



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**FÁRMACOS NEUROPROTECTORES PARA EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS:  
INHIBIDORES DE Rho – QUINASA**

Autor: JOSE LUIS MÁRQUEZ DÍAZ

Tutor: Pilar López-Alvarado Gutiérrez

Convocatoria: Junio 2018

## RESUMEN

Rho – quinasa, más conocida como ROCK, es una Ser/Tre quinasa perteneciente al grupo de proteínas pequeñas con actividad GTPasa que participan en la cascada de señalización intracelular (vía Rho/ROCK). Tiene dos isoformas: ROCK I y II, expresadas desde la embriogénesis y con diferentes localizaciones en los tejidos adultos. A nivel del sistema nervioso central (SNC) ejerce un papel importante en la retracción y el bloqueo del crecimiento axonal y dendrítico, por lo que su acción dificulta la regeneración de las células nerviosas tras un daño neuronal. ROCK se convierte en una posible diana terapéutica para tratar la neurodegeneración, por lo que moléculas inhibitoras de ROCK pueden constituir una terapia coadyuvante frente a estos desórdenes. Uno de los primeros fármacos de esta familia, aprobado para tratar el vasoespasmio cerebral, es el **fasudil**, a partir del cual se han realizado modificaciones estructurales a fin de llegar a compuestos más potentes y selectivos. Gracias a las técnicas cristalográficas y de *docking* se consigue elucidar las interacciones con el sitio activo de la proteína y facilitan el camino sintético de moléculas esperanzadoras para tratar estas enfermedades neurodegenerativas.

**Palabras clave:** *vía Rho/ROCK, ROCK, fasudil, enfermedades neurodegenerativas.*

## 1. INTRODUCCIÓN

### Rho y su actividad GTPasa.

Existe un grupo de proteínas agrupadas en una superfamilia conocida como **Ras**, al que pertenecen proteínas pequeñas con actividad enzimática **GTPasa** (trifosfatasa del nucleótido guanina). La proteína Rho, cuyo principal papel catalítico es la **hidrólisis de GTP** (guanosina trifosfato, del inglés *guanosine triphosphate*) y transformarlo en GDP (guanosina difosfato, del inglés *guanosine diphosphate*) pertenece a esta superfamilia; a su vez, se clasifican otras **subfamilias** como la de proteínas pequeñas GTPasas Rho, donde se incluyen a **Rho**, Rac y Cdc42. Estas proteínas pueden presentar **isoformas**, como por ejemplo RhoA, RhoB, RhoC de la proteína Rho; Rac1, de Rac, entre otras. En relación a las isoformas de Rho, RhoA y RhoC son de las que más conocimiento se tiene respecto a su función y actividad. Todas van a desencadenar la activación de otros factores participantes en la cascada de señalización. Se conoce a RhoB como inhibidor de la expresión génica mediada por RhoA, es decir, su función es la opuesta a RhoA<sup>(1)</sup>.

Las moléculas de naturaleza proteica que presentan la actividad enzimática GTPasa son **proteínas G heterotriméricas o monoméricas**, ambas interaccionando con los ácidos grasos de la membrana celular. Se van a diferenciar por el número de subunidades, así como en el mecanismo de activación. Las proteínas G *heterotriméricas* se activan por la unión directa de un sustrato a su receptor, mientras que las *monoméricas*, se activan por otras proteínas intermedias. **Rho** pertenece a las **proteínas G monoméricas** que intervienen en vías de señalización intracelular<sup>(1)</sup>, activadas gracias a una interacción primaria de factores de crecimiento con sus receptores correspondientes<sup>(2)</sup>. En cuanto a la actividad GTPasa, permite el intercambio de GDP por GTP, lo que faculta a la proteína para poder encontrarse en dos conformaciones: Rho inactivada, unido a GDP, y Rho activada, unido a GTP<sup>(2)(3)</sup>. A su vez, la activación de la proteína está regulada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, *Guanine nucleotide Exchange Factors*), al permitir el intercambio de GDP a GTP desplazando al factor inhibidor de la disociación de GDP (GDI, *Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor*). Finalmente, la proteína es liberada del residuo isoprénico de los fosfolípidos de la membrana plasmática al cual permanece unida en situación de reposo. Para inactivar a la proteína (GTP → GDP) se debe producir la estimulación de la actividad GTPasa intrínseca mediante proteínas activadoras de GTPasa (GAP, *GTPase Activating Proteins*), lo que permite una hidrólisis intrínseca del GTP, transformándola en la conformación inactiva unida a GDP y GDI (Figura 1)<sup>(1)(3)(4)</sup>. El tiempo que los efectores permanezcan activos dependerá de los mecanismos de inactivación de la vía de señalización<sup>(2)</sup>.

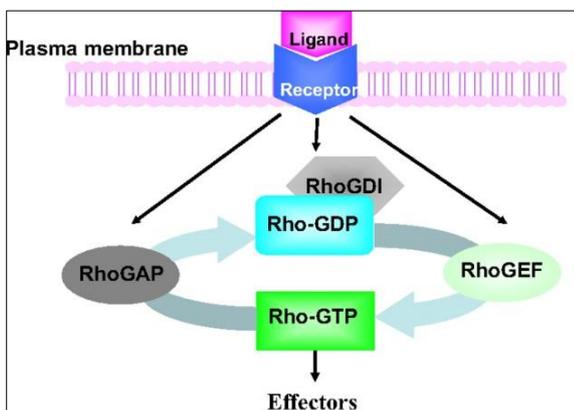


Fig. 1.– Ciclo de activación-inactivación de las proteínas pequeñas GTPasas<sup>(4)</sup>.

Rho participa en una vía de transducción de señales que desembocan en el control y regulación de la forma celular, movilidad, adhesión celular, proliferación, apoptosis, crecimiento y retracción axonal, entre otras<sup>(3)</sup>. Ésta actúa sobre su principal efecto, Rho – quinasa o ROCK, la cual continúa interaccionando por fosforilaciones con otras proteínas efectoras de la cascada de señalización.

