

DOI:

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.44>

REFERENCIAR ESTE CAPÍTULO:

Maurice, T., García Rodríguez, J.C. (2014). Estrategias neuroprotectoras innovadoras en la enfermedad de Alzheimer: El ejemplo de nuevas formulaciones de eritropoyetina y el receptor sigma-1 agonistas. En García Rodríguez, J.C. (Ed.). Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. Barcelona, España: OmniaScience; 2014. pp.11-31.

**Estrategias neuroprotectoras innovadoras
en la enfermedad de Alzheimer:
El ejemplo de nuevas formulaciones de eritropoyetina
y el receptor sigma-1 agonistas**

MAURICE TANGUI¹

JULÍO CÉSAR GARCIA RODRÍGUEZ²

¹Universidad Montpellier 2, Inserm U. 710, EPHE, 34095 Montpellier, Francia.

²Coordinador para Ciencias de la Vida y Nanoseguridad, Oficina del Asesor Científico;
Consejo de Estado, La Habana, Cuba.
juliocesar.neurotox@gmail.com

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa devastadora que aumenta en la actualidad con el desarrollo mundial y envejecimiento demográfico. La EA se diagnostica con mayor frecuencia en las personas de más de 65 años de edad, aunque menos frecuente la EA pueda aparecer entre los 35-40 años de edad. En el 2006, había 26.6 millones de enfermos en el mundo y se prevé que la EA afecte a 1 de cada 85 personas para el 2050 en el mundo. Los síntomas de la EA incluyen la pérdida de memoria, la imposibilidad de comunicación o de realizar tareas rutinarias, alteración de la personalidad, y finalmente, estado vegetativo. Las características histopatológicas encontradas en el cerebro de los pacientes con EA son: la presencia de placas seniles extracelulares, ovillos neurofibrilares intracelulares, reducción de sinapsis, degeneración neuronal y reducción del volumen cerebral. Las placas seniles están compuestas de agregados insolubles de especies de proteína amiloidea- β ($A\beta$), mientras los ovillos neurofibrilar es el resultado de la hiper- y fosforilación anormal de la proteína Tau [1, 2] microtúbulo-estabilizadora. La acumulación progresiva de las especies $A\beta$, que se generan por hendiduras enzimáticas de la proteína de precursora amiloidea (APP) por β - y γ -secretases, lleva a la presencia de monómeros solubles y oligómeros, depósitos fibrilares y placas [3]. Aunque, por mucho tiempo se pensaba que el depósito de $A\beta$ inducía a daños amnésicos; la correlación entre la deposición de amiloidea en parénquimas y decadencia cognoscitiva son todavía un tema polémico. En efecto, la densidad de la placa y la carga $A\beta$ no equivalen necesariamente al nivel de demencia. La recopilación de pruebas demuestra un papel perjudicial del $A\beta$ soluble tanto en el cerebro de los pacientes con EA [4, 5] y en modelos de ratón con EA [6, 7]. En efecto, los oligómeros solubles pueden perjudicar las funciones cognoscitivas [8] y la potenciación a largo plazo [9, 10]. Las dos principales marcas distintivas de la EA, el $A\beta$ y las proteínas de Tau, son las responsables de las reacciones neuroinflamatorias, llevando a la astrogliosis y microgliosis masivas, a la disfunción sináptica, a daños mitocondriales, a la apoptosis y a la muerte celular [1, 2].

La aplicación directa de $A\beta$ en cultivos celulares neuronales primarios y otras líneas celulares es extremadamente tóxica [11] y constituye el primer modelo de intención en el estudio de la fisiopatológico de la EA. Aunque queda trazar por completo el mecanismo de la toxicidad de la amiloidea, los efectos del $A\beta$ se transmiten por la capacidad de la proteína de juntarse en estructuras amorfas

fibrilares [12]. Los estudios de actividad de la estructura usando fragmentos A β revelaron que el péptido que lleva los 11 aminoácidos (A β ₂₅₋₃₅) comparte la capacidad de autoagregar y transmitir la toxicidad *in vitro* [13, 14] e *in vivo* [15]. La toxicidad del A β ₂₅₋₃₅ comprende la inducción de estrés oxidativo por la producción de radicales libres, la interrupción de la homeostasis del calcio [13], el mejoramiento de la excitotoxicidad y la apoptosis [13, 16, 17, 18, 19]. Efectivamente, la administración intracerebroventricular (ICV) del péptido A β ₂₅₋₃₅ en el cerebro de roedor indujo, en una o dos semanas después de la inyección, neuroinflamación y gliosis reactiva, activación de caspasas pro-apoptótica, estrés oxidativo, reducción del número de neuronas medidas en las capas de células piramidales del hipocampo, pérdida de neuronas colinérgica y de memoria [15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29]. Actualmente se usa ampliamente para descubrir el potencial neuroprotectivo de nuevos medicamentos y derivados naturales [30, 31]. De manera interesante, la inyección A β ₂₅₋₃₅ causó no sólo en una toxicidad amiloidea agresiva sino también en la acumulación de especies de endógeno A β y Tau hiperfosforilación, como se observa en la fisiopatología de la EA. Una semana después de la inyección de A β ₂₅₋₃₅, los APP y los niveles de A β ₁₋₄₂ se aumentaron en el hipocampo y la corteza, las células que expresan A β se pudieron visualizar a través de la inmunohistoquímica y se detectaron productos de división β -secretasa [25, 26]. Además, se registraron en varios estudios un aumento en la fosforilación Tau en los epítopes fisiológicos relacionados con las EA o patológico inducidos por la inyección A β ₂₅₋₃₅ [25, 32].

2. Nuevas estrategias dirigidas a promover los sistemas endógenos de neuroprotección

Las estrategias terapéuticas presentes se apoyan en los medicamentos colinomiméticos, donde se incluyen el donepezil, la rivastigmina y la galantamina, y memantinas con putativas acciones neuroprotectoras. Sin embargo, cada medicamento o combinación sólo provoca efectos sintomáticos, medidos por una mejora ligera o un retardo del déficit cognoscitivo, que rápidamente pierden su efecto. Hoy la investigación es muy activa para los medicamentos que puedan actuar como verdaderos *agentes que modifican la enfermedad*. En el presente capítulo, examinaremos dos de estas innovadoras vías terapéuticas que pueden llevar de manera expedita al mercado medicamentos para la EA. Estas estrategias

alternativas se apoyan en un estímulo eficiente de los sistemas endógenos de neuroprotección.

