

Evidencias farmacológicas preclínicas del efecto neuroprotector de una molécula híbrida (JM-20) para el tratamiento de la isquemia cerebral.

Unidades Ejecutoras Principales del Resultado:

- Laboratorio de Neuroprotección del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), La Habana, Cuba.
- Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos de La Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.
- Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Química de La Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

Autores principales (i): **DrC. Yanier Nuñez Figueredo**, Laboratorio de Neuroprotección del CIDEM; **DrC. Gilberto L. Pardo Andreu**, Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos de La Universidad de La Habana; **DrC. Estael Ochoa Rodríguez**, Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Química de La Universidad de La Habana; **DrC. Yamila Verdecia Reyes**, Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Química de La Universidad de La Habana; **MSc. Jeney Ramírez Sánchez**, Laboratorio de Neuroprotección del CIDEM; **DrC. René Delgado Hernández**, Laboratorio de Neuroprotección del CIDEM. **DrC Diogo O Souza**, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil.

Otros autores (ii): Instituciones Nacionales: **MSc. Laura García Pupo**, Laboratorio de Neuroprotección del CIDEM; **DrC. Nelson Merino**, Laboratorio de Histología, CIDEM; **DrC. Alberto Ruiz Reyes**, Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Química, Universidad de la Habana.

Institucionales Extranjeras: **DrC. Christianne Salbego**, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil; **DrC. Gisele Hansel**, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur.

Número de colaboradores (iii): 13

Resumen:

La isquemia cerebral constituye un grave problema de salud a nivel mundial; a pesar del conocimiento que se tiene sobre su fisiopatología, en la actualidad no se dispone de medicamentos efectivos para el tratamiento de esta enfermedad. Entre las principales causas del fracaso en la búsqueda de compuestos neuroprotectores se encuentra el empleo de medicamentos orientados a dianas específicas dentro de la compleja cascada isquémica. En este sentido, el JM-20 es una molécula que presenta características que le brinda la capacidad de inhibir varios estímulos citotóxicos responsables de la muerte neuronal isquémica. Los resultados que se muestran en este trabajo evidencian un fuerte efecto neuroprotector del JM-20 en modelos *in vitro* e *in vivo* relacionados con la isquemia cerebral. Este efecto estuvo relacionado con su capacidad para inhibir la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad mediada por glutamato (Glu); así como la inhibición de señales de apoptosis y potenciación de señales de supervivencia celular. Este resultado científico sienta las bases fundamentales para el ascenso a la fase clínica de investigación (humanos) en el desarrollo de esta molécula como neuroprotector frente a la isquemia cerebral. De ser exitosa esta fase de ensayos clínicos, como se espera por los importantes resultados preclínicos aportados por este trabajo, se contaría por primera vez en el mercado (la molécula y sus derivados están protegidos por patente 100% Cubana) con una molécula neuroprotectora y una terapia efectiva frente al daño cerebral isquémico, con las enormes ventajas sociales y económicas asociadas a su aplicación.

Este trabajo se encuentra respaldado por **7** publicaciones científicas en revistas internacionales de alto factor de impacto, **1** Patente concedida, **6** Publicaciones en Resúmenes de eventos, **10** Participaciones en Eventos, **14** Premios, **2** Tesis de Maestría (2011 y 2014) y **1** Tesis de Doctorado (2015) defendidas exitosamente.

I

2.2 Colaboradores

Colaboradores Instituciones Nacionales

1. MSc. Alicia Lagarto Parra, CIDEM
2. Lic. Odalys Valdes, CIDEM
3. Dr. Guillermo Aparicio, CIDEM
4. Lic. Pedro Barzaga Fernández, CIDEM
5. MSc. Susana Yanet Torres Nieto, Facultad de Química, UH
6. Ing. Abel Mondelo, Facultad de Química, UH

Colaboradores Instituciones Extranjeras

7. DrC. Silvia L. Costa: Laboratorio de Neuroquímica y Biología Celular, Departamento de Biofuncion / Bioquímica, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Salvador, BA, 40.110-100, Brasil
8. DrC. Samanta Oliveira Loureiro: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil
9. DrC. Elisa Nicoloso Simoes Pires: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil
10. DrC. Marcelo Ganzella: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil.
11. DrC. Alexandre Pastoris Muller: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil.
12. DrC. Zeki Naal: Departamento de Física and Química, Facultad de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ave. Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brasil.
13. DrC. Luis Valmor Portela: Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande del Sur, Brasil