### **Papel de ROCK en neurobiología y enfermedades neurodegenerativas.**

En las células nerviosas, la dinámica de polimerización-despolimerización a la que se someten los filamentos de actina, juega un papel esencial para el crecimiento neuronal. La activación por fosforilación de ROCK produce un incremento en la contractilidad de las fibras actina-miosina que conduce a generar fuerzas de retracción axonales y a formar fibras de estrés mediante LIMK

(*LIM Kinase*), dando lugar, entre otros efectos, a un fallo en la regeneración neuronal. En el individuo adulto, el crecimiento neuronal está limitado por la baja capacidad intrínseca de regeneración que poseen las neuronas. Además, la situación *in vivo* se ve más afectada por factores del entorno neuronal que impiden el crecimiento y regeneración ante un daño ejercido en las neuronas. En estudios con roedores, donde había un grupo con daños en la médula espinal y otros, con daño en el nervio óptico, se ha visto que el tratamiento con inhibidores de la Rho – quinasa (ROCK), favorece una regeneración y recuperación más rápida y efectiva. No obstante, para poderse alcanzar este efecto no participa una señal única, sino que deben complementarse con otras señales promotoras del crecimiento y supervivencia celular<sup>(5)</sup>.

A nivel del tejido nervioso, por otra parte, ROCK participa en el proceso de muerte celular por: estimulación de vías apoptóticas (*vía Fas*, *p38/MAPK* y *PTEN*) e inhibición de la *vía Akt*, silenciador de la vía de las caspasas, la cual inducen apoptosis. Esto se ha visto en estudios con ratas con daño isquémico debido a la supresión de oxígeno y glucosa a la que se sometieron, donde se ve un aumento de la supervivencia celular al ser tratados con inhibidores de la ROCK<sup>(5)</sup>.

En relación con las células de la glía (células de soporte neuronal) y microglía (sistema inmune intrínseco del sistema nervioso con capacidad fagocitaria), hay estudios en los que se ve que un aumento de la actividad de la vía **RhoA/ROCK** que conduce a fallos en la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (células de la glía que intervienen en la formación de la mielina) y aumento de la liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF $\alpha$* ). Por lo tanto, al inhibir ROCK en microglía cultivada con **Y-27632** (Fig. 7a) o **H-1152-P** (Fig. 5c), ambas moléculas inhibidoras de ROCK, se observa que hay una disminución en la liberación de factores proinflamatorios facilitando la actuación de factores antiinflamatorios como *IL-10*. Estos autores realizaron estudios sobre ratones con esclerosis amiotrófica lateral (ELA), se trataban con **fasudil** (Fig. 5a) como inhibidor de ROCK. Se observa una disminución en la infiltración de astrocitos (células gliales más abundantes del sistema nervioso) y astrogliosis (pérdida de astrocitos por una parte dañada del cerebro), lo que se traduce en una respuesta de supervivencia<sup>(5)</sup>. Por otro lado, los mismos investigadores hablan de que una menor activación de la vía **RhoA/ROCK** está relacionada con una mayor resistencia a las especies radicales de oxígeno (ROS), lo cual, en cierta medida, consiguen incrementar la supervivencia y regeneración neuronal<sup>(5)</sup>. En vista a algunas de las acciones de ROCK en el sistema nervioso (SN), cabe destacar la posibilidad de su acción en algunos procesos que pueden desencadenar trastornos neurológicos y neurodegeneración:

- **Enfermedad de Alzheimer** (AD, *Alzheimer's Disease*). La enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por la acumulación extracelular de placas seniles de  $\beta$ -amiloide y neurofibrillas intracelulares compuestas por proteína Tau hiperfosforilada. El péptido  $\beta$ -amiloide se produce por escisión proteolítica de la proteína precursora de amiloide (APP) con acción de  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas. A diferencia de éstas,  $\alpha$ -secretasa va a escindir APP por el dominio  $\beta$ -amiloide y no resulta en este compuesto tóxico. La activación de la vía Rho/ROCK va a favorecer también la producción del péptido  $\beta$ -amiloide<sup>(5)(6)</sup>, mediada por una forma derivada de CRMP-2 (CRMP-2A). Ésta pertenece a una familia de fosfoproteínas CRMP (proteínas mediadoras de respuesta a colapsinas) expresadas principalmente en el SN. CRMP-2 se ha descrito como mediador intracelular que señala e induce bloqueo del extremo distal de axonal y dendrítico<sup>(7)</sup>. **Los inhibidores de ROCK** pueden suponer una posible terapia complementaria para esta enfermedad por **reducir la producción de péptido  $\beta$ -amiloide**. Por otro lado, los AINES (inhibidores de la COX) y estatinas (inhiben a proteínas pequeñas GTPasas como Rho, activan la  $\alpha$ -secretasa e inducen la degradación lisosomal de APP) contribuyen también a reducir la producción de  $\beta$ -amiloide<sup>(6)</sup>.

- **Enfermedad de Parkinson** (PD, *Parkinson's Disease*). La patogenia de esta enfermedad radica en la degeneración axonal de neuronas dopaminérgicas<sup>(3)</sup>. En un estudio realizado tanto con células mesencefálicas cultivadas (*in vitro*) como con ratones (*in vivo*), con los neurotóxicos catecolaminérgicos MPP (1-methyl-4-phenylpyridinium) y MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) respectivamente,<sup>(5)(8)</sup> se pretendía investigar la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas ante estas toxinas, así como evaluar la longitud de los axones y dendritas de las neuronas supervivientes<sup>(8)</sup>. En él, se observó que al incorporar fasudil como inhibidor de ROCK de la microglia se producía un efecto neuroprotector ya que disminuía la pérdida de células dopaminérgicas y un efecto estabilizador axonal de las neuronas dopaminérgicas dañadas, con lo que se evitaba la retracción neuronal de las supervivientes. Con ello se deduce que la vía Rho/ROCK está implicada en la degeneración dopaminérgica<sup>(3)(5)</sup> y que **inhibidores de ROCK pueden ser una estrategia contra la degeneración de neuronas dopaminérgicas**, combinándose con otras terapias antiparkinsonianas<sup>(8)</sup>.