En primer lugar, las citoquinas hematopoyéticas han mostrado tener potenciales terapéuticos en desórdenes neurológicos, como la EA. Los tratamientos con citoquina son capaces de prevenir y restaurar los déficits cognoscitivos, de aumentar el número de células microgliales y disminuir tanto la deposición de A β cerebral como la acumulación soluble de A β a través de un mejoramiento de la fagocitosis A β por microglia [33, 34]. Entre citoquinas hematopoyéticas, se ha incrementado la atención en la *eritropoyetina (EPO)*; además de su función de eritropoyetina, se mostró que promovía la protección y la regeneración celular en varias indicaciones [35, 36]. La EPO es una glicoproteína (30 kDa) de 165 aminoácidos que pertenece a la súper familia de citoquinas de tipo I. Esto regula la eritropoyesis inhibiendo la muerte celular programada en células eritroides y permitiendo así la maduración de los eritrocitos [36]. La EPO y su receptor se expresan en el hígado y en tejidos no implicados en la eritropoyesis, como el tracto reproductivo, el pulmón, el bazo, el corazón y el cerebro, en neuronas y astrocitos [37]. Los efectos citoprotectores de la EPO se establecieron en varios órganos y en particular el sistema nervioso central [38]. Aquí reportamos que la EPO, y en particular, una formulación administrada de forma intranasal, es neuroprotectora contra la neurodegeneración tipo EA.

En segundo lugar, el *receptor sigma-1 (σ_1)* es una proteína intracelular acompañante localizada en las áreas alrededor del retículo endoplásmico (ER). Su activación modula rápidamente la movilización de las reservas relacionadas con las entradas de calcio (IP₃) trisfosfato inositol-1, 4, 5 de las reservas del ER intracelulares [39, 40]. En efecto, se ha demostrado que la toxicidad A β está relacionada con la estrés del ER. Las proteínas A β , y en particular la A β ₂₅₋₃₅, provocaron alteraciones de la homeostasis de la ER y la activación de genes sensibles al estrés, como el GRP78/Bip o GRP94 [41]. Además, la activación del receptor σ_1 estimula su desplazamiento, asociado dentro de pequeñas gotas de lípidos al colesterol y proteínas de anclaje, del ER hacia el plasma, membranas mitocondriales o nucleares [42]. Una vez allí, el receptor σ_1 desempeña una función en la compartimentación y exportación de lípidos a las periferias celulares [42, 43]. Las plataformas de lípido desempeñan papeles en una variedad de funciones celulares incluyendo el transporte de vesícula, la agrupación de receptores, la internalización y la conexión del receptor con las proteínas implicadas en la señal de transducción [44]. Por lo tanto, la

activación de los receptores σ_1 tiene consecuencias sustanciales en viabilidad de la célula, la diferenciación y la neuroprotección. Efectivamente, *se ha mostrado que los agonistas receptores selectivos σ_1 son medicamentos neuroprotectores potentes en modelos de excitotoxicidad y contra la toxicidad inducida por las A β 25–35- en neuronas corticales en vitro y en vivo* [45, 46, 24, 27, 28].

3. Actividad de Neuroprotectora de la EPO, y en particular la formulación intranasal de la Neuro-EPO, en modelos de la EA

La EPO y su receptor se sobre regulan ante la lesión neuronal y la neurodegeneración; por ejemplo, en la corteza temporal e hipocampo de pacientes con el daño cognoscitivo ligeros o EA [47]. La inyección experimental de EPO mejoró la función neurológica y redujo la lesión cerebral después de la isquemia cerebral [48], la hemorragia intracerebral [49], el daño cerebral traumático [50], la herida de médula espinal [51], la encefalitis autoinmune experimental [52], el estado epiléptico [53], la hipoxia-isquemia neonatal [54] y la esclerosis lateral amiotrófica [55]. En los modelos de EA, *in vitro* e *in vivo*, se han obtenido evidencias del efecto neuroprotector de la EPO. Usando modelos de cultivo celular *in vitro*, la EPO recombinante humana (rHu-EPO) protegió las neuronas de la neurodegeneración inducida por los péptidos A β [56] y en particular los oligómeros A β 25–35 [57, 63]. En ratones de edad Tg2576, con gran expresión de hAPPm, la EPO mejoró la memoria contextual y aumento la proliferación endotelial, la expresión de sinaptofisina y la densidad capilar en el cerebro [58]. Los mecanismos por los cuales la EPO induce su acción neuroprotectora son de naturaleza multifactorial (Figurara 1a) e involucran la protección neuronal y glial, efectos antioxidantes y antiapoptóticos, junto con la protección de la integridad de barrera hematoencefálica.

Se ha diseñado una nueva formulación de la EPO que contiene bajo contenido de ácido sialico. Esta formulación, llamada Neuro-EPO, carece de efectos hematopoyéticos y es capaz de alcanzar rápidamente el cerebro a través de la administración intranasal (IN) [59, 60]. La formulación tiene la composición apropiada que permite permanecer un tiempo adecuado en la fosa nasal, evitando la eliminación natural o la limpieza del pH del mucus silial; se optimizaron el volumen y concentración para permitir la liberación de Neuro-EPO por la vía nasal al fluido cerebroespinal y el cerebro. Los datos anteriores con Neuro-EPO

confirmaron su eficacia protectora en los gerbos sometidos a isquemia focal [61, 78, 80].

En ratones ICV se inyectaron con el péptido oligomérico A β 25-35 y por lo tanto desarrollaron síntomas similares a la EA después de una semana, comparamos los efectos protectores de las dos formulaciones EPO, la rHuEPO administrada vía IP, y NeuroEPO vía IN [62], y el artículo presentado. El A β 25-35 provocó déficits de la memoria de roedores, estrés oxidativo en el hipocampo y la corteza, inducción de moléculas pro-apoptóticas, incluso la familia Bad/Bax o caspases, y neuroinflamación. Se observa la pérdida de neuronas colinérgica y glutamatergica en el hipocampo, la corteza, el septo o núcleo basal. Observamos que, en 125-500 μ g/kg IP de rHuEPO y 62-250 μ g/kg IN de NeuroEPO, ambas formulaciones impidieron déficits de aprendizaje inducido por el A β 25-35. Los diferentes procedimientos usados fueron: alternación espontánea, evasión pasiva, aprendizaje de laberinto acuático y reconocimiento de objeto, para abordar las memorias espaciales y no espaciales, de corto y largo plazo. En el laberinto acuático en particular, los ratones tratados con A β 25-35 mostraron una disminución de la capacidad de aprender la posición espacial de una plataforma escondida en el fondo. La adquisición fue retrasada (Figura 1c) y durante la prueba de sonda (60s de nado en una piscina sin la plataforma), los animales no pasaron más tiempo en el cuadrante de plataforma que el nivel d (Figura 1d). La aplicación de 125 y 250 μ g/kg de NeuroEPO vía IN evita estos déficits (Figura 1c, d).