2.3. Autor de correspondencia

DrC Yanier Nuñez Figueredo. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), BioCubaFarma, Ave. 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes, Nuevo Vedado, Plaza. Apdo. Postal 10600. La Habana, Cuba. Teléfono: +(537)-881-19-44 +(537)-881-08-30Fax: +(537)-335556 E-mail: yaniernf@infomed.sld.cu, yanier.nunez@cidem.sld.cu

DrC Gilberto L. Pardo Andreu. Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas, Instituto de Farmacia y Alimentos de La Universidad de La Habana. ave. 23 # 21425 e/214 y 222, La Coronela, La Lisa, CP 13600, Ciudad Habana, Cuba. Tel.: (53) 7 2718534; fax: (53) 7 2603894

E-mail: gilbertopardo@infomed.sld.cu, gpardo@ifal.uh.cu

DrC. Estael Ochoa Rodríguez, Laboratorio de Síntesis Orgánica. Facultad de Química de La Universidad de La Habana; Zapata s/n entre G y Carlitos Aguirre, Vedado Plaza de la Revolución, CP 10400, Ciudad de la Habana, Cuba

E-mail: estael@fq.uh.cu

3. COMUNICACIÓN CORTA

Entre las enfermedades del sistema nervioso central con mayor prevalencia en nuestro país, se encuentran las denominadas enfermedades cerebrovasculares (ECV). Las ECV son la tercera causa de muerte en el mundo y en Cuba (Buerger, Fernandez et al. 2008) donde particularmente afecta al 50 % de la población mayor de 60 años y su mortalidad se incrementa exponencialmente con la edad, duplicándose cada 5 años. Esta patología está acompañada de un alto costo social e individual por concepto de invalidez y afectación familiar, así como un elevado gasto de salud y por consiguiente una incidencia negativa en la economía de la familia y de la sociedad (Turley, Toledo-Pereyra et al. 2005; Fernandez-Gomez, Hernandez et al. 2008). Dentro de las ECV, el componente más importante lo constituye la enfermedad cerebrovascular isquémica; caracterizada fundamentalmente por una interrupción en el suministro de oxígeno y glucosa a las células y al tejido. A pesar del conocimiento que se tiene sobre la fisiopatología de la isquemia cerebral, en la actualidad no se dispone de medicamentos efectivos para el tratamiento de esta enfermedad. Entre las principales causas del fracaso en la búsqueda de compuestos neuroprotectores se encuentra el diseño de medicamentos orientados a dianas específicas dentro de la compleja cascada isquémica (Gladstone, Black et al. 2002). Es por eso que el diseño de fármacos capaces de inhibir simultáneamente varias señales de muerte neuronal, pueden ofrecer mayores posibilidades de éxito en la terapia anti-isquémica (Ginsberg 2008). En este contexto, el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana ha obtenido un interesante grupo de moléculas por medio de la fusión de fracciones dihidropiridínicas, con benzodiazepinas que tienen un amplio potencial terapéutico. El 3-etoxicarbonil-2-metil-4-(2-nitrofenil)-4,11-dihidro-1H-pirido[2,3-b][1,5]benzodiazepina, en lo adelante JM-20, es un miembro de esta novedosa familia. La existencia en esta estructura de dos farmacóforos con reconocidos mecanismos neuroprotectores en diferentes modelos de isquemia cerebral (Green, Hainsworth et al. 2000; Horn, de Haan et al. 2001; Aerden, Kessels et al. 2004; Takahara, Konda et al. 2004; Tomassoni, Lanari et al. 2008; Hu, Li et al. 2013), sugiere que el JM-20 puede mantener e incluso potenciar los efectos protectores cerebrales. La presencia de una carga positiva en uno de los grupos amino de la fracción benzodiazepínica y su elevada lipofiliidad dado por un elevado coeficiente de reparto (3.42-valor teórico), le ofrecen además propiedades ideales para atravesar las membranas mitocondriales favorecido por un gradiente electrostático (Murphy 1997; Hoye, Davoren et al. 2008; Murphy 2008; Toogood 2008). Por consiguiente, la mitocondria, orgánulo que puede definir la sobrevivencia neuronal (y del resto de los componentes de la unidad neurovascular) en la isquemia cerebral, también se convierte en una potencial diana farmacológica para el tratamiento con JM-20 (Toogood 2008; Du and Yan 2010). De esta forma, nuestro grupo se planteó como hipótesis de trabajo que las características estructurales del JM-20 permiten que esta molécula bloquee diferentes procesos involucrados en la cascada isquémica cerebral, por lo que puede actuar como neuroprotector en modelos experimentales de esta enfermedad. Se evaluó el efecto protector del JM-20 sobre la muerte celular inducida por diferentes estímulos citotóxicos relacionados con el daño