- **Epilepsia**. La translocación de Rho a la membrana plasmática está incrementada en los ataques epilépticos, lo que se traduce en que la vía Rho/ROCK está activada. Estos hallazgos sugieren que esta vía de señalización tiene un papel importante en esta enfermedad, y que los **inhibidores de ROCK pudieran ser una esperanza en tratamiento de la epilepsia**<sup>(3)</sup>.

- ***Daño en la médula espinal*** (SCI, *Spinal Cord Injury*). Ante la lesión de algún punto de la médula espinal, la regeneración axonal del SNC es inferior y más lenta que en el Sistema Nervioso Periférico (SNP). En esta regeneración influyen las moléculas inhibitoras del crecimiento axonal, que van a activar la vía Rho/ROCK. Por este motivo, hay estudios en modelos de animales con algún daño medular, donde respaldan que la **neuroprotección y regeneración axonal es más eficaz con el empleo de inhibidores de ROCK**<sup>(3)(6)</sup>.
- ***Ictus***. Es una de las enfermedades del SNC con más morbimortalidad. Se ha observado que el tratamiento con inhibidores de la vía Rho/ROCK protege frente al daño cerebral isquémico ya que disminuye la fuerza contráctil de las células musculares lisas de los vasos, por inhibición de la fosforilación de MLCK (*Myosin Light-Chane Kinase*). Esta inhibición regula positivamente la expresión de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), con la consecuente producción de óxido nítrico (NO); hay una dilatación de los vasos cerebrales por el bloqueo intracelular de canales de calcio<sup>(3)</sup>. Se produce así **vasodilatación y aumento del flujo de la microcirculación, lo que se traduce en neuroprotección**<sup>(3)(6)</sup>. En un estudio con roedores de la especie *Mongolian gerbil*, se ha confirmado la prevención de la muerte neuronal inducida por isquemia en la región CA1 del hipocampo<sup>(6)</sup>.
- ***Hemorragia subaracnoidea*** (SAH, *Subarachnoid hemorrhage*). Ocurre cuando hay una rotura de una arteria cerebral por una fuerte constricción que genera vasoespasmo. Puede derivar en ictus hemorrágico y, en el peor de los casos, en la muerte. ROCK presenta un papel importante ya que media en la actividad contráctil de los filamentos actina-miosina por fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y su correspondiente fosfatasa, a la que inhibe. Con **inhibidores de ROCK, se consigue disminuir el espasmo del músculo liso por vasodilatación de vasos cerebrales**<sup>(3)</sup>.
- ***Encefalomiелitis autoinmune experimental*** (EAE, *Experimental Autoimmune encephalomyelitis*). Presenta una clínica similar a la esclerosis múltiple, donde hay una desmielinización axonal provocada por células del sistema inmune (macrófagos y linfocitos Th1). Estas células activan la cascada inflamatoria provocando un daño neuronal y pérdida de la mielina. En estudios realizados con fasudil sobre médula espinal de ratas, se ve una reducción en la liberación de factores proinflamatorios (*TNF $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1b*), en la expresión del interferón-gamma (*IFN- $\gamma$* ) y en la proliferación y migración de las células T. En definitiva, **ROCK está implicada** en la migración y penetración cerebral de células inflamatorias y producción de factores que activan la cascada inflamatoria, **generando un cuadro neuroinflamatorio**<sup>(3)</sup>.

## 2. OBJETIVO

Se pretenden estudiar las funciones fisiológicas desencadenadas por la Rho – quinasa y la vía de transducción de señales en la que se encuentra implicada, haciendo hincapié en su papel en la neurobiología humana. Poder explicar algunas implicaciones que posee la Rho – quinasa en enfermedades neurodegenerativas. Analizar la actividad farmacológica de los inhibidores de la Rho – quinasa (ROCK) como posibles dianas terapéuticas en las mismas.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio consiste mayoritariamente en una revisión bibliográfica, donde se ha recopilado información de publicaciones en inglés y castellano de revistas científico-médicas, y una pequeña parte experimental en la cual se ha llevado a cabo la síntesis del fasudil (esquema 1). Esta búsqueda bibliográfica se ha realizado principalmente en bases de datos como *PubMed*, *Google Scholar*, *National Center of Biotechnology Information*, *SciFinder*, *ScienDirect* y *ResearchGate*. También se ha consultado el libro ‘*Bioquímica. Conceptos generales*’ y para dibujar algunas de las figuras moleculares se ha utilizado el programa *ChemDraw*. Los marcadores de búsqueda empleados más relevantes en las bases de datos son ‘*Rho pathway*’, ‘*Rho kinase*’, ‘*Rho and CNS*’, ‘*ROCK and neurodegenerative disease*’, ‘*ROCK and neurobiology*’, ‘*ROCK inhibitors*’, ‘*Fasudil and analogues*’, ‘*Synthesis of ROCK inhibitors*’ y ‘*chemistry of ROCK inhibitors*’.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudiando la proteína ROCK y sus funciones en la vía de señalización celular, se analizan diferentes moléculas que van a inhibir la función de dicha proteína, con el objeto de visualizarlas como posibles dianas terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas.

### **Rho – quinasa (ROCK) y sus principales funciones.**

Rho participa en una vía de transducción de señales que desembocan en el control y regulación de la forma celular, movilidad, adhesión celular, proliferación, apoptosis, crecimiento y retracción axonal, entre otras<sup>(3)</sup>. Rho – quinasa, o bien conocida como ROCK, es una serina/treonina quinasa y uno de los mayores efectores de RhoA de la cascada de señalización de la familia Rho de proteínas pequeñas GTPasas<sup>(3)(6)</sup>. Se caracterizan dos isoformas de la misma:

**ROCK I (ROK $\beta$ )** y **ROCK II (ROK $\alpha$ )**, con ciertos aspectos comunes pero pequeñas particularidades que les diferencia<sup>(3)</sup> (Figura 2A)<sup>(9)</sup>.

