; 0,1 μM; 1 μM y 10 μM de JM-20 disminuyen significativamente la muerte celular inducida por la rotenona y aminocoromo tras 24 h de cotratamiento ($p < 0,01$).

Por otro lado, células H4 transfectadas con plásmidos que codifican para α-sinucleína y sinfilina-1, 2 importantes componentes de los cuerpos de Lewy fueron tratadas con JM-20 durante 24 h. El tratamiento con JM-20 redujo las inclusiones α-sinucleína/sinfilina y el tamaño medio de las mismas. Los estudios en mitocondrias cerebrales de ratas demostraron que el JM-20 también que evitó la disfunción mitocondrial, al disminuir el hinchamiento, la producción de especies reactivas de oxígeno y la disipación del potencial de membrana mitocondrial.

Estudios *in silico*. Efecto del JM-20 sobre la formación de fibras amilodogénicas de α-sinucleína

Los estudios de modelación molecular demostraron que el JM-20 es capaz de interactuar con la α-sinucleína. Los mayores valores de afinidad (-6,7 kcal/mol) se observaron hacia la región N-terminal de la proteína. La superficie de contacto entre la α-sinucleína y el JM-20 reveló interacciones con residuos apolares como Leu38; Val40 y Val52; Glu35; Lys43; Tyr39 y Lys34.

Efecto del JM-20 en el modelo *in vivo*

Los modelos in vivo de la enfermedad de Parkison inducidos por 6-hidroxidopamina mostraron conducta motora que, al ser evaluada a través de la prueba del cilindro y la prueba de exploración vertical, una semana después de la cirugía. Los sujetos con lesión de la vía nigroestriatal por 6-OHDA presentaban altos porcentajes de asimetría ($p < 0,0001$) y una disminución significativa de la frecuencia de exploración vertical ($p < 0,0001$) en comparación con el grupo control (vehículo). La administración de JM-20 mejoró, tanto la asimetría motora como la conducta exploratoria, de manera dosis dependiente (20 mg/kg y 40 mg/kg). En otro paradigma experimental se demostró la capacidad neuroprotectora del JM-20 para evitar la progresión del daño en animales que presentaban una lesión severa de la vía nigroestriatal dopaminérgica *per se*, antes del comienzo de la administración del JM-20.

El tratamiento con JM-20 (40 mg/kg) de sujetos tratados con rotenona logró revertir las discapacidades motoras inducidas por esta neurotoxina. Los animales del grupo rotenona/JM-20 presentaron una frecuencia significativamente mayor tanto de exploraciones verticales ($p < 0,001$) como de exploraciones horizontales ($p < 0,05$), respecto al grupo rotenona y similar a los grupos controles. De manera similar al resultado anterior, el JM-20 evita la disfunción motora asociado a la administración de la rotenona.

El efecto del JM-20 sobre el número de células dopaminérgicas y la presencia de astrocitos se comprobó al evaluar tejido mesencefálico nigral y la coexpresión del marcador de neuroinflamación asociado a la activación astrocitaria (GFAP+) y el marcador de neuronas dopaminérgicas (TH+). Posterior a la inyección de 6-OHDA, se hace evidente una marcada disminución de las neuronas dopaminérgicas (TH+) y un aumento de la presencia de células astrocitarias (GFAP+). Dosis de 20 mg/kg

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

y 40 mg/kg de JM-20, fueron capaces de evitar la degeneración dopaminérgica inducida por la 6-OHDA ($p < 0,01$), evidenciada por una mayor cantidad de células TH+ y un menor número de células GFAP+ en la substantia nigra pars compacta (SNpc) ipsilateral de las ratas lesionadas con 6-OHDA ($p < 0,01$)

La figura 2 muestra el efecto del JM-20, evitando la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, el daño motor, la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la astrogliosis inducido por las neurotoxinas, 6-hidroxidopamina y rotenona. Por otro lado, se demostró que el compuesto tiene la capacidad de evitar la formación de oligómeros tóxicos de α-sinucleína, con un posible efecto anti-amiloidogénico.