neuronal isquémico. En células PC12 el JM-20 mostró un fuerte efecto citoprotector frente al daño inducido por H₂O₂ (daño oxidativo), y Glu (daño excitotóxico), con valores de IC₅₀ (concentración capaz de inhibir en un 50 % la muerte celular) igual a 6.92 μM y 0.029 μM, respectivamente. En un modelo de hipoxia química inducida con KCN y privación de glucosa (modela las condiciones de isquemia cerebral), el JM-20 fue 7 veces más efectivo cuando se administró durante el período de anoxia y de reperfusión (IC₅₀ = 0.008 μM) que cuando se aplicó solo en la etapa de reperfusión (IC₅₀ = 0.056 μM). En cultivos primarios de gránulos cerebelares dañados con Glu, el JM-20 alcanzó su máximo efecto protector a una concentración 100 veces menor que el nifedipino y el diazepam (0.1 versus 10 μM) usados como referencias con un valor de IC₅₀ de 0.011 μM. Cuando el daño se produjo por la combinación de Glu y PTZ (bloqueador de receptores GABA y por tanto del potencial efecto protector del JM-20 mediado por sus efectos GABAérgicos) la respuesta máxima se obtuvo a una concentración aproximadamente 10 veces mayor de JM-20 (IC₅₀ = 0.098 μM), demostrando que su fracción benzodiazepínica contribuye a la respuesta citoprotectora de esta molécula. Resulta interesante que en este paradigma experimental, el nifedipino mostró una efectividad protectora similar al JM-20 (ambos tuvieron su máximo efecto protector a 1 μM). Este resultado sugiere además que el otro componente estructural (porción dihidropiridínica) podría contribuir también al efecto citoprotector observado, probablemente por modulación de los niveles de Ca²⁺. En cultivo organotípico de hipocampo sometido a una privación de glucosa y oxígeno (DGO) el JM-20 disminuyó también de forma significativa y concentración-dependiente la muerte neuronal. La DGO disminuye la fosforilación de la proteína serina/treonina quinasa denominada Akt, miembro de la familia de las fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). De esta forma (inactiva), Akt no puede fosforilar a otras proteínas como la glicógeno sintasa quinasa 3β (GSK-3β), particularmente abundante en el sistema nervioso central y capaz de inducir la activación de proteínas pro-apoptóticas como la caspasa 3 y el gen p53. El tratamiento con JM-20 previno la fosforilación de estas proteínas, y atenuó la activación de caspasa-3. También disminuyó la producción de citocinas pro-inflamatorias como las interleucina 1b (IL-1b), IL-6 y del factor de necrosis tumoral (TNF-α). Al mismo tiempo incrementó los niveles de la interleucina anti-inflamatoria IL-10, disminuyó la activación de la microglia e incrementó la respuesta astrocítica. Estos resultados sugieren que en los mecanismos de neuroprotección del JM-20 pueden estar incluidas la modulación de la astrogliosis reactiva, la neuroinflamación y las vías de señalización anti-apoptóticas. En mitocondrias aisladas a partir del hígado y cerebro de ratas, esta molécula se mostró como un potente antioxidante, bloqueador de la entrada mitocondrial de Ca²⁺, inhibidor de la actividad hidrolítica (reversa) de la F₁F₀ ATPasa y de la liberación del factor inductor de apoptosis citocromo c. Estas acciones contribuyeron a preservar la función mitocondrial y el estado energético neuronal en aquellas células expuestas a daños isquémicos, que a su vez contribuyó a la sobrevivencia neuronal. En vesículas sinápticas se demostró que el JM-20 inhibió la actividad de la ATPasa vesicular, que a su vez condujo a una disipación del gradiente de protones e inhibición de la captación vesicular de Glu. En correspondencia, también disminuyó la liberación de este neurotransmisor en sinaptosomas evocada con KCl. Otro mecanismo anti-