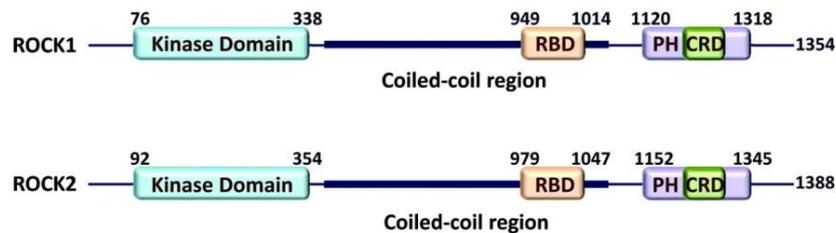


Fig. 2A.– Dominios funcionales de las proteínas ROCK I y ROCK II<sup>(9)</sup>.

ROCK se activa por RhoA, RhoB o RhoC, pero también puede interactuar con otras proteínas, como: *RhoE*, que interacciona con ROCK I inhibiendo su actividad quinasa; *GEM* (proteína de unión a GTP) o *Rad-1*, que conectan respectivamente con ROCK I y ROCK II, ocasionando una inhibición de la fosforilación<sup>(5)</sup>. RhoA, una vez activada, interacciona con otras proteínas de la cascada de señalización estimulándolas. Estos protagonistas intermediarios son proteínas quinasas dependientes de Rho, pertenecientes a la familia de **proteínas quinasas (PK) AGC** (PKA, PKB, PKC y PKG)<sup>(1)(3)(10)</sup>. Ambas se expresan con la composición de 33 axones, aunque la secuencia genética que codifica **ROCK I** presenta su localización génica en el cromosoma 18 y codifica para 1354 aminoácidos, mientras que **ROCK II** la presenta en el cromosoma 2 y codifica para 1388 aminoácidos. Existe un 64% de homogeneidad entre ambas en cuanto a la estructura primaria, es decir, en la secuencia lineal de aminoácidos que conforman la proteína. Entre ambas isoformas, la región que presenta mayor homología corresponde al dominio quinasa con la actividad catalítica, bajo un 92% de semejanza. En contraposición, la fracción proteica con una homología más diversa, del 55%, corresponde a la estructura en espiral (*coiled-coil region*). En cuanto a los dominios funcionales que conforman la proteína, destacan la región *amino terminal* (N-terminal), donde se encuentra la **actividad quinasa**, y la región *carboxílica terminal* (C-terminal), donde recae la actividad de **auto-inhibición funcional**, por la propia proteína. Seguido del dominio quinasa del extremo N-terminal, hay una región anfipática de unos 600 aminoácidos con una conformación en  $\alpha$ -hélice que corresponde con la región en espiral '*coiled-coil*'. En el otro extremo, a continuación del extremo carboxílico, existe un dominio conocido como '*pleckstrin homology*', el cual se encuentra escindido por una región interna rica en cisteína (**CRD**, *Cysteine Rich Domain*). La región donde se permite el contacto con Rho es conocida como el **dominio RBD** (*Rho – Binding Domain*). En la activación enzimática, interacciona con RhoA y RhoC en la región de unión a GTP y se forma un dímero en espiral (Figura 2B)<sup>(11)</sup>. En estudios cristalográficos de estas proteínas se ha visto que varios dominios de la proteína interaccionan y regulan la función de la proteína; unos residuos

aminoácidos cargados en la región helicoidal (*'coiled-coil'*) funcionan como bisagra permitiendo el contacto entre el dominio quinasa del extremo N-terminal con el extremo C-terminal, consiguiendo así la auto-regulación negativa de la función catalítica. Se conoce que la región auto-inhibitoria está en el extremo C-terminal ya que si se suprime esta porción, se activa la proteína tanto *in vivo* como *in vitro*. La activación de Rho – quinasa puede producirse por el mecanismo Rho – dependiente, cuando se une *Rho-GTP* (activa) al dominio *RBD*, o bien, por una vía Rho – independiente, cuando otras proteínas actúan escindiendo la fracción inhibitoria del extremo C-terminal. Este efecto se demuestra con proteínas con actividad apoptótica liberadas por algunas células inmunitarias: linfocitos T citotóxicos (LT CD8+) y las células NK (*Natural Killers*). Están diferenciadas para inducir la muerte celular como respuesta a una señal amenazante procedente del interior celular y segregan proteínas que escinden en el extremo carboxílico de la ROCK, siendo caspasa-3 y granzima-B las que actúan sobre ROCK I y ROCK II, respectivamente<sup>(9)</sup>.

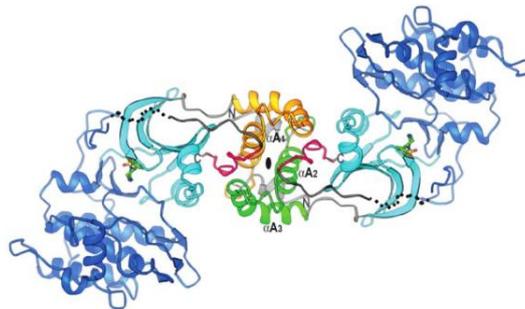


Fig. 2B – Estructura tridimensional del dímero de la proteína ROCK activada<sup>(11)</sup>.

Se ha visto que ROCK se expresa desde la embriogénesis y cada isoforma sigue un patrón de distribución tisular diferente. Así, en hígado, riñón, testículos, sangre, glía y pulmones predomina ROCK I, mientras que ROCK II lo hace en músculo esquelético liso y del miocardio y tejido nervioso<sup>(3)(5)</sup>. A nivel subcelular la distribución es diferente, donde ROCK I, a pesar de no tener muy elucidada su posición intracelular, hay estudios con anticuerpos que la localizan en el citosol. La localización de ROCK II parece conocerse mejor, estando en núcleo y citosol. No obstante, por sobreactivación de RhoA, ROCK puede traslocarse a la membrana plasmática u otras membranas internas<sup>(5)</sup>. Se puede observar una asociación de ROCK II con microfilamentos de actina y, según otros estudios, una acumulación en el surco del anillo contráctil celular formado durante la citocinesis y en los centrosomas (orgánulo desprovisto de membrana formado por dos centriolos dispuestos ortogonalmente que organiza los microtúbulos), entre otros<sup>(9)</sup>. La función de ROCK es fosforilar a otras proteínas que terminan desempeñando una función biológica (Figura 3)<sup>(12)</sup>. Dado la gran similitud en el dominio quinasa de las dos isoformas, tienen sustratos comunes y la reacción se lleva a cabo en regiones de la molécula

diana con una secuencia aminoacídica del tipo: R/KXXS/T ó R/KXS/T (R: Arg, K: Lys, S: Ser, T: Thr, X: cualquier otro)<sup>(9)</sup>.