Efecto la administración sistémica con JM-20 sobre parámetros oxidativos cerebrales en ratas parkinsonianas

La administración de JM-20 en dosis dependiente modificó, de manera dosis dependiente, los parámetros oxidativos cerebrales evaluados, en animales previamente dañados con 6-OHDA. La mayor dosis empleada de JM-20, 40 mg/kg, aumentó significativamente la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en la SNpc ($p < 0,05$ y $p < 0,001$; respectivamente). Mientras que, en el estriado (ST), sólo la actividad de la CAT se modificó de manera significativa ($p < 0,05$). Por otra parte, esta dosis de JM-20 induce, en ambas estructuras a una disminución en la concentración de malonildialdehído (MDA) (SNpc, $p < 0,01$; ST, $p < 0,001$) y un aumento de la concentración de grupos tioles totales (T-SH) (SNpc/ST, $p < 0,01$). De manera similar la administración con JM-20 (40 mg/kg) en animales dañados con rotenona, logró disminuir los niveles de MDA y aumentar significativamente la actividad de las enzimas antioxidantes SOD ($p < 0,01$) y CAT ($p < 0,01$) y la concentración de T-SH ($p < 0,05$) a valores semejantes a los del grupo control vehículo, tanto en la SNpc ($p < 0,01$) como en el ST ($p < 0,001$). [23]

Estudios de correlación entre variables conductuales, morfológicas y bioquímicas

En el modelo de 6-OHDA los resultados mostraron que una mayor asimetría evaluada en la prueba del cilindro se correla-