Ambas formulaciones EPO impidieron el aumento de la peroxidación lipídica inducido por el A β 25-35 en el hipocampo, mostrando una actividad antioxidante significativa (como se muestra en la Figura 1b para NeuroEPO). La rHuEPO, 250 μ g/kg IP, o la NeuroEPO, 125 μ g/kg IN, evitan que aumenten inducido de A β 25-35 en la expresión de Bax y disminuya en la activación de Akt, mostrando que contribuyeron a aliviar la apoptosis, en parte incrementando la vía protectora endógena PI3K/Akt, que se conoce se activa por los receptores EPO. En las mismas dosis, observamos una prevención de la disminución del 20-24 % en células viables en CA1, un área neuronal del hipocampo muy vulnerable a la toxicidad del A β 25-35. Ambas formulaciones de EPO bloquearon la liberación de citoquinas (TNF α , IL-1 β) en el hipocampo de los ratones tratados con A β 25-35, en las mismas dosis activas. Todos los parámetros mostraron una protección significativa inducida por las dos formulaciones [62] y el artículo presentado. Confirmamos aquí la actividad protectora de la EPO en la EA [58], al mostrar su eficacia en el modelo de ratón

A β 25-35 *in vivo*. Las células de PC12 expuestas al A β 25-35 también mostraron que la EPO sirve como antioxidante [57] ya que activa la vía PI3K/Akt [63].

Finalmente, referimos que ambas formulaciones regulan la expresión del receptor de la EPO en el hipocampo. La rHuEPO y la NeuroEPO aumentaron considerablemente los niveles receptores de la EPO en los animales control. Sin embargo, la disminución inducida por el A β 25-35 en EPO-R sólo fue restaurada por la inyección IP de rHuEPO. Pruebas recientes indicaron que la degeneración cerebrovascular y las células endoteliales senescentes también contribuyen al patogénesis de la EA, dificultando el paso de A β a través de la barrera ematoencefálica [64]. Esto sugiere que los niveles de NeuroEPO no eran suficientes para inducir un nuevo EPO-R o sugiere que los mecanismos de la protección de la NeuroEPO no dependen sólo de los niveles EPO-R.

Sin embargo, el efecto de la EPO depende de la activación de varias quinasas, incluyendo la quinasa Janus 2 (JAK2), una quinasa tirosina que se asocia con receptor EPO, y la proteína quinasa B/Akt. EPO impidió la lesión apoptótica de las células neuronales por la inducción de la auto fosforilación de la JAK2 [65]. Además, se mostró que la EPO realiza considerablemente la actividad de la Akt durante el estrés oxidativo previendo así la activación inflamatoria de la microglia [66, 67]. La actividad de sobre regulación de la Akt resultó ser un paso necesario en el mecanismo; ya que al impedir la fosforilación de la Akt, se bloqueó la protección celular inducida por la EPO. A través de la regulación de la vía que señala el PI3K/Akt, la EPO es capaz de regular apoptosis celular después de agresiones hipóxicas/ excitotóxicas y estrés oxidativo [66, 67].

Ya que la toxicidad amiloidea implica mecanismos de muerte celular excitotóxica y apoptótica, observamos que las dos formulaciones EPO bloquearon la inducción de la proteína Bax pro-apoptótica y la muerte celular en la capa neuronal CA1, un área glutamatergica con abundante neuronas altamente sensible a excitotoxicidad. Es probable que el mecanismo de acción antiapoptótica de la EPO dependa en la inhibición de la actividad de la GSK-3 β o la liberación del factor de transcripción en forma de horquilla (FOXO3a), ambos objetivos de la PI3K/Akt. La activación de la FOXO a causa la degeneración celular apoptótica e interrumpe la permeabilidad de la membrana mitocondrial [68]. El GSK-3 β tiene varias funciones en la señalización y la patología cerebral. En particular, es una de las quinasas más importantes responsable de la hiperfosforilación Tau en la EA [69]. Pero también está implicada en la toxicidad donde está presente A β , ya que

su sobre activación está relacionada con los daños cognoscitivos, la producción de A β , la muerte neuronal y la neuroinflamación [70, 81]. La actividad de la GSK-3 β es eliminada por la EPO y este efecto se puede vincular con los cambios estructurales y la disminución de la expresión Bax para evitar la muerte celular [71]. Además, se mostraron los efectos protectores de la EPO contra la toxicidad A β ₂₅₋₃₅ al involucrar directamente la actividad de la PI3K y la activación de la GSK-3 β , ya que su efecto protector en el modelo de cultivo celular fue bloqueado al seleccionar los inhibidores PI3K o GSK-3 β [63].

También se ha reportado que la EPO proporciona una protección eficaz contra las patologías inflamatorias. Observamos un potente bloqueo de la liberación de la TNF α y la IL-1 β provocada por la toxicidad de la A β ₂₅₋₃₅. Se cree que la capacidad neuroprotectora de la EPO involucra principalmente a la homeostasis extrínseca de la célula a través de la modulación de la activación microglial y el control de la liberación de citoquina [72]. Se ha mostrado que EPO ejerce una acción antiinflamatoria por caminos que comprenden la exposición fosfatidilserina, la activación microglial, la actividad de la Akt y la regulación de caspases, o más directamente inhibiendo varias citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-6, la TNF α y la MCP-1 [66, 67].

Para concluir, se ha mostrado que la EPO es neuroprotectora en varios modelos transgénico o no de EA, como aquí en el modelo de ratón A β ₂₅₋₃₅ de EA, corroborando su potencial como un sistema neuroprotección endógeno que se podría mejorar para obtener una mejor eficacia terapéutica. La eficacia de la formulación de NeuroEPO IN es muy prometedora en términos de facilidad y seguridad de uso en pacientes con EA. La NeuroEPO se probará a nivel clínico muy pronto.

4. Protección neuronal por ligandos que activan un acompañante del residente ER, el receptor σ_1

En busca de nuevos medicamentos terapéuticos con una potente capacidad neuroprotectora en la EA y no directamente dirigida a la amiloidea o las proteínas de Tau; identificamos agonistas de la proteína acompañante σ_1 [24] y en particular los ligandos a muscarina / σ_1 mezclado que pertenecen a la serie ANAVEX [73, 74].

La proteína σ_1 es un acompañante del ER, preferentemente localizada en las membranas que forman contactos focales entre el ER y la mitocondria [40]. En condiciones básicas, la proteína σ_1 forma complejos con otras acompañantes, como la GRP78/Bip. En reducción ER Ca^{2+} o la estimulación a través del ligando, la proteína σ_1 se disocia de la Bip, llevando a un señalamiento prolongado del Ca^{2+} , a través de los receptores IP_3 [40]. Bajo el subsecuente estrés crónico de la ER, la proteína σ_1 también puede desplazarse para alcanzar la membrana del plasma, agrupando cascadas intracelulares que depende del Ca^{2+} , incluyendo fosfolipasa C (PLC) y la proteína quinasa C (PKC) [75, 79] y modificando la composición y la funcionalidad de las microesferas ricas en lípido conocidas como balsas de lípido [76, 42]. El aumento o la activación de las proteínas σ_1 en las células contrarresta la respuesta del estrés del ER, mientras que su disminución o inactivación aumenta la apoptosis [40]. Por lo tanto, la modificación la activación de la proteína σ_1 a través de agonistas eficaces media una acción farmacológica única en la homeostasis de la Ca^{2+} y las vías de transducción de la señal, con mayores impactos en la respuesta celular, la plasticidad y la citoprotección (ver Figura 2a).