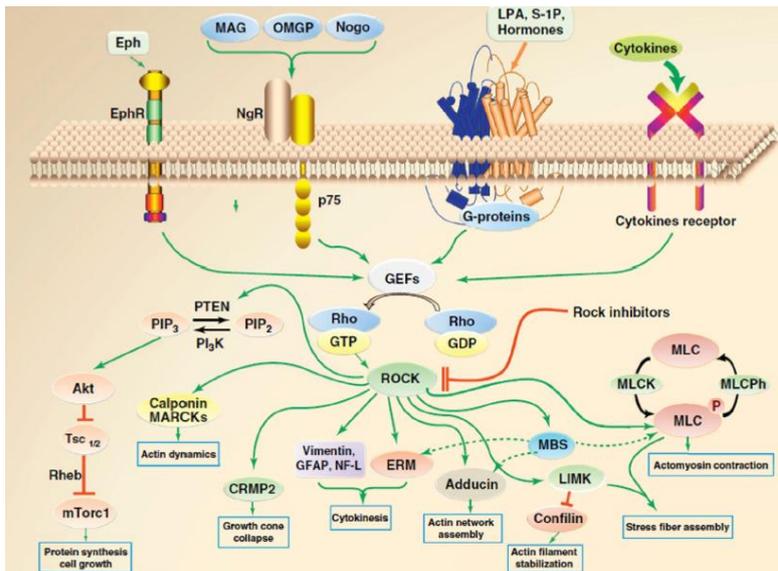


Fig. 3.- Vía de señalización de ROCK<sup>(12)</sup>.

Entre las **funciones** donde ROCK se encuentra implicada por vías de señalización intracelular y las dianas con las que interacciona, podemos destacar:

- La organización de filamentos de actina-miosina del citoesqueleto.** ROCK tiene como una posible diana la cadena ligera de miosina (MLC), a la cual fosforila en Ser-19 y Thr-18, en el mismo punto donde lo hace su quinasa correspondiente (MLCK). Esto permite que se incremente la actividad ATPasa (ATP→ADP) de la miosina y pueda interactuar con actina-F, generando la contracción entre actina-miosina que produce una fuerza contráctil de las fibras musculares y consecuente **vasocontracción**. A este efecto se contribuye de forma indirecta por la fosforilación de ROCK a la fosfatasa de MLC (MLCP, *myosin light chain phosphatase*) en los residuos de Thr-695 y Thr-850, inhibiendo la desfosforilación de MLC, lo que incrementa su periodo de activación. En la misma línea, ROCK fosforila y activa LIM – I y II quinasa (LIMK, *LIM Kinase*) en los residuos Thr-508 y Thr-505 que, consecuentemente, fosforila e inactiva la proteína cofilina. Ésta pertenece a la familia de proteínas que despolimerizan los microfilamentos de actina provocando su desestabilización. Con estos tres puntos de actuación, se consigue un *aumento neto de la fuerza contráctil de las fibras musculares lisas* gracias a la interacción de filamentos de actina-miosina y lleva al ensamblaje de fibras de estrés<sup>(1)(5)(9)</sup>. La activación de esta ruta en las células del músculo liso se consigue por acción de angiotensina II sobre su receptor<sup>(5)</sup>.

- **Migración y adhesión celular.** Tras la activación de Rho/ROCK, las fibras de actina-miosina pueden generar un vínculo con puntos concretos del interior de la membrana plasmática donde existen complejos proteicos dinámicos de quinasas, a los cuales ROCK fosforila; son *puntos focales de adhesión celular*<sup>(9)</sup>. Es un punto importante pues pueden permitir la adhesión de células cancerosas que migran a otros tejidos. En un estudio con el inhibidor de ROCK, **Y-27632** (Fig 7a), se evita la migración de células hepáticas cancerígenas de rata a otros tejidos. Por esto se puede atribuir cierta actividad de ROCK a *migración y adhesión de células cancerígenas*, por lo que su inhibición puede evitarlo<sup>(10)</sup>.

- **Apoptosis y supervivencia celular.** Ante las señales apoptóticas desencadenadas por la caspasa-3 o granzima-B, se va a producir la escisión del dominio autoinhibitorio (C-terminal) de ROCK I y de ROCK II, respectivamente, lo que provoca su activación. Actúa sobre MLC desembocando en fuerza contráctil mediante filamentos de actina-miosina. Esto lleva a la contracción de las células y formación de vesículas membranosas, disgregación de la integridad nuclear, fragmentación del aparato de Golgi, fragmentación de la célula y generación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados posteriormente por células del sistema inmune como macrófagos. Hay que destacar que para que surja esta acción, han de confluír otras señales que induzcan apoptosis (por ejemplo, liberación de citocromo C), ya que la señal individual de la activación de ROCK sería insuficiente. No obstante, en un determinado tipo de células (epiteliales de las vías respiratorias, hepáticas y pancreáticas estrelladas o células del glioma – neoplasia cerebral o de médula ósea –) se ha visto que al inhibir ROCK, se produce la muerte de dicha célula. Por esto, en función de las condiciones externas y propiedades intrínsecas de la célula, puede actuar como un factor pro- o antiapoptótico<sup>(9)</sup>.