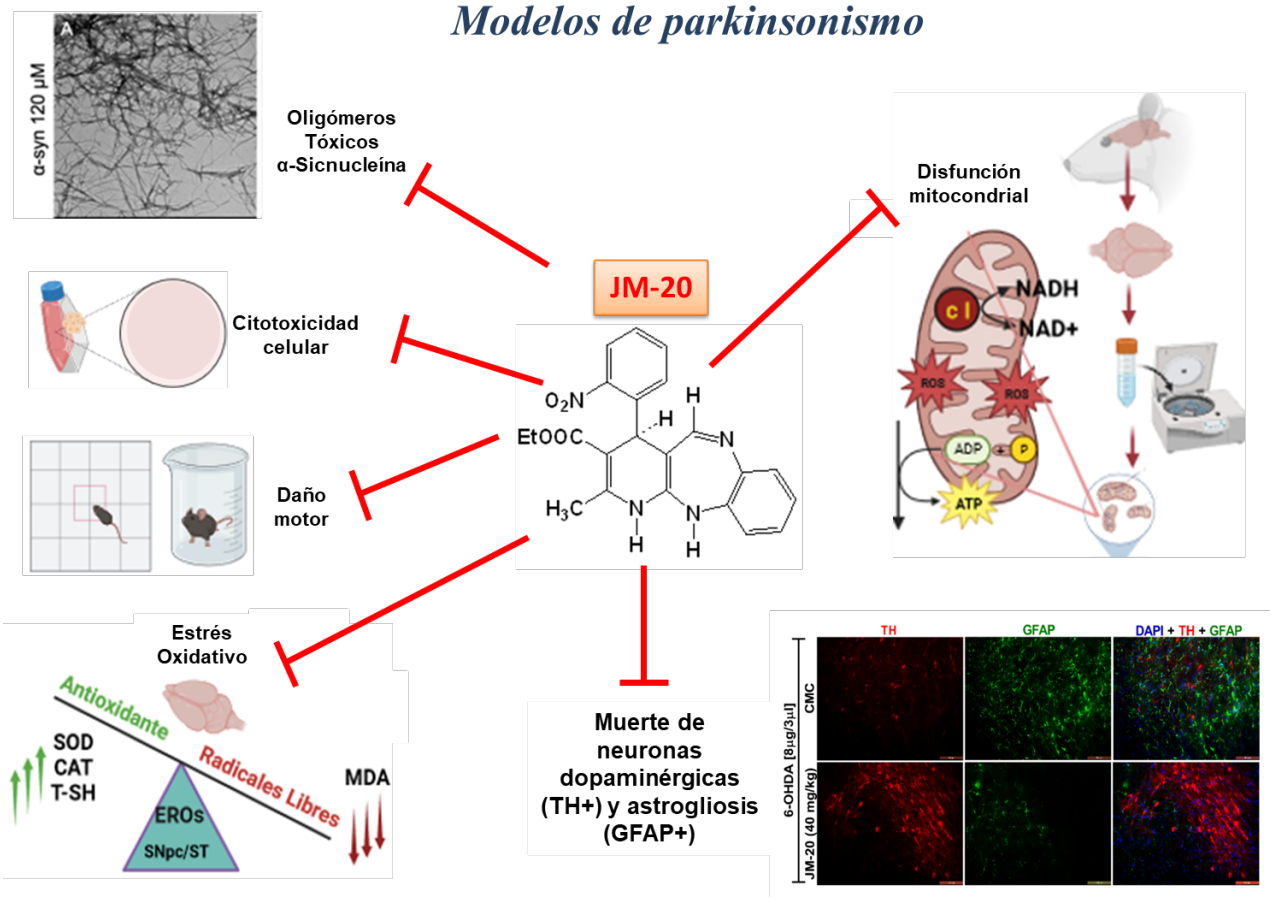


Fig 2. Representación esquemática del efecto multiblanco del JM-20 en modelos de la EP

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

cionaba con mayores alteraciones redox, muerte de neuronas dopaminérgicas y aumento de la astrogliosis a nivel de la SNpc. En el modelo de rotenona se demostró que un menor número de exploraciones verticales se correlacionaba con mayores alteraciones redox y mayor disfunción mitocondrial. En ambos modelos (6-OHDA y rotenona), los animales parkinsonianos tratados con JM-20 (20 y 40) mg/kg mostraron menores alteraciones conductuales (menor valor de asimetría y mayor número de alteraciones mitocondriales), menor pérdida de neuronas TH+, menor cantidad de células astrocitarias GFAP+, menos alteraciones redox y menos disfunción mitocondrial.

DISCUSIÓN

El fracaso en la terapia antiparkinsoniana actual en intentar detener o disminuir la lenta y progresiva muerte de las neuronas dopaminérgicas de las SNpc, ha llevado a muchos grupos de investigación a replantearse sus objetivos científicos en la búsqueda de terapias para el tratamiento de la EP. Sin embargo, la realidad actual es que no se ha desarrollado ningún candidato multiblanco o combinación, que consiga detener o revertir de manera definitiva el curso neurodegenerativo de la EP. [25,26,27]

En la búsqueda de nuevos agentes con actividad neuroprotectora para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, el laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química de la UH en colaboración con el laboratorio de Neurofarmacología Molecular del CIDEM, ha desarrollado numerosos estudios de síntesis, caracterización y modelación molecular de compuestos heterocíclicos derivados de dihidropiridinas y benzodiacepinas. De esta forma, se obtuvo el JM20, a través de la combinación de más de un farmacóforo neuroprotector (5-benzodiacepina químicamente fusionada a una 1,4-dihidropiridina) en una única estructura mediante procedimientos descritos en el documento de patente (CU patente 20090172). [8]

Las características estructurales de la fracción dihidropiridínica y de la fracción benzodiacepínica, podrían brindarle a la molécula la posibilidad de inhibir varios eventos asociados al daño neuronal (al menos teóricamente), al combinar en un mismo compuesto, las potencialidades farmacológicas de cada farmacóforo por separado. Además, el JM-20 presenta en su estructura una carga positiva en uno de los grupos imino de la fracción benzodiacepínica y posee un coeficiente de reparto teórico igual a 3,42; que lo clasifica como una molécula lipofílica. Estas 2 características le confieren la capacidad de atravesar las membranas biológicas y especialmente la membrana mitocondrial, a través de un gradiente electrostático que convierte a la mitocondria en una potencial diana farmacológica para el tratamiento con JM-20 de enfermedades neurodegenerativas que cursan con algún tipo de disfunción mitocondrial como es el caso de la EP. [8]

Inicialmente se planteó la hipótesis de que el JM-20 podría ser un fármaco neuroprotector apropiado en modelos experimentales relacionados con la isquemia cerebral. Por lo cual, diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* se desarrollaron y varios mecanismos multiblancos se demostraron. [11,12,13,10,28] Además de los efectos neuroprotectores descritos en modelos de isquemia cerebral, se demostró su capacidad protectora en modelos de demencia, traumatismo craneoencefálico y déficit cognitivo. [18,16,17]