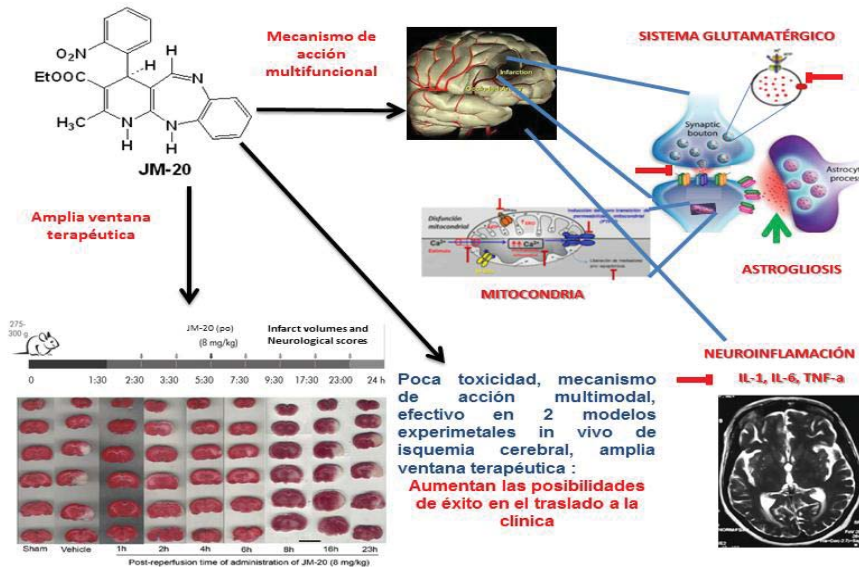
excitotóxico encontrado para el JM-20, estuvo relacionado con su capacidad de aumentar la recaptación de Glu en cultivos primarios de astrocitos y co-cultivo neuronas/astrocitos. En su conjunto, estos resultados apuntan a un posible efecto anti-excitotóxico del JM-20 al disminuir las cantidades de Glu en las hendiduras sinápticas/espacio extracelular por: i) menor acumulación vesicular del neurotransmisor, ii) aumento de su recaptación. La administración oral de JM-20 (4 y 8 mg/Kg) 1h después del comienzo de la isquemia (oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratas) disminuyó el área de la lesión, el volumen de infarto, el edema cerebral, y el deterioro neurológico en ratas expuestas a 90 min de oclusión de la arteria cerebral media (isquemia) y 24h de reperusión. Los animales tratados con la dosis de 8 mg/Kg presentaron menores niveles de Glu en líquido cefalorraquídeo similares al grupo sham, corroborando el efecto anti-excitotóxico vaticinado *in vitro*. También disminuyó las alteraciones histopatológicas del hipocampo, corteza y cuerpo estriado. Los resultados muestran además que los animales administrados con 8 mg/Kg de JM-20 hasta 8h después del inicio de la oclusión de la arteria cerebral media (ventana terapéutica), presentaron menor deterioro neurológico y área de infarto que los no tratados. Por otra parte, las mitocondrias aisladas de animales isquémicos y tratados con JM-20 (4 y 8 mg/Kg) presentaron menores niveles de Ca^{2+} intramitocondrial y una marcada preservación de su funcionalidad y morfología. La disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), la generación de especie reactiva de oxígeno (ERO) y la ocurrencia de la transición de permeabilidad mitocondrial por la acumulación de Ca^{2+} son eventos implicados en la muerte neuronal mediada por señales intrínsecas durante el daño isquémico cerebral. En este caso, la liberación del citocromo c mitocondrial al citoplasma asociado a la ocurrencia de estos eventos anteriores, es un potente estímulo fisiológico para la activación de las caspasas 9 y 3. Por tanto, la inhibición de su liberación puede ser un blanco importante para el efecto neuroprotector *in vivo* del JM-20 frente a la isquemia cerebral. En tal sentido, se observó que el JM-20 a 8 mg/Kg inhibió la liberación de esta proteína mitocondrial pro-apoptótica. En otro modelo de isquemia focal *in vivo*, en este caso, isquemia permanente inducida por termo-coagulación de la sangre en los vasos piales de la corteza primaria motora, el JM-20 a las dosis de 4 y 8 mg/Kg, administrado 1h después de la cirugía oclusiva y durante 6 días consecutivos, mejoró significativamente la asimetría de las patas delanteras de los animales isquémicos (prueba del cilindro), así como las alteraciones histopatológicas en corteza.