La actividad neuroprotectora de los ligandos selectivos que activan la proteína σ_1 ha sido demostrada en los derrames y otros modelos relacionados excitotoxicidad *in vitro* y *in vivo* (para revisión, [45, 46] reportó la primera evidencia que los PRE-o84 selectivos protegen la viabilidad del cultivo celular primario contra el efecto tóxico de las $A\beta_{25-35}$. Entonces analizamos el efecto de este ligando de referencia así como el donepezil *in vivo* [24]. En efecto, el donepezil inhibidor AChE también actúa con gran afinidad con el receptor agonista σ_1 . Los ratones recibieron una inyección ICV de $A\beta_{25-35}$ e inyecciones IP de diferente ligandos una semana antes de que se probaran sus capacidades de memoria usando la alternación espontánea y la evasión pasiva. La peroxidación del lípido hipocampal fue medida para evaluar el estrés oxidativo. El donepezil, PRE-o84 o la tacrina inhibidora de ChE, rivastigmina y galantamina fueron administrados 20 minutos antes de las sesiones de conducta para comprobar sus efectos antiamnésicos. Los medicamentos también se inyectaron 20 minutos antes de la $A\beta_{25-35}$ o 24h después de la $A\beta_{25-35}$ y después una vez por día antes de las sesiones de conducta, para comprobar su actividad neuroprotectora pre-ICV o post-ICV, respectivamente [24]. Todos los medicamentos, menos el PRE-o84, fueron antiamnésicos y la σ_1 antagonista BD_{1047} bloquea los efectos del donepezil. Sólo el PRE-o84 y el donepezil mostraron neuroprotección del PRE-ICV al bloquear la peroxidación del

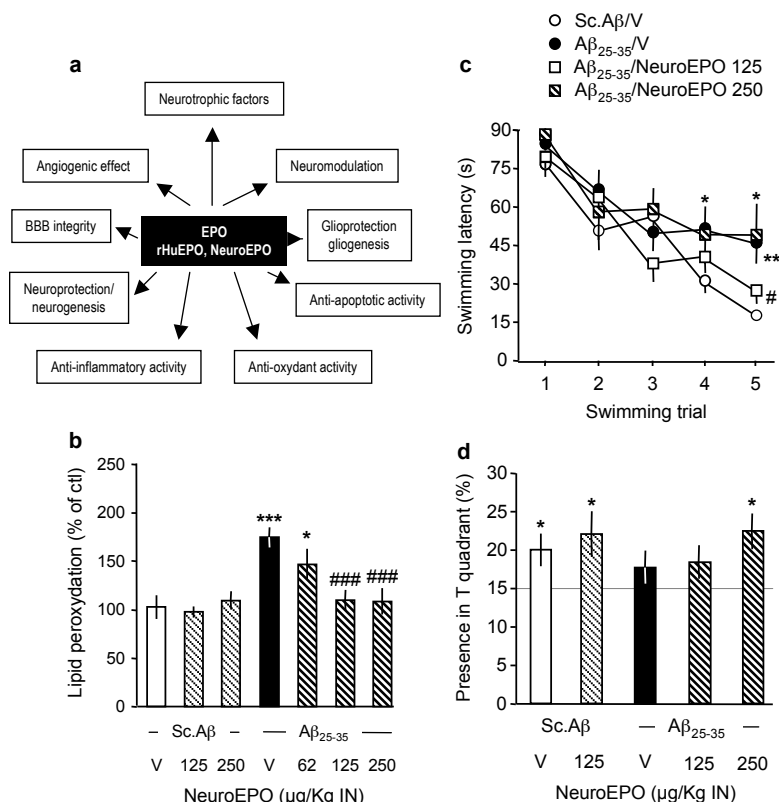


Figura 1. (a) Impactos del efecto neuroprotector de las formulaciones EPO en la EA.; (b) efecto de neuroprotector de la Neuro-EPO en los niveles de peroxidación de lípidos en el hipocampo, 7 días después de inyección de Aβ₂₅₋₃₅ en ratones; y (c, d) efecto Protector de la Neuro-EPO contra el déficit del aprendizaje inducido por la Aβ₂₅₋₃₅ en el laberinto acuático para ratones: perfiles de adquisición y prueba de sonda. En el día 0, los ratones se les administraron i.c.v. Sc.Aβ o el péptido Aβ₂₅₋₃₅ (9 nmol). Entre el día 1 y el día 4, recibieron la solución vehículo (V) o la Neuro-EPO (62-250 µg/Kg EN) tres veces al día. Los ratones fueron sacrificados en el día 9 por las medidas de peroxidación de lípido. Otros ratones fueron entrenados entre el día 7 y 11 y la prueba de sonda fue examinada sin la plataforma en el día 12. $F(6,76) = 5.47, p = 0.0001, n = 10-12$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs el grupo tratado (Sc. Un β + V); # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs el grupo tratado (Aβ₂₅₋₃₅+V); la prueba de Dunn en (b) y en (c). * $p < 0.05$ vs el nivel de riesgo (15s), una t-prueba de muestra en (d). BBB, barrera sanguínea-cerebral. Adaptado de [80, 62] y artículo presentado.

lípidos y el déficit de aprendizaje. Los efectos fueron bloqueados por el BD1047. El PRE-084 y el donepezil mostraron una neuroprotección completa del post-ICV. Otros inhibidores ChE mostraron efectos parciales. El BD1047 bloqueó los efectos del PRE-084 y atenuó los efectos donepezil. Otros efectos inhibidores del ChE no fueron sensibles al BD1047. Estas observaciones claramente mostraron que

los potentes efectos antiamnésicos y neuroprotectores del donepezil contra la toxicidad del A β 25-35 implican acciones colinérgicas y farmacológicas agonistas de la σ_1 , y este mecanismo dual puede explicar su actividad sostenida tal y como se compara con otros inhibidores ChE [24].

La siguiente idea era desarrollar ligandos combinados σ_1 /muscarínicos. Esto se basa en la capacidad de estos tipos de ligandos para activar simultáneamente una vía neuroprotectora, p.ej, la vía M1/PLC/PKC, y su amplificación a través de una activación de la activación concomitante de la proteína σ_1 [73, 74, 27, 28]. Los compuestos de Tetrahidrofurametamina (ANAVEX1-41, ANAVEX2-73) presentan tales perfiles de receptor σ_1 /muscarínicos combinados con un nivel de afinidad de alto a moderado para los subtipos muscarínicos y para los receptores σ_1 , y una alta selectividad vs las zonas σ_2 . Los compuestos son medicamentos antiamnésicos potentes; en ratones tratados con la escopolamina antagonista receptora muscarínica, la dizocilpina antagonista receptora de NMDA, o el péptido A β 25-35 [77, 28].