Dentro de algunos de los mecanismos, previamente reportados, se demostró el efecto protector de la integridad mitocondrial a través de la inhibición de la acumulación no fisiológica de calcio dentro de este organelo, y consecuentemente se observó la preservación de los niveles de ATP. Disminución de la liberación de H_2O_2 como un marcador de actividad antioxidante con un origen mitocondrial, y la inhibición de la liberación de citocromo c, un importante marcador de inicio del proceso de muerte celular apoptótica. [11,12] Además, se demostró que el JM-20 disminuye la liberación de aminoácidos excitatorios estimulada por procesos sobreexcitatorios agudos, y a su vez, protege de la excitotoxicidad mediada por glutamato. A través de mecanismos que implican la inhibición de la liberación de este neurotransmisor y su recaptación por parte de los astrocitos. [9,11,12] Además, se verificaron propiedades antiinflamatorias frente al daño isquémico y el traumatismo craneoencefálico, mediada por la disminución de la microglías activadas y astrogliosis, disminución de la liberación de citocinas proinflamatorias y aumento de las antiinflamatorias. [18,13]

En el presente trabajo, utilizando mediciones de dispersión de luz, microscopía electrónica y ensayo de viabilidad celular en un cultivo primario de células mesencefálicos, se demostró que el JM-20 interfiere con la agregación de la α-sinucleína. Esta interferencia no es capaz de inducir una inhibición total de la formación de agregados de dicha proteína, pero los agregados obtenidos fueron especies no tóxicas con patrones morfológicos distintos. La remodelación de las fibrillas amiloides maduras en agregados no tóxicos es un mecanismo de neuroprotección, que ha sido investigado en la comunidad científica para posibles terapias de enfermedades neurodegenerativas. [29]

Nuestra hipótesis de que la α-sinucleína pudiera ser una diana molecular del JM-20 se vio reforzada cuando se investigó el efecto de este compuesto sobre las inclusiones en células transfectadas con plásmidos que codifican para α-sinucleína y sinfilina-1. Está reportado que la sinfilina-1 junto con la α-sinucleína, promueven la inhibición de la actividad del proteasoma y la formación de inclusiones como los cuerpos

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

de Lewy, *in vitro* e *in vivo*. [30] Lo cual además fue apoyado, luego de realizar estudios de dinámica y simulación molecular, donde se demostró la capacidad del JM-20 para interactuar con la α-sinucleína e inducir un patrón de agregación de las fibras no citotóxicos.

En correspondencia con este importante hallazgo, Gupta y col., demostraron que varias moléculas, con la capacidad de inhibir la formación de agregados de α-sinucleína, presentaban patrones de afinidad similares a los del JM-20. [31]

Los resultados muestran que el JM-20 protege a las mitocondrias del daño inducido por la 6-OHDA y la rotenona. Núñez y cols. reportaron efectos mitoprotectores del JM-20 en mitocondrias, obtenidas a partir de cerebro de rata sanas, expuestas a diferentes noxas. En ese estudio el compuesto ejerció una protección similar a la inducida por la ciclosporina A, un inhibidor clásico de la formación de poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). [10]

A diferencia de los antioxidantes clásicos, cuyos mecanismos de acción se asocian con su capacidad de secuestrar radicales libres o reaccionar, directamente, con el radical anión superóxido o con el H_2O_2; el efecto antioxidante del JM-20 se ha relacionado con un mecanismo diferente. Núñez y cols. demostraron que el JM-20 presenta un potencial de reducción catódico (de -0,72 V) muy similar al del oxígeno. Esto lo convierte en un excelente aceptor de electrones, capaz de prevenir la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. Esta característica electroquímica le confiere al JM-20 la capacidad de captar electrones de la CTe o incluso de competir con el oxígeno por los electrones liberados por las mitocondrias, lo que se traduce en una mayor eficacia antioxidante. [10,11]

Diaz Araya y cols. reportaron que la presencia del grupo nitro en una molécula contribuye con su función antioxidante, en relación con la capacidad de inhibir directamente la peroxidación lipídica. [32] La molécula JM-20 posee un grupo nitro en su porción 1,4-dihidropiridínica, el cual pudiera contribuir, al menos en parte, con su acción antioxidante. Se ha documentado una importante capacidad de reducción de radicales alquilperóxidos por moléculas con 1,4-dihidropiridinas, asociado a la transferencia de electrones. [33]