El siguiente esquema resume los principales mecanismos de acción descubiertos para esta molécula: Actúa a nivel del sistema glutamatérgico por medio de la inhibición de la captación vesicular del neurotransmisor y aumentando su recaptación astrocítica, lo que protege contra uno de los componentes más dañinos de la cascada isquémica: la excitotoxicidad. Protege a la mitocondria a diferentes niveles: inhibe la captación de Ca^{2+} por el organelo, lo que previene la ocurrencia de la transición de permeabilidad mitocondrial y la liberación al citoplasma de factores pro-apoptóticos como el citocromo c. Se demuestra que este efecto es solo a nivel mitocondrial y no a nivel de membranas neuronales. Inhibe la actividad hidrolítica de la F_1F_0 ATPasa, enzima mitocondrial encargada de sintetizar ATP, pero que en condiciones de hipoxia invierte su funcionamiento a

actividad hidrolítica, consumiendo alrededor del 90% del ATP celular disponible para reponer la pérdida del potencial. Adicionalmente, presenta un potente efecto antioxidante también a nivel mitocondrial. Este efecto multimodal a nivel mitocondrial permitiría proteger y preservar la función del orgánulo, mantener la homeostasia energética y evitar el inicio de señales de muerte celular provenientes de las mitocondrias. El JM-20 también es capaz de modular la astrogliosis y promover un entorno antiinflamatorio favorable para la sobrevivencia y recuperación neuronal. Presenta una amplia ventana terapéutica. De esta forma el JM-20 parece actuar en elementos claves de las diferentes etapas de la isquemia/reperfusión cerebral con importantes posibilidades de éxito en su traslado a la clínica.

En resumen, se reporta por primera vez en la literatura científica el efecto neuroprotector de una nueva molécula sintética en modelos in vitro e in vivo de daño cerebral por isquemia/reperfusión. Se demuestra por primera vez que una molécula híbrida con mecanismos de acción múltiples; GABAérgicos, anti-cálcicos, antiexcitotóxicos, mitoprotectores, antiapoptóticos y antiinflamatorios es altamente efectiva en el tratamiento de la isquemia cerebral. El principal aporte de este resultado radica en la caracterización contundente del efecto neuroprotector del JM-20 en diferentes modelos experimentales de isquemia cerebral, lo que ofrece una alternativa farmacológica novedosa para las enfermedades cerebrovasculares, que constituyen la tercera causa de muerte en Cuba, y carecen de terapias efectivas. La investigación permitió identificar, además, diversos mediadores de sus mecanismos de acción a distintos niveles de organización, desde el sub-celular (mitocondrias aisladas), líquido cefalorraquídeo, el tisular (cultivo organotípico de hipocampo) hasta el de organismo (ratas), con una visión integradora y holística, utilizando metodologías experimentales de punta, con un enfoque multidisciplinario y teniendo en cuenta la complejidad de esta patología. Desde el punto de vista metodológico, también realiza importantes aportes pues establece una metodología de trabajo para el estudio de moléculas activas a nivel mitocondrial. Al mismo tiempo propone una metodología racional para la cuantificación intra-mitocondrial de Ca^{2+} ex vivo, no reportada hasta el momento. Este resultado científico sienta las bases fundamentales para el ascenso a la fase clínica de investigación (humanos) en el desarrollo de esta molécula como neuroprotector frente a la isquemia cerebral. De ser exitosa esta fase de ensayos clínicos, como se espera por los importantes resultados preclínicos aportados por este trabajo, se contaría por primera vez en el mercado (la molécula y sus derivados están protegidos por patente 100% Cubana) con una molécula neuroprotectora y una terapia efectiva frente al daño cerebral isquémico, con las enormes ventajas sociales y económicas asociadas a su aplicación.