- **Inhibición del crecimiento y desarrollo dendrítico.** Se ha observado en varios tipos de células neuronales, que la actividad de la vía RhoA/ROCK altera las dendritas de las neuronas. Estudios en los que se inhibe la ROCK se puede comprobar que hay un progreso en el ensamblaje de las dendritas así como de la red que conforman en las neuronas<sup>(13)</sup>. Moléculas inhibitorias del crecimiento dendrítico como Nogo (A,B,C), glicoproteínas inhibitoras asociadas a mielina (MAG, *myelin-associated glycoprotein*) u otra conocida recientemente como molécula de dirección repulsiva (RGM, *repulsive guidance molecule*), secretadas por células de la glía del entorno neuronal, van a interactuar con receptores celulares y activando la vía RhoA/ROCK. Se desencadena en la mielina el efecto de aumentar la contractilidad de las fibras actina-miosina y, con ello, retracción axonal e inhibición del crecimiento<sup>(5)</sup>. El receptor implicado es un complejo formado por el receptor de Nogo-1 (NgR-1), una proteína asociada llamada LINGO-1 y el

correceptor p75, que se encarga de enviar la señal intracelular. También puede intervenir otro factor en el complejo conocido como TROY. Así, se provoca la *inhibición del crecimiento y expansión del extremo distal de axones y dendritas de las células nerviosas*<sup>(5)(6)</sup>.

### Inhibidores de ROCK.

El primer fármaco desarrollado y aprobado con actividad inhibitoria de Rho – quinasa fue el fasudil, también conocido como HA-1077 o AT877. Fue aprobado en 1995 en Japón para el tratamiento del vasoespasma cerebral, una patología potencialmente peligrosa que puede desencadenar complicaciones como una hemorragia subaracnoidea e, incluso, la muerte. A fecha de hoy, no existen muchas moléculas más con esta acción que hayan sido aprobadas para su uso humano, aunque muchas se encuentran en estudio y en etapas avanzadas de ensayos clínicos<sup>(10)</sup>.

Las moléculas estudiadas que han demostrado tener actividad frente a la ROCK, pueden clasificarse en función de la estructura química de la que derivan. Aquéllas que han sido más objeto de estudio, son derivados de *isoquinolinas* o *aminopiridinas*. No obstante, hay otros desarrollados a posteriori que presentan un esqueleto *indazol*, *pirimidina*, *pirrolopiridina*, *pirazol*, *benzimidazol*, *benzotiazol*, *benzatiofeno*, *benzamida*, *aminofurazan* o *quinazolininas*, o bien, *boro derivados*<sup>(5)</sup>.

Las moléculas como **HA-1077** ó **fasudil** (Fig. 5a), **Y-27632** (Fig. 7a) y **H-1152P** (Fig. 7c) van a **interaccionar con la región de unión del ATP**, compitiendo con éste. Es un sitio altamente conservado en el dominio catalítico de las proteínas quinasas; esto significa que presentan una secuencia aminoacídica muy similar, por lo tanto, las interacciones químicas con las moléculas que actúen en ese punto están igualmente conservadas. La región que presenta la actividad quinasa es diferente en los dominios catalíticos de las diferentes quinasas, siendo más semejante entre aquéllas de la misma familia. Por este motivo, los inhibidores de ROCK van a presentar afinidad también por otras quinasas, pudiéndose unir a la región de unión del ATP con mayor o menor potencia<sup>(10)</sup>. La situación ideal sería contar con inhibidores de ROCK selectivos por la isoforma II, ya que es la predominante en SNC. Hasta la fecha, parece que sólo existe un

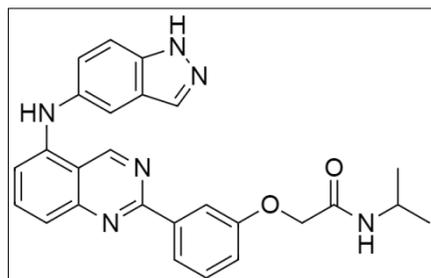


Fig. 4. – KD025 (SLx-2119). 2-[3-[4-(1H-indazol-5-aminoil)quinazolin-2-il]fenoxi]-N-propanoil-2-acetamide<sup>(14)</sup>.

inhibidor de ROCK altamente selectivo por la ROCK II: **KD025 (SLx-2119)** (Fig. 4). Es un derivado del esqueleto aminoindazolequinazolina y presenta hasta cien veces más selectividad por la isoforma II de ROCK ( $K_i = 41 \text{ nM}$ ) y el valor referido a potencia inhibitoria de  $IC_{50} = 60 \text{ nM}$ <sup>(5)</sup>.

Mediante estudios con la técnica de *docking*, se puede ver cómo podría interactuar la molécula con los residuos aminoacídicos que componen la proteína. Así, en la Fig. 5A, tanto en 2D como en 3D, se representan las interacciones ejercidas entre los residuos del sitio de unión en ROCK II con el inhibidor fasudil. Existen dos tipos de interacciones que son las principales responsables de las fuerzas de unión: enlace de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas o apolares. En este caso, el *nitrógeno del anillo isoquinoleínico del fasudil* interacciona con su *par de electrones libre con Met172*, generando un enlace de hidrógeno. Por otro lado, hay *interacciones hidrofóbicas* del tipo Van der Waals con los residuos *Ile98, Val106, Ala119, Met169, Met172, Leu221* y *Phe384*<sup>(14)</sup>.

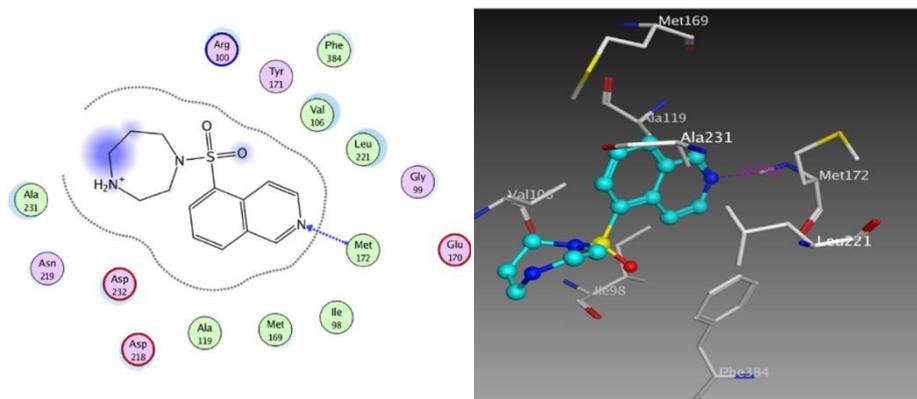


Fig. 5A. - Interacciones de Fasudil con los residuos de ROCK II en 2D y 3D<sup>(14)</sup>.