Varios autores reportan en la literatura científica que tanto la 6-OHDA como la rotenona son capaces de producir un estado de transición en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, relacionado a la apertura de mPTP. [34,35] La formación de estos poros provoca la despolarización de la membrana mitocondrial y pérdida del ΔΨm en reposo. La membrana mitocondrial despolarizada favorece el flujo de calcio desde la mitocondria hacia el citoplasma y la liberación de proteínas proapoptóticas desde la matriz mitocondrial (citocromo c, SMAC/DIABLO). Finalmente, se produce hinchamiento mitocondrial (por flujo masivo de agua al interior de la mitocondria), pérdida de la fosforilación oxidativa e inhibición de los complejos mitocondriales I y IV. [36,37,38] Estos mecanismos se asocian con el efecto mitotóxico de ambas toxinas. [37]

Todas estas características le confieren la capacidad de evitar el daño inducido por neurotoxinas que inducen alteraciones bioquímicas, conductuales e histológicas, asociadas a la muerte dopaminérgica. Razón de su relevancia farmacológicas como un candidato prometedor para el tratamiento de la EP.

Conclusiones

En el presente trabajo se demostró el efecto protector del JM-20 sobre diferentes daños neurotóxicos responsables de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, tanto en modelos *in silico*, *in vitro*, como *in vivo* de la EP. Se reportó por primera vez la propiedad del JM-20 para interactuar a nivel molecular con varios aminoácidos de la proteína α-sinucleína mediante técnicas de dinámica y modelación. Observando, que la incubación entre el JM-20 y dicha proteína da lugar a la formación de fibras amilodoigénicas no tóxicas de α-sinucleína, al evaluarlas en cultivos primarios de neuronas mesencefálicas. Además, del efecto del JM-20 para reducir la cantidad y el tamaño de inclusiones citoplasmáticas de α-sinucleína/sinfilina, proteínas claves en la formación de los cuerpos de Lewy, agregados patológicos presentes en pacientes con la EP.

En los estudios *in vivo* se demostró el efecto neuroprotector del JM-20 frente a diferentes alteraciones mitocondriales, neuroquímicas, conductuales e inmunohistoquímicas en los modelos de EP inducidos por las neurotoxinas 6-OHDA y rotenona. El efecto antioxidante, antinflamatorio, antiamiloidogénico y protector de la funcionalidad mitocondrial del JM-20, la demostración en modelos *in vitro* e *in vivo* de la EP, pudieran explicar en parte, los resultados neuroprotectores obtenidos. Estos resultados señalan una vez más la característica de multiligando o multiblanco del JM-20 y avalan la realización de ensayos clínicos en pacientes portadores de dicha enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zaman V, Shields DC, Shams R, Drasites KP, Matzelle D, Haque A, ***et al***. Cellular and molecular pathophysiology in the progression of Parkinson's disease. Metab Brain Dis. 2021;36(5):815-27. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s11011-021-00689-5
2. Morris HR, Spillantini MG, Sue CM, Williams-Gray CH. The pathogenesis of Parkinson's disease. Lancet. 2024;403(10423):293-304. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38245249
3. Hoglinger G, German Parkinson's Guidelines C, Trenkwalder C. Diagnosis and treatment of Parkinson s disease (guideline of the German Society for Neurology). Neurological Research and Practice. 2024;6(1):30. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38845028