Analizamos en detalles las capacidades neuroprotectora de los compuestos de ANAVEX en ratones inyectados con el péptido A β 25-35. Cuando se administró el ANAVEX1-41 (1-1000 μ g/kg i.p.) 7 días después del A β 25-35, es decir, 20 minutos antes de las pruebas de comportamiento, revirtió considerablemente los déficits provocados por el A β 25-35; siendo las dosis más activas las que se encuentran en el rango de 3-100 μ g/kg [27]. Cuando se pre-administró el compuesto, a una dosis de 30-100 μ g/kg, 20 minutos antes de la A β 25-35, i.e., 7 días antes de las pruebas, previno los daños de aprendizaje. El análisis morfológico de las estructuras corticolímbicas mostró que la A β 25-35 indujo a una significativa pérdida de células en la capa celular piramidal CA1 del hipocampo que fue detenida por la ANAVEX1-41 (100 μ g/kg). El incremento del número de la proteína ácida gliofibrilares (GFAP) células inmunopositivas en la corteza retrosplenial o en todas partes del hipocampo reveló una inflamación inducida por la A β 25-35 que fue detenida por la ANAVEX1-41. El medicamento también contuvo los parámetros del estrés oxidativo inducido por la A β 25-35 medido en los extractos del hipocampo, i.e., los aumentos de peroxidación lipídica y la nitración proteica. Sin embargo, el ANAVEX1-41 no pudo detener la expresión inducida por la caspasa-9 A β 25-35. El compuesto también bloqueó la expresión inducida por la caspasa-3 A β 25-35, un marcador de apoptosis. Tanto la escopolamina muscarina antagonista como la σ_1 proteína inhibidora BD1047 bloquearon los efectos positivos del ANAVEX1-41 (30 o

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) contra los daños al aprendizaje inducidos por la $\text{A}\beta_{25-35}$, indicando que la muscarina y los receptores σ_1 están implicados en el efecto del medicamento. Un efecto sinérgico podría explicar las bajas dosis activas registradas en vivo [27].

El ANAVEX2-73 muestra más afinidades de moderación que el ANAVEX1-41 para muscarina y los grupos σ_1 , en un rango micromolar bajo. Sin embargo, los medicamentos también revirtieron los déficits de aprendizaje en los ratones inyectados $\text{A}\beta_{25-35}$, con dosis en el rango de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IP [28]. Cuando se inyectaron simultáneamente con $\text{A}\beta_{25-35}$, 7 días antes de las pruebas, esta bloqueó la aparición en los daños de aprendizaje. Esta actividad protectora fue confirmada ya que el ANAVEX2-73 bloqueó la pérdida celular CA1 inducida por la $\text{A}\beta_{25-35}$ y la tensión oxidativa en el hipocampo. Este efecto era diferencialmente sensible al antagonista receptor de escopolamina muscarina o la proteína BD1047 antagonista σ_1 , confirmando la acción farmacológica conjunta de muscarina / σ_1 . De manera interesante, su único desmetil metabolito, el ANAVEX19-144, también fue efectivo y el ANAVEX2-73 mostró una mayor duración de la acción que su compuesto afín el ANAVEX1-41, siendo efectivo aún cuando se inyectó 12 h antes de la $\text{A}\beta_{25-35}$ [28].

En un estudio más reciente ([82] y en artículo presentado), corroboramos que la inyección de $\text{A}\beta_{25-35}$ indujo hiperfosforilación de la proteína Tau, mostrando que disminuyó rápidamente la actividad de Akt y activó la GSK-3 β en el hipocampo del ratón. En segundo lugar, mostramos que la activación quinasa y transformación Tau resultante, contribuyó directamente a la toxicidad amiloidea, ya que la coadministración del inhibidor Tipo selectivo GSK-3 β bloqueó la fosforilación Tau y los daños de memoria inducidos por la $\text{A}\beta_{25-35}$. En tercer lugar, analizamos el efecto de los PRE-084 y el ANAVEX2-73 en la fosforilación Tau y la activación de vías relacionadas con las quinasas (Akt y GSK-3 β). Como se muestra en la Figura 2b, c, ambos compuestos bloquearon considerablemente el aumento inducido de la $\text{A}\beta_{25-35}$ en la hipofosforilación Tau. Y en cuarto lugar, también tratamos el impacto del medicamento en el cultivo $\text{A}\beta_{1-42}$ inducido por la $\text{A}\beta_{25-35}$ y observamos que los compuestos bloquearon considerablemente el aumento de la $\text{A}\beta_{1-42}$ (ilustrado en la Figura 2d, e) y los niveles C99 en el hipocampo, sugiriendo que la activación del receptor σ_1 puede apaciguar la carga amiloidea en modelos de EA. La comparación con el PRE-084 y la xanomelina, ligando muscarinico que presenta un perfil similar al ANAVEX2-73 en los subtipos de M1 y M2, corroboró que tanto la muscarina como los objetivos de la σ_1 están implicados en los efectos ANAVEX2-73 ([82], y artículo presentado).

Por lo tanto, estos medicamentos mostraron un potente perfil neuroprotector en EA, combinando actividades antiapoptóticas, antioxidantes y citoprotectoras