El JM-20 es un neuroprotector multifuncional con muchas posibilidades de éxito en su traslado a la clínica para el tratamiento de la isquemia cerebral



Referencias

1. Aerden, L. A., F. A. Kessels, et al. (2004). "Diazepam reduces brain lesion size in a photothrombotic model of focal ischemia in rats." *Neurosci Lett* 367(1): 76-78.
2. Buergo, M. A., O. Fernandez, et al. (2008). "Epidemiology of cerebrovascular diseases in cuba, 1970 to 2006." *MEDICC Rev* 10(2): 33-38.
3. Du, H. and S. S. Yan (2010). "Mitochondrial medicine for neurodegenerative diseases." *Int J Biochem Cell Biol* 42(5): 560-572.
4. Fernandez-Gomez, F. J., F. Hernandez, et al. (2008). "[Pharmacology of neuroprotection in acute ischemic stroke]." *Rev Neurol* 47(5): 253-260.
5. Ginsberg, M. D. (2008). "Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future." *Neuropharmacology* 55(3): 363-389.
6. Gladstone, D. J., S. E. Black, et al. (2002). "Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions." *Stroke* 33(8): 2123-2136.
7. Green, A. R., A. H. Hainsworth, et al. (2000). "GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischaemic stroke." *Neuropharmacology* 39(9): 1483-1494.
8. Horn, J., R. J. de Haan, et al. (2001). "Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review." *Stroke* 32(10): 2433-2438.
9. Hoye, A. T., J. E. Davoren, et al. (2008). "Targeting mitochondria." *Acc Chem Res* 41(1): 87-97.
10. Hu, H. H., S. J. Li, et al. (2013). "An L-type calcium channel agonist, bay K8644, extends the window of intervention against ischemic neuronal injury." *Mol Neurobiol* 47(1): 280-289.
11. Murphy, M. P. (1997). "Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria." *Trends Biotechnol* 15(8): 326-330.
12. Murphy, M. P. (2008). "Targeting lipophilic cations to mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8): 1028-1031.
13. Takahara, A., T. Konda, et al. (2004). "Neuroprotective effects of a dual L/N-type Ca(2+) channel blocker cilnidipine in the rat focal brain ischemia model." *Biol Pharm Bull* 27(9): 1388-1391.
14. Tomassoni, D., A. Lanari, et al. (2008). "Nimodipine and its use in cerebrovascular disease: evidence from recent preclinical and controlled clinical studies." *Clin Exp Hypertens* 30(8): 744-766.
15. Toogood, P. L. (2008). "Mitochondrial drugs." *Curr Opin Chem Biol* 12(4): 457-463.
16. Turley, K. R., L. H. Toledo-Pereyra, et al. (2005). "Molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke." *J Invest Surg* 18(4): 207-218.

Publicaciones de los autores que avalan los resultados del trabajo que se presenta (Total 13)

Publicaciones de artículos completos

1. Nuñez-Figueroado Y, Ramírez-Sánchez J, Hansel G, Pardo-Andreu GL, Merino N, Aparicio G, Delgado-Hernández R, García-Pupo L, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Souza DO. Therapeutic potential of treatment with the novel hybrid molecule JM-20 after cortical focal ischemia in rats. **Enviado a Neurological Science. Factor de Impacto: 1.447**
2. Ramírez-Sánchez J, Simões Pires EN, Nuñez-Figueroado Y, Pardo-Andreu GL, Fonseca-Fonseca LA, Ruiz-Reyes A, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Delgado-Hernández R, Souza DO, Salbego C. Neuroprotection by JM-20 against oxygen-glucose deprivation in rat hippocampal slices: Involvement of the Akt/GSK-3 β pathway. **Neurochem Int. 2015, DOI: 10.1016/j.neuint.2015.09.003. Factor de impacto: 3.092**
3. Nuñez-Figueroado Y, Pardo Andreu GL, Oliveira Loureiro S, Ganzella M, Ramírez-Sánchez J, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Delgado-Hernández R, Souza DO. 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. Factor de impacto: 3.092**
4. Nuñez-Figueroado Y, Pardo-Andreu GL, Ramírez-Sánchez J, Delgado-Hernández R, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Naal Z, Muller AP, Portela LV, Souza DO. Antioxidant effects of JM-20 on rat brain mitochondria and synaptosomes: mitoprotection against Ca²⁺-induced mitochondrial impairment. **Brain Res Bull. 2014;109:68-76. Factor de impacto: 2.718**
5. Nuñez-Figueroado Y, Ramírez-Sánchez J, Hansel G, Simões Pires EN, Merino N, Valdes O, Delgado-Hernández R, Parra AL, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Salbego C, Costa SL, Souza DO, Pardo-Andreu GL. 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. Factor de impacto: 5.106**
6. Nuñez-Figueroado Y, Ramírez-Sánchez J, Delgado-Hernández R, Porto-Verdecia M, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Marin-Prida J, González-Durruthy M, Uyemura SA, Rodrigues FP, Curti C, Souza DO, Pardo-Andreu GL. 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. Factor de impacto: 2.532**
7. Figueredo YN, Rodríguez EO, Reyes YV, Domínguez CC, Parra AL, Sánchez JR, Hernández RD, Verdecia MP, Pardo Andreu GL. Characterization of the anxiolytic and sedative profile of JM-20: a novel benzodiazepine-dihydropyridine hybrid molecule. **Neurol Res. 2013;35(8):804-12. Factor de impacto: 1.439**