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

4. García-Beltrán O, Urrutia PJ, Núñez MT. On the Chemical and Biological Characteristics of Multifunctional Compounds for the Treatment of Parkinson Disease. Antioxidants (Basel). 2023;12(2):214. Disponible en: https://www.mdpi.com/2076-3921/12/2/214
5. Cheong SL, Federico S, Spalluto G, Klotz KN, Pastorin G. The current status of pharmacotherapy for the treatment of Parkinson's disease: transition from single-target to multitarget therapy. Drug Discovery Today. 2019;24(9):1769-83. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31102728
6. Banjare P, Wamanrao Matore B, Murmu A, Kumar V, Singh J, Roy PP. In silico Strategy: A Promising Implement in the Development of Multitarget Drugs against Neurodegenerative Diseases. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2023;23(29):2765-91. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37723952
7. Sanghai N, Vuong B, Burak Berk A, Afridi MSK, Tranmer GK. Current Small Molecule-Based Medicinal Chemistry Approaches for Neurodegeneration Therapeutics. ChemMedChem 2024;19(9):e202300705. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38329887
8. Nunez-Figueredo Y, Rodriguez EO, Reyes YV, Dominguez CC, Parra AL, Sanchez JR, ***et al***. Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20: a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule. Neurol Res. 2013;35(8):804-12. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651620
9. Nunez-Figueredo Y, Pardo Andreu GL, Oliveira Loureiro S, Ganzella M, Ramirez-Sanchez J, Ochoa-Rodriguez E, ***et al***. The effects of JM-20 on the glutamatergic system in synaptic vesicles, synaptosomes and neural cells cultured from rat brain. Neurochem Int. 2015;81:41-7. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25617730
10. Nunez-Figueredo Y, Pardo-Andreu GL, Ramirez-Sanchez J, Delgado-Hernandez R, Ochoa-Rodriguez E, Verdecia-Reyes Y, ***et al***. Antioxidant effects of JM-20 on rat brain mitochondria and synaptosomes: mitoprotection against Ca(2)(+)-induced mitochondrial impairment. Brain Res Bull. 2014;109:68-76 Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25305343
11. Nunez-Figueredo Y, Ramirez-Sanchez J, Hansel G, Simoes Pires EN, Merino N, Valdes O, ***et al***. A novel multi-target ligand (JM-20) protects mitochondrial integrity, inhibits brain excitatory amino acid release and reduces cerebral ischemia injury in vitro and in vivo. Neuropharmacology. 2014;85:517-27. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953828
12. Nunez-Figueredo Y, Ramirez-Sanchez J, Delgado-Hernandez R, Porto-Verdecia M, Ochoa-Rodriguez E, Verdecia-Reyes Y, ***et al***. JM-20, a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule, protects mitochondria and prevents ischemic insult-mediated neural cell death in vitro. Eur J Pharmacol. 2014;726:57-65. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24462350
13. Ramirez-Sanchez J, Simoes Pires EN, Nunez-Figueredo Y, Pardo-Andreu GL, Fonseca-Fonseca LA, Ruiz-Reyes A, ***et al***. Neuroprotection by JM-20 against oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices: Involvement of the Akt/GSK-3beta pathway. Neurochem Int. 2015;90:215-23. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26361722
14. Ramírez-Sánchez J, Pires ENS, Meneghetti A, Hansel G, Nuñez-Figueredo Y, Pardo-Andreu GL, ***et al***. JM-20 Treatment After MCAO Reduced Astrocyte Reactivity and Neuronal Death on Peri-infarct Regions of the Rat Brain. Mol Neurobiol. 2019;56(1):502-12. DOI: 10.1007/s12035-018-1087-8.
15. Santos CC, Cardim-Pires TR, Shvachiy L, Fonseca-Fonseca LA, Munoz P, Almeida A, ***et al***. JM-20, a Benzodiazepine-Dihydropyridine Hybrid Molecule, Inhibits the Formation of Alpha-Synuclein-Aggregated Species. Neurotox Res. 2022;40(6):2135-47 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35997936
16. Wong-Guerra M, Jimenez-Martin J, Fonseca-Fonseca LA, Ramirez-Sanchez J, Montano-Peguero Y, Rocha JB, ***et al***. JM-20 protects memory acquisition and consolidation on scopolamine model of cognitive impairment. Neurol Res. 2019;41(5):385-98 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30821663
17. Wong-Guerra M, Montano-Peguero Y, Ramirez-Sanchez J, Jimenez-Martin J, Fonseca-Fonseca LA, Hernandez-Ensenat D, ***et al***. JM-20 treatment prevents neuronal damage and memory impairment induced by aluminum chloride in rats. Neurotoxicology. 2021;87:70-85. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34481871
18. Furtado ABV, Gonçalves DF, Hartmann DD, Courtes AA, Cassol G, Nunez-Figueredo Y, ***et al***. JM-20 Treatment After Mild Traumatic Brain Injury Reduces Glial Cell Pro-inflammatory Signaling and Behavioral and Cognitive Deficits by Increasing Neurotrophin Expression. Molecular Neurobiology. 2021;58(9):4615-27. DOI: 10.1007/s12035-021-02436-4.
19. Coelho-Cerqueira E, Carmo-Goncalves P, Pinheiro AS, Cortines J, Follmer C. alpha-Synuclein as an intrinsically disordered monomer--fact or artefact? FEBS J. 2013;280(19):4915-27 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23927048
20. Palhano FL, Leme LP, Busnardo RG, Foguel D. Trapping the monomer of a non-amyloidogenic variant of transthyretin: exploring its possible use as a therapeutic strategy against transthyretin amyloidogenic diseases. J Biol Chem. 2009;284(3):1443-53. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18984591
21. Santos CC, Araujo FM, Ferreira RS, Silva VB, Silva JHC, Grangeiro MS, ***et al***. Aminochrome induces microglia and astrocyte activation. Toxicol In Vitro. 2017;42:54-60 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28392416
22. Fonseca-Fonseca LA, da Silva VDA, Wong-Guerra M, Ramirez-Sanchez J, Yaquis ASP, Ochoa-Rodriguez E, ***et al***. JM-20 protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in models of Parkinson's disease: Mitochondrial protection and antioxidant properties. Neurotoxicology. 2021;82:89-98. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33232743
23. Fonseca-Fonseca LA, Wong-Guerra M, Ramirez-Sanchez J, Montano-Peguero Y, Padron Yaquis AS, Rodriguez AM, ***et al***. JM-20, a novel hybrid molecule, protects against rotenone-induced neurotoxicity in experimental model of Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2019;690:29-35 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30304707
24. Fahrrolfes R, Bietz S, Flachsenberg F, Meyder A, Nittinger E, Otto T, ***et al***. ProteinsPlus: a web portal for structure analysis of macromolecules. Nucleic Acids Res. 2017;45(W1):W337-W43 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472372
25. Anastassova N, Aluani D, Hristova-Avakumova N, Tzankova V, Kondeva-Burdina M, Rangelov M, ***et al***. Study on the Neuroprotective, Radical-Scavenging and MAO-B Inhibiting Properties of New Benzimidazole Arylhydrazones as Potential Multi-Target Drugs