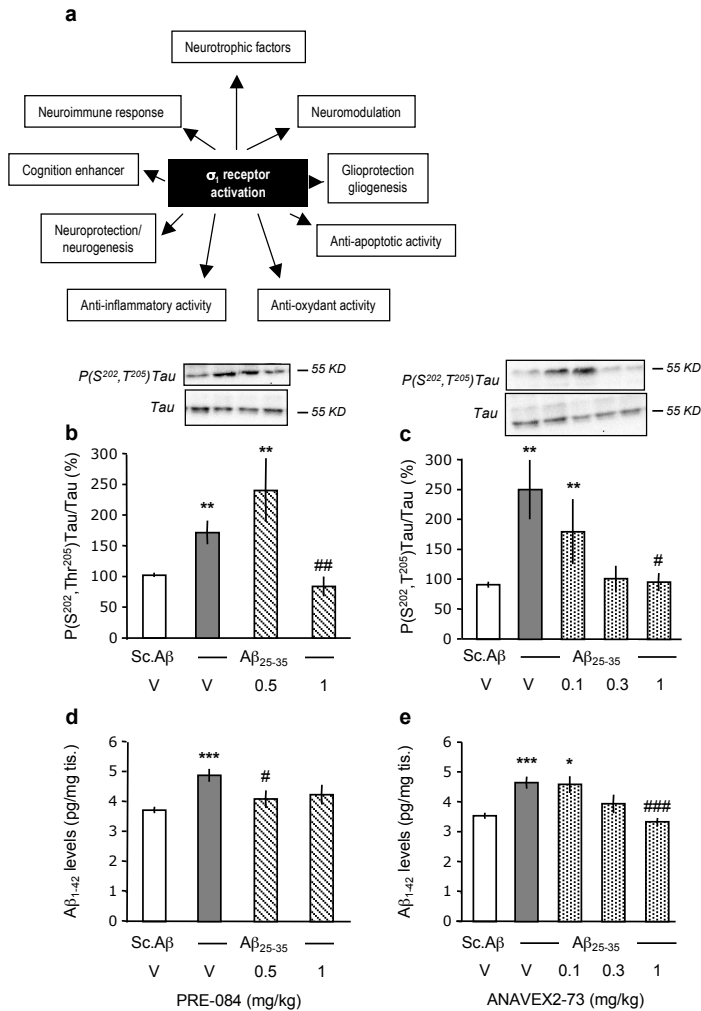


Figura 2. (a) Impactos del efecto neuroprotector de los agonistas receptores σ_1 en EA. Los efectos de PRE-084 o el ANAVEX2-73 en (b, c) hiperfosforilación de la proteína Tau y (d, e) nivel de A β ₁₋₄₂ en el hipocampo, 7 días después de la inyección de A β ₂₅₋₃₅ en los ratones. A los ratones se les administró PRE-084 (0.5, 1mg/kg i.p.), ANAVEX2-73 (0.1-1 mg/kg i.p.) o una salina 20 min antes de A β ₂₅₋₃₅ o Sc.A β (9 nmol). P(Ser202, Thr205) el total/Tau y la proporción/Tau se cuantificaron usando el técnica western blot con anticuerpo primario AT-8. El contenido A β ₁₋₄₂ fue medido por ELISA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs el grupo tratado (Sc.A β + V); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs el grupo tratado (A β ₂₅₋₃₅+V); la prueba de Dunn. Adaptado de [82] y el artículo presentado.

con marcadas mejoras a nivel cognoscitivo. Ellos actúan de conjunto en ambos objetivos, pero con afinidad moderada. Este perfil farmacológico parece particularmente prometedor, en términos de alta eficacia y con baja ocurrencia de efectos secundarios. ANAVEX ha avanzado estas moléculas a la fase II de ensayo clínico. Un compuesto similar con una eficacia comparable es el AF710, que se desarrolla actualmente por el A. Fisher (Instituto para la Investigación Biológica de Israel, Ness-Ziona, Israel) y alcanza la fase I del ensayo clínico [83].

5. Conclusiones y perspectivas

La enfermedad de Alzheimer es una patología progresiva pero agresiva. Cuando los síntomas clínicos aparecen, una carga de A β y hiperfosforilación Tau están presentes en una forma duradera que, en el presente, se considera irreversible. Los instrumentos terapéuticos disponibles son los colinomiméticos y la memantina neuroprotectora. Sus efectos permanecen claramente, por periodos cortos de tiempo de aproximadamente 1-2 años, puramente sintomáticos. La presente investigación sigue diferentes pistas, que apuntan al bloqueo de la generación y la acumulación de A β , la fosforilación Tau anormal, la inflamación y la resistencia de la insulina. Los medicamentos dirigidos a las A β podrían resolver prácticamente cada paso del procesamiento de amiloidea. Esto incluye: bloquear de actividad de las enzimas β -secretase o γ -secretase; realzar la actividad de la α -secretase; impedir los fragmentos de A β producto del amontonamiento en placas; y hasta, usar anticuerpos contra la A β para limpiar los oligómeros del cerebro. Están en progreso, varios ensayos clínicos de nuevos medicamentos dirigidos al A β , pero con regularidad se detienen prematuramente. Las estrategias para impedir que la proteína Tau se destruya y se haga ovillos son en estos momentos el centro de numerosas investigaciones. El punto es ayudar a mantener un sistema de transporte celular vital e incrementar la supervivencia neuronal, el evento clave para impedir la progresión de los procesos neurodegenerativos. Los agentes antiinflamatorios han llevado a resultados prometedores, pero se necesita mucho trabajo para entender mejor los aspectos específicos de la inflamación más activa en el cerebro y ayudar a desarrollar tratamientos antiinflamatorios nuevos para la EA. Finalmente, algunos investigadores exploran el papel de la insulina el cerebro y las cuestiones estrechamente relacionadas de como las células cerebrales usan la glucosa y producen la energía. Estas investigaciones pueden revelar estrategias

para apoyar al funcionamiento celular y contrarrestar los cambios relacionados con la EA.

Además de estas estrategias ampliamente investigadas y supuestamente en su apoyo, se necesita una neuroprotección general y eficaz para preparar al cerebro y estimular a los sistemas neuronales para entablar y hacer frente a los procesos neurodegenerativos. Se necesitan agentes con una amplia gama de efectos; debido a la toxicidad multifactorial, que implica la correspondiente apoptosis, excitotoxicidad, inflamación, falla de energía/ mitocondrial y la disfunción sináptica. La NeuroEPO es en efecto prometedora considerando que carece, primero de actividad eritropoyética y así se limita a la citoprotección. En segundo lugar, sus efectos protectores afectan no sólo neuronas sino también células gliales, que desempeñan un papel primordial en el despeje de la A β . La ruta IN de aplicación también constituirá una gran ventaja en la EA, permitiendo una administración fácil y confiable, incluso en pacientes con daños mayores. Del mismo modo, se ha mostrado repetidamente que la selección del objetivo de la chaperona σ_1 genera una amplia gama de neuroprotección. El hecho que numerosos compuestos, existentes ya en el mercado, compartan una actividad σ_1 además de su objetivo primario mostró la inocuidad del objetivo e ilustró el impacto de la acción dual como se observa en los compuestos de ANAVEX. Ese es el caso para donepezil en la AE, así como para la fluvoxamina, la sertralina, el opipramol en depresión o la nuedexta en la afección pseudobulbar.

Tanto la NeuroEPO como los ligandos σ_1 , selectivos o combinados, se prueban actualmente usando tratamientos crónicos en modelos transgénicos de AE para obtener una visión amplia y consecuente de la actividad neuroprotectora. Serán llevados a ensayos clínicos en un futuro próximo. La ANAVEX2-73 ya completó la fase I, mostrando una amplia ventana terapéutica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue, en parte, una colaboración científica entre la Universidad de Montpellier 2 y la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". J.C.G.R agradece a un profesor visitante a una beca de investigación del Consejo Científico de la Universidad de Montpellier 2 (Francia). Recibió financiamiento externo de Inserm y la Universidad de Montpellier 2, incluyendo contratos de colaboración entre Ciencias de la

Vida Anavex (Pallini, Grecia), Amylgen (Clapiers, Francia) e Inserm (París, Francia) o la Universidad de Montpellier 2 (Montpellier, Francia). Agradecemos las contribuciones de de los Drs. J. Espallergues, J. Meunier, V. Villard (Montpellier, Francia) y A. Vamvakides (Pallini, Grecia).