Hay estudios con *docking* donde se comparan las interacciones entre diferentes moléculas con el sitio activo de la diana; así, se puede comprobar el grado de selectividad hacia la proteína, así como la fuerza de unión (potencia) de una respecto a otra. En la Fig. 5B se muestra el *docking* en 2D donde se comparan las interacciones entre el compuesto más activo (a) y el menos activo (b) sobre ROCK II. En el compuesto 'a' se establecen **siete interacciones hidrofóbicas** (*Ile98, Val106, Ala119, Met169, Met172, Leu221* y *Ala231*) respecto a tres en el 'b'. Estas interacciones, salvo *Ala231*, también se observan con fasudil, descrito anteriormente. Ambos compuestos (a y b) forman un **enlace de hidrógeno** con la *Lys121* en la región catalítica que es **importante para la actividad**. La razón por la cual 'a' es más activo que 'b' radica en un enlace de hidrógeno adicional entre el grupo amino y Glu170<sup>(14)</sup>.

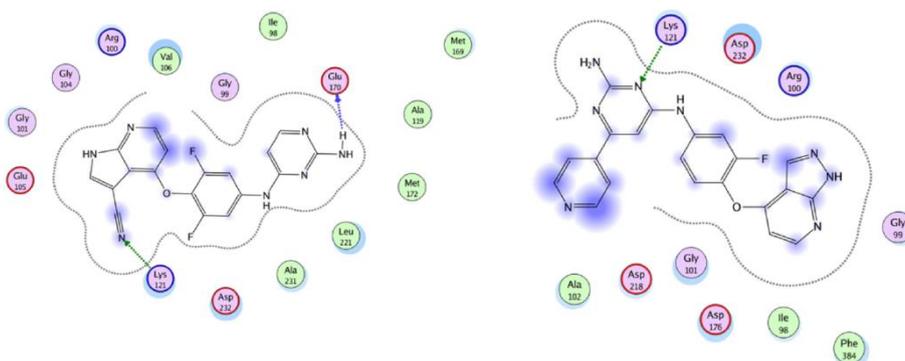


Fig. 5B.- Interacción con ROCK II del compuesto más activo (a) y el menos activo (b)<sup>(14)</sup>.

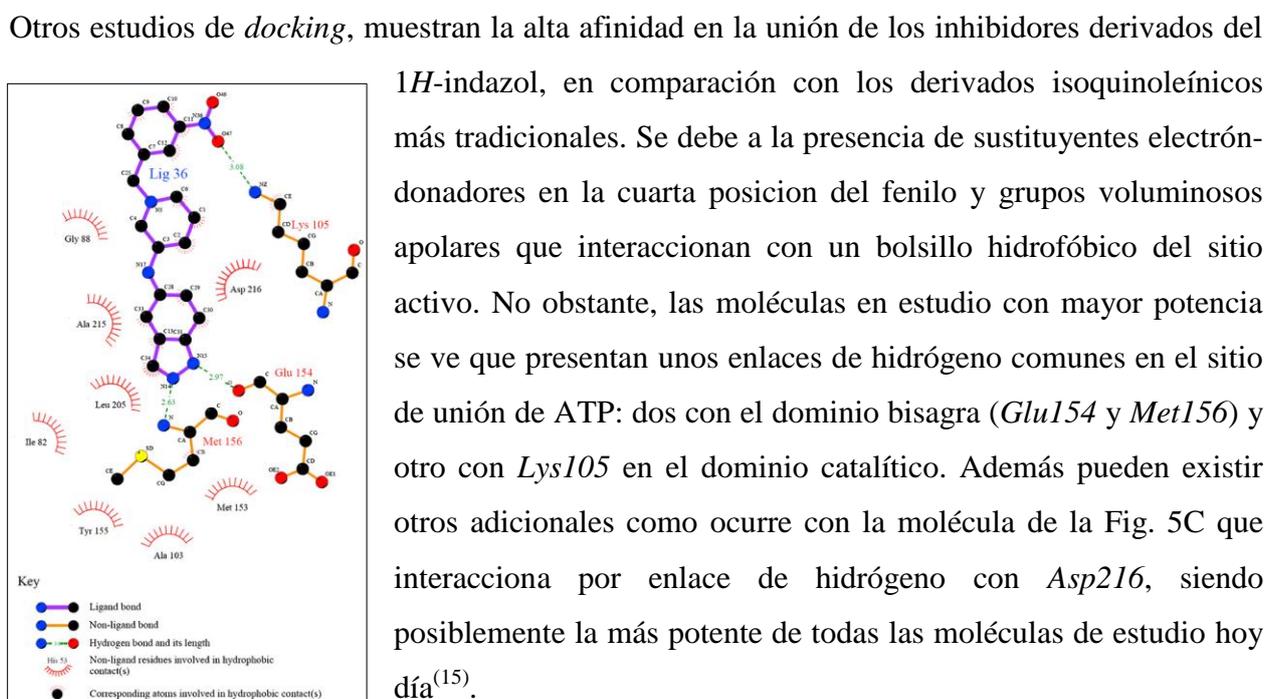


Fig. 5C.- Interacción con el sitio de unión de ATP de la ROCK y la molécula derivado del 1*H*-indazol usando el programa LIGPLOT<sup>(15)</sup>.