Publicaciones en resúmenes de eventos

8. Nuñez Y, Pardo G, Ramírez J, García L, Delgado R, Merino N, Valdés O, Ochoa E, Verdecia Y, Iglesias L, Onofre D, Salbego C, Hansel G, Nicoloso E, Porto M. PRECLINICAL STUDIES OF A NEW HYBRID MOLECULE WITH NEUROPROTECTIVE EFFECTS IN THE TREATMENT OF CEREBRAL ISCHEMIA. **J Pharm Pharmacogn Res (2014) 2(Suppl. 1):S67**
9. Ramírez-Sánchez J, Nuñez-Figueroado Y, Hansel G, Pires E, Merino N, Valdes O, Delgado-Hernández R, Porto-Verdecia M, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Salbego C, Souza DO, Pardo-Andreu GL. NEUROPROTECTIVE EFFECT OF JM-20 ON EXPERIMENTAL STROKE MODELS INVOLVES MITOCHONDRIAL STABILIZATION AND REDUCTION OF EXTRACELLULAR EAA LEVELS. **J Pharm Pharmacogn Res (2014) 2(Suppl. 1):S241**
10. Nuñez Y, Pardo-Andreu GL, Ramirez J, Pastoris A, Ochoa E, Verdecia Y, Delgado R, Valmor L, Souza DO. EFFECTS OF JM-20 ON RATS BRAIN MITOCHONDRIA AND SYNAPTOSOMES. UNCOVERING ITS NEUROPROTECTIVE MECHANISM (PART I). **J Pharm Pharmacogn Res (2014) 2(Suppl. 1):S241**

11. Núñez Y, Pardo GL, Ramirez J, Loureiro SO, Ganzella M, Ochoa E, Verdecia Y, Delgado R, Souza DO. THE EFFECTS OF JM-20 ON [3H] GLUTAMATE UPTAKE BY SYNAPTIC VESICLES, SYNAPTOSOMES, AND ASTROCYTES FROM RAT BRAIN. UNCOVERING ITS CELLULAR MECHANISMS OF NEUROPROTECTION (PART II). **J Pharm Pharmacogn Res (2014) 2(Suppl. 1):S242**
12. Pardo-Andreu GL, Nuñez-Figueroa Y, Ramírez-Sánchez J, Delgado-Hernández R, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y. ANTIOXIDANT EFFECTS OF JM-20 IN RATS BRAIN MITOCHONDRIA AND SYNAPTOSOMES. MITOPROTECTION AGAINST Ca²⁺INDUCED MITOCHONDRIAL IMPAIRMENT. **Revista Cubana de Farmacia Vol.48 Supplement No.1; 2014**
13. Ramírez-Sánchez J, Simões Pires EN, Núñez-Figueroa Y, Pardo-Andreu GL, Fonseca Fonseca LA, Ochoa-Rodríguez E, Verdecia-Reyes Y, Delgado-Hernández R, Salbego C, Souza DO. JM-20 ACTIVATES CELL SURVIVAL SIGNALING PATHWAYS AND MODULATES GLIA RESPONSE AFTER OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION. **Revista Cubana de Farmacia Vol.48 Supplement No.1; 2014**