6. Referencias

1. Selkoe DJ (2001). Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
2. Mattson MP (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631-639.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nature02621>
3. Walsh DM, Selkoe DJ (2007). A β oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101: 1172-1184.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x>
4. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, et al. (1999). Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Amer J Pathol* 155: 853-862.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65184-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65184-X)
5. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K et al. (1999). Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46: 860-866.
• [http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249\(199912\)46:6<860::AID-ANA8>3.o.CO;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249(199912)46:6<860::AID-ANA8>3.o.CO;2-M)
6. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S et al. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99-102.
• <http://dx.doi.org/10.1126/science.274.5284.99>
7. Cheng IH, Scarsec-Levie K, Legleiter J, Palop J., Gerstein H, Bien-Ly N et al. (2007). Accelerating amyloid- β fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 282: 23818-23828.
• <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M701078200>
8. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ et al. (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8: 79-84.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nn1372>
9. Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V et al. (2005). Amyloid- β protein immunotherapy neutralizes A β oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med* 11: 556-561.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nm1234>
10. Scopes DIC, O'Hare E, Jeggo R, Whyment AD, Spanswick D, Kim EM et al. (2012). A β oligomer toxicity inhibitor protects memory in models of synaptic toxicity. *Br J Pharmacol* 167: 383-392.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01973.x>
11. Cotman CW, Anderson AJ (1995). A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 10: 19-45.
• <http://dx.doi.org/10.1007/BF02740836>
12. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687.
13. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992). β -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12: 376-389.
14. Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Kosmoski J, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW (1995). Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: contributions of the β 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem* 64: 253-265.
• <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64010253.x>
15. Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706: 181-193.
• [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01032-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(95)01032-7)
16. Behl C, Davis J, Cole GM, Schubert D (1992). Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 944-950.
• [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)90837-B](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(92)90837-B)

17. Forloni G, Chiesa R, Smirolto S, Verga L, Salmons M, Tagliavini F et al. (1993). Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport* 4: 523-526.
• <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199305000-00015>
18. Café C, Torri C, Bertorelli L, Angeretti N, Lucca E, Forloni G et al. (1996) Oxidative stress after acute and chronic application of beta-amyloid fragment 25-35 in cortical cultures. *Neurosci Lett* 203: 61-65.
• [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12250-8](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(95)12250-8)
19. Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW (1997). β -Amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants. *J Neurochem* 69: 1601-1611.
• <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041601.x>
20. Delobette S, Privat A, Maurice T (1997). In vitro aggregation facilitates β -amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 319: 1-4.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00922-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00922-3)
21. Stepanichev MY, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, Gulyaeva NV (2003). Single intracerebroventricular administration of amyloid- β 25-35 peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats. *Brain Res Bull* 61: 197-205.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00118-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00118-7)
22. Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV et al. (2004). Amyloid- β 25-35-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80: 647-655.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.11.003>
23. Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko II, Lazareva NA, Gulyaeva NV (2006). Studies of the effects of central administration of β -amyloid peptide (25-35): pathomorphological changes in the Hippocampus and impairment of spatial memory. *Neurosci Behav Physiol* 36: 101-106.
• <http://dx.doi.org/10.1007/s11055-005-0167-1>
24. Meunier J, Ieni J, Maurice T (2006). The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β 25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the σ_1 receptor. *Br J Pharmacol* 149: 998-1012.
• <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0706927>
25. Klementiev B, Novikova T, Novitskaya V, Walmod PS, Dmytriyeva O, Pakkenberg B et al. (2007). A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by A β 25-35. *Neuroscience* 145: 209-224.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.11.060>
26. Chavant F, Deguil J, Pain S, Ingrand I, Milin S, Fauconneau B et al. (2010). Imipramine, in part through tumor necrosis factor α inhibition, prevents cognitive decline and β -amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 332: 505-514.
• <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.109.162164>
27. Villard V, Espallergues J, Keller E, Alkam T, Nitta A, Yamada K et al. (2009). Antiamnesic and neuroprotective effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41 against amyloid β 25-35-induced toxicity in mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 1552-1566.
• <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2008.212>
28. Villard V, Espallergues J, Keller E, Vamvakides A, Maurice T (2011). Anti-amnesic and neuroprotective potentials of the mixed muscarinic receptor/ σ_1 ligand ANAVEX2-73, a novel aminotetrahydrofuran derivative. *J Psychopharmacol* 25: 1101-1117.
• <http://dx.doi.org/10.1177/0269881110379286>
29. Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G et al. (2011). Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid β fragment in rats. *Am J Pathol* 179: 315-334.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.03.021>
30. Ruan CJ, Zhang L, Chen DH, Li Z, Du GH, Sun L (2007). Effects of trans-2,4-dimethoxystibene against the neurotoxicity induced by A β 25-35 both in vitro and in vivo. *Neurosci Res* 67: 209-214.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2010.03.009>
31. Kim DH, Park SJ, Kim JM, Jeon SJ, Kim DH, Cho YW et al. (2011). Cognitive dysfunctions induced by a cholinergic blockade and A β 25-35 peptide are attenuated by salivianolic acid B. *Neuropharmacology* 61: 1432-1440.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.038>
32. Deng J, Shen C, Wang YJ, Zhang M, Li J, Xu ZQ et al. (2010). Nicotine exacerbates tau phosphorylation and cognitive impairment induced by amyloid- β 25-35 in rats. *Eur J Pharmacol* 637: 83-88.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.029>

33. Mitrasinovic OM, Murphy GM (2003). Microglial overexpression of the M-CSF receptor augments phagocytosis of opsonized A β . *Neurobiol Aging* 24: 807-815.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00237-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00237-3)
34. Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P et al. (2007). Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell* 18: 1490-1496.
• <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-10-0975>
35. Bartesaghi S, Marinovich M, Corsini E, Galli CL, Viviani B (2005). Erythropoietin: a novel neuroprotective cytokine. *Neurotoxicology* 26: 923-928.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2005.01.016>
36. Rabie T, Marti HH (2008). Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda)* 23: 263-274.
• <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00016.2008>
37. Sanchez PE, Fares RP, Rizzo JJ, Bonnet C, Bouvard S, Le-Cavorsin M et al. (2009). Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9848-9853.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0901840106>
38. Maiese K, Chong ZZ, Li F, Shang YC (2008). Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Prog Neurobiol* 85: 194-213.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.02.002>
39. Hayashi T, Maurice T, Su TP (2000). Ca $^{2+}$ signalling via sigma $_{1}$ -receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca $^{2+}$ concentration. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 788-798.
40. Hayashi T, Su TP (2007). Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca $^{2+}$ signaling and cell survival. *Cell* 131: 596-610.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>
41. Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP (1999). The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol* 155: 302-314.
• <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1998.7002>
42. Hayashi T, Su TP (2003). Sigma-1 receptors (σ_{1} binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 718-725.
• <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.051284>
43. Takebayashi M, Hayashi T, Su TP (2004). Sigma-1 receptors potentiate epidermal growth factor signaling towards neuritogenesis in PC12 cells: potential relation to lipid raft reconstitution. *Synapse* 53: 90-103.
• <http://dx.doi.org/10.1002/syn.20041>
44. Simons K, Ikonen E (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
• <http://dx.doi.org/10.1038/42408>
45. Maurice T, Lockhart BP (1997). Neuroprotective and anti-amnesic potentials of sigma (σ) receptor ligands. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 21: 69-102.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846\(96\)00160-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-5846(96)00160-1)
46. Marrasso A, Caraci F, Salinaro ET, Su TP, Copani A, Ronsisvalle G (2005). Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against β -amyloid-induced toxicity. *Neuroreport* 16: 1223-1226.
• <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-200508010-00018>
47. Assaraf MI, Diaz Z, Liberman A, Miller WH, Arvanitakis Z, Li Y et al. (2007). Brain erythropoietin receptor expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 389-398.
• <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e3180517b28>
48. Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P et al. (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4044-4049.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.051606598>
49. Lee ST, Chu K, Sinn DI, Jung KH, Kim EH, Kim SJ et al. (2006). Erythropoietin reduces perihematomal inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurochem* 96: 1728-1739.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03697.x>
50. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C et al. (2000). Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10526-10531.