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

for the Treatment of Parkinson's Disease. Antioxidants (Basel). 2022;11(5):884. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35624746
26. Makhoba XH, Viegas CJr, Mosa RA, Viegas FPD, Pooe OJ. Potential Impact of the Multi-Target Drug Approach in the Treatment of Some Complex Diseases. Drug design, development and therapy. 2020;14:3235-49. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32884235
27. Calabresi P, Di Filippo M. Multitarget disease-modifying therapy in Parkinson's disease? The Lancet Neurology. 2015;14(10):975-6. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26376965
28. Nunez-Figueredo Y, Ramírez-Sanchez J, Hansel G, Pardo-Andreu GL, Merino N, Aparicio G, ***et al***. Therapeutic potential of the novel hybrid molecule JM-20 against focal cortical ischemia in rats. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research. 2016;4(4):153-8. Disponible en: https://doi.org/10.56499/jppres16.126_4.4.153
29. Fernandes L, Messias B, Pereira-Neves A, Azevedo EP, Araujo J, Foguel D, ***et al***. Green Tea Polyphenol Microparticles Based on the Oxidative Coupling of EGCG Inhibit Amyloid Aggregation/Cytotoxicity and Serve as a Platform for Drug Delivery. ACS Biomater Sci Eng. 2020;6(8):4414-23. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33455167
30. Liani E, Eyal A, Avraham E, Shemer R, Szargel R, Berg D, ***et al***. Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy bodies imply a role in Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(15):5500-5. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064394
31. Gupta E, Gupta S, Kumar A, Kulshrestha A, Niraj R, Niraj K. Molecular Docking Study to Identify Potent Inhibitors of Alpha- synuclein Aggregation of Parkinson's Disease. International Journal of Contemporary Medical Research. 2019;6. DOI:10.21276/ijcmr.2019.6.11.25.
32. Diaz-Araya G, Godoy L, Naranjo L, Squella JA, Letelier ME, Nunez-Vergara LJ. Antioxidant effects of 1,4-dihydropyridine and nitroso aryl derivatives on the Fe+3/ascorbate-stimulated lipid peroxidation in rat brain slices. General Pharmacology. 1998;31(3):385-91. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9703206
33. Yanez C, Lopez-Alarcon C, Camargo C, Valenzuela V, Squella JA, Nunez-Vergara LJ. Structural effects on the reactivity 1,4-dihydropyridines with alkylperoxyl radicals and ABTS radical cation. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2004;12(9):2459-68 Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15080941
34. Babazadeh A, Vahed FM, Liu Q, Siddiqui SA, Kharazmi MS, Jafari SM. Natural Bioactive Molecules as Neuromedicines for the Treatment/Prevention of Neurodegenerative Diseases. ACS Omega. 2023;8(4):3667-83 Disponible en: https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06098
35. Ioghen OC, Ceafalan LC, Popescu BO. SH-SY5Y Cell Line ***In Vitro*** Models for Parkinson Disease Research Old Practice for New Trends. Journal of Integrative Neuroscience. 2023;22(1) Disponible en: https://www.imrpress.com/JIN/articles/10.31083/j.jin2201020
36. Khan T, Waseem R, Zehra Z, Aiman A, Bhardwaj P, Ansari J, ***et al***. Mitochondrial Dysfunction: Pathophysiology and Mitochondria-Targeted Drug Delivery Approaches. Pharmaceutics. 2022;14(12):2657. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36559149
37. Dai Y, Wang H, Lian A, Li J, Zhao G, Hu S, ***et al***. A comprehensive perspective of Huntington's disease and mitochondrial dysfunction. Mitochondrion. 2023;70:8-19. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724923000272
38. Glinka YY, Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. European journal of pharmacology. 1995;292(3-4):329-32. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796873