- <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.19.10526>
- 51. Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakç S, Ulukus C et al. (2002). Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2258–2263.
 - <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.042693799>
- 52. Li W, Maeda Y, Yuan RR, Elkabes S, Cook S, Dowling P (2004). Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 56: 767–777.
 - <http://dx.doi.org/10.1002/ana.20274>
- 53. Chu K, Jung KH, Lee ST, Kim JH, Kang KM, Kim HK et al. (2008) Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus. *Epilepsia* 49: 1723–1732.
 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01644.x>
- 54. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N et al. (2004). Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 153: 77–86.
 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2003.11.002>
- 55. Grunfeld JF, Barhum Y, Blondheim N, Rabey JM, Melamed E, Offen D (2007). Erythropoietin delays disease onset in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol* 204: 260–263.
 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.11.002>
- 56. Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005). Erythropoietin requires NF- κ B and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during β -amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res* 2: 387–399.
 - <http://dx.doi.org/10.2174/156720205774962683>
- 57. Li G, Ma R, Huang C, Tang Q, Fu Q, Liu H et al. (2008). Protective effect of erythropoietin on β -amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms. *Neurosci Lett* 442: 143–147.
 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.007>
- 58. Lee ST, Chu K, Park JE, Jung KH, Jeon D, Lim JY et al. (2012). Erythropoietin improves memory function with reducing endothelial dysfunction and amyloid- β burden in Alzheimer's disease models. *J Neurochem* 120: 115–124.
 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07534.x>
- 59. Garcia-Rodríguez JC, Sosa-Testé I (2009). The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. *ScientificWorldJournal* 9: 970–981.
 - <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2009.103>
- 60. Garcia-Rodríguez JC, Rodríguez-Cruz Y (2012). The therapeutic potential of Neuro-EPO administered nasally on acute cerebrovascular disease. *Curr Psychopharmacology* 1: 228–232.
 - <http://dx.doi.org/10.2174/221155601201030228>
- 61. Sosa Testé I, García Rodríguez JC, García Salman JD, Santana J, Subirós Martínez N, González Triana C et al. (2006). Intranasal administration of recombinant human erythropoietin exerts neuroprotective effects on post-ischemic brain injury in mongolian gerbils. *Pharmacologyonline* 1: 100–112.
- 62. Maurice T, Mustapha MH, De La C García-Barceló M, Rodríguez Cruz Y, García Rodríguez JC (2012). Intraperitoneal and intranasal formulations of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the oligomeric A β 25–35 nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. Program No. 851.11. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.
- 63. Ma R, Xiong N, Huang C, Tang Q, Hu B, Xiang J et al. (2009). Erythropoietin protects PC12 cells from β -amyloid25–35-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology* 56: 1027–1034.
 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.02.006>
- 64. Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO (2008). Perivascular drainage of amyloid- β peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 18: 253–266.
 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00133.x>
- 65. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M (2001). Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem* 276: 39469–39475.
 - <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M105832200>
- 66. Chong ZZ, Lin SH, Kang JK, Maiese K (2003a). Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res* 71: 659–669.
 - <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.10528>

67. Chong ZZ, Kang JK, Maiese K (2003b). Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 Form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 320–330.
• <http://dx.doi.org/10.1097/00004647-200303000-00007>
68. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS et al. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857–868.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
69. Kosik KS (1992). Cellular aspects of Alzheimer neurofibrillary pathology. *Prog Clin Biol Res* 379: 183–193.
70. Bhat RV, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW et al. (2000). Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11074-11079.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.190297597>
71. Somerville TC, Linch DC, Khwaja A (2001). Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax. *Blood* 98: 1374–1381.
• <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.5.1374>
72. Maiese K, Li F, Chong ZZ (2004). Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 25: 577-583.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2004.09.006>
73. Vamvakides A (2002a). Anticonvulsant and forced swim anti-immobility effects of tetrahydro-N,N-dimethyl-2,2-diphenyl-3-furanemethanamine (AE37) : common action mechanism? *Ann Pharm Fr* 60: 88-92.
74. Vamvakides A (2002b). Mechanism of action of the tetrahydro-N,N-dimethyl-5,5-diphenyl-3-furanemethanamine, a putative nootropic, anti-epileptic and antidepressant compound. *Ann Pharm Fr* 60: 415-422.
75. Morin-Surun MP, Collin T, Denavit-Saubié M, Baulieu EE, Monnet FP (1999). Intracellular sigma1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8196-8199.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.14.8196>
76. Hayashi T, Su TP (2001). Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 491-496.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.98.2.491>
77. Espallergues J, Lalalud P, Christopoulos A, Avlani VA, Sexton PM, Vamvakides A et al. (2007). Involvement of the sigma1 (σ_1) receptor in the anti-amnesic, but not antidepressant-like, effects of the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX1-41. *Br J Pharmacol* 152: 267-79.
• <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjpp.0707386>
78. Rodríguez Cruz Y, Mengana Támos Y, Muñoz Cernuda A, Subirós Martines N, González-Quevedo A, Sosa Testé I et al. (2010). Treatment with nasal neuro-EPO improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia. *ScientificWorldJournal* 10: 2288–2300. <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2010.215>
79. Monnet FP, Morin-Surun MP, Leger J, Combettes L (2003). Protein kinase C-dependent potentiation of intracellular calcium influx by sigma1 receptor agonists in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 705-712.
• <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.103.053447>
80. Genc S, Zadeoglulari Z, Oner MG, Genc K, Digicayliolu M (2011). Intranasal erythropoietin therapy in nervous system disorders. *Expert Opin Drug Deliv* 8: 19-32.
• <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2011.540236>
81. Hooper C, Killick R, Lovestone S (2008). The GSK-3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 104: 1433–1439.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x>
82. Lahmy V, Long R, Morin D, Villard V, Vamvakides A, Maurice T (2012). Mitochondrial protection is induced by the novel tetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73 after ICV injection of oligomeric A β 25-35 peptide in mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model. Program No. 851.15. 2012 Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online.
83. Fisher A (2012). Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120: 22–33.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07507.x>