Recibido: 13/01/2026
Aprobado: 13/02/2026

Agradecimientos
A Laura Reina Taño Portuondo, Daniela Caridad Hernández Enseñat, Fillipe Mendes de Araújo, Rejane Conceiçao Santana, Ricardo Limonta Avalo, Ayadamis Martín Sosa, Maylin Wong Guerra y Cleonice Creusa Santos.

Conflictos de intereses
Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos, ni con la investigación presentada, ni con la institución que representa.

Contribuciones de los autores
- Conceptualización: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Yanier Núñez-Figueredo
- Curación de datos: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Yanier Núñez-Figueredo
- Análisis formal: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Adquisición de fondos: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Alejandro Saúl Padrón Yaquis, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Investigación: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Jeney Ramírez Sánchez, Tiago Fleming Outeiro, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Metodologías: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Jeney Ramírez Sánchez, Tiago Fleming Outeiro, Estael Ochoa Rodríguez, Yamila Verdecia Reyes, Abel Mondenlo Rodríguez, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Yanier Núñez-Figueredo
- Administración de proyecto: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Alejandro Saúl Padrón Yaquis, Tiago Fleming Outeiro, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Recursos: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Alejandro Saúl Padrón Yaquis, Tiago Fleming Outeiro, Yanier Núñez-Figueredo
- *Software:* Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Yanier Núñez-Figueredo
- Supervisión: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Alejandro Saúl Padrón Yaquis, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Validación: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Visualización: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo
- Redacción-borrador original: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Jeney Ramírez Sánchez, Alejandro Saúl Padrón Yaquis, Tiago Fleming Outeiro, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

- Redacción-revisión y edición: Luis Arturo Fonseca-Fonseca, Nancy Pavón Fuentes, Jeney Ramírez Sánchez, Alejandro Saúl Padrón Yaquis, Tiago Fleming Outeiro, Víctor Diogenes Amaral da Silva, Silvia Lima Costa, Yanier Núñez-Figueredo

Financiamientos

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto 178/12 2 de CAPES/MES (Brasil-Cuba) y de la Organización No Gubernamental MEDICUBA-España. Proyecto DFG, Gottingen/CIDEM. Proyecto FONCI.

Cómo citar este artículo

Fonseca-Fonseca LA, Pavón Fuentes N, Ramírez Sánchez J, Padrón Yaquis AS, Fleming Outeiro T, Ochoa Rodríguez E, ***et al***. Efecto neuroprotector de JM-20 en modelos preclínicos de la enfermedad de Parkinson. An Acad Cienc Cuba [Internet] 2025 [citado en día, mes y año];15(4):e3231. Disponible en: http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/3231

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).
© Los autores, 2025.

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0

Este artículo es distribuido en acceso abierto según los términos de la Licencia Creative Commons Atribución–NoComercial 4.0