El derivado de la isoquinolina, **fasudil** (HA-1077, hexahidro-1-(5-isoquinolilsulfonil)-1*H*-1,4-diazepina)<sup>(3)</sup> (Fig. 6A.a), es el primer inhibidor de la ROCK ( $IC_{50} = 0,158 \mu M^{(3)}$ ) comercializado cuya indicación es el tratamiento del vasoespasmio por producir una relajación de las células del músculo liso. Esta relajación es una consecuencia de la no activación de MLCK al producirse la inhibición de su fosforilación por ROCK. *In vivo*, también es capaz de inhibir en menor grado otras proteínas – quinasas, como PKA, PKC, PKG o MLCK<sup>(10)</sup> con valores de  $K_i$  ( $\mu M$ ) de 1,6; 1,6; 3,6 y 36 respectivamente<sup>(5)</sup>. Existen varias referencias en las que se muestra que el fasudil muestra también actividad inhibitoria sobre otras quinasas como MSK1, PRK2 y S6K1, lo que indica que carece de exclusiva selectividad por ROCK<sup>(10)</sup>. No obstante, con un valor de  $K_i = 0,33 \mu M$ , se considera una actividad más potente hacia la Rho - quinasa que por las anteriores<sup>(5)</sup>; cabe destacar que no selecciona entre ambas isoformas de la misma<sup>(3)</sup>. En la Fig. 6B se muestra de forma gráfica con la selectividad y potencia de algunos inhibidores sobre diferentes quinasas<sup>(16)</sup>. Su estructura química consta de un anillo de isoquinoleína y un anillo de homopiperazina, unidos por un grupo sulfonilo que actúa de puente. Se considera que, *in vivo*, el metabolismo que sufre la molécula es a nivel hepático.

Un metabolito activo de este HA-1077 es el **hidroxifasudil** (Fig 6A.b), que actúa sobre ROCK con un valor de  $K_i = 0,17 \mu M$  y se considera ligeramente más potente que su precursor. Aun así,

no tiene alta selectividad por ROCK, sino que inhibe otras quinasas, como PKC y MLCK con valores de  $K_i = 18$  y  $140 \mu\text{M}^{(5)}$ .

Se han realizado ciertas modificaciones sobre el esqueleto de HA-1077, dando lugar a otros inhibidores más potentes como el **dimetilfasudil** (Fig 6A.c), que permite una inhibición correcta de la proteína diana con concentraciones del orden de nanomolar ( $K_i = 1,6 \text{ nM}^{(5)}$ ;  $\text{IC}_{50} = 12 \text{ nM}$  para ROCK II<sup>(3)</sup>). El **ripasudil** (Fig. 6A.d) es otro derivado que, con valores de  $\text{IC}_{50} = 51 \text{ nM}$  para ROCK I y  $19 \text{ nM}$  para ROCK II, ha sido aprobado recientemente en Japón para el tratamiento del glaucoma<sup>(5)</sup>.

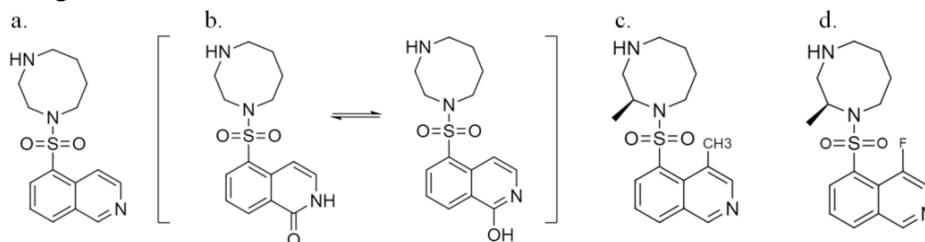


Fig. 6A.– a. Fasudil (HA-1077), b. Hidroxifasudil, c. Dimetilfasudil (H-1152P) y d. Ripasudil<sup>(5)</sup>.

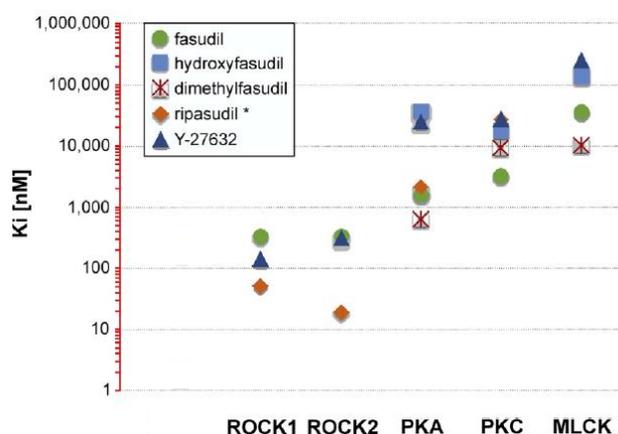
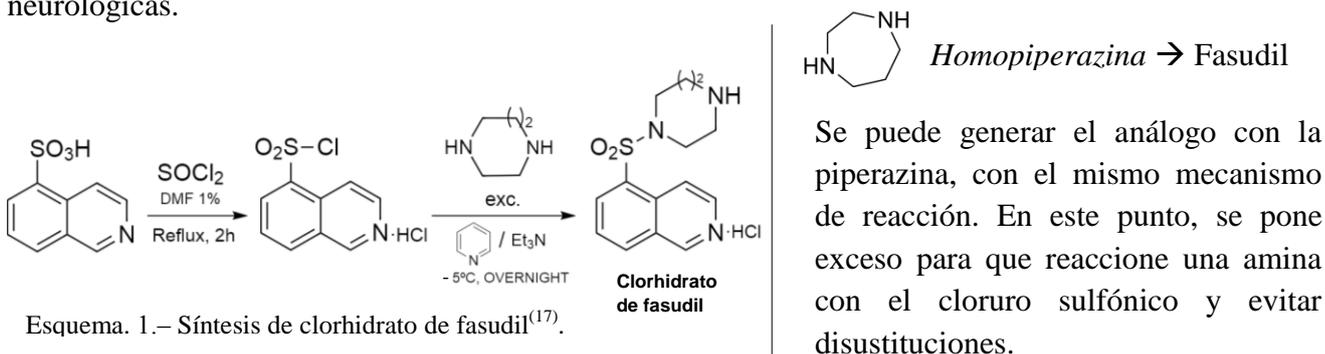


Fig. 6B.– Selectividad y potencia de inhibidores de ROCK sobre diferentes quinasas<sup>(16)</sup>.

La síntesis del clorhidrato de fasudil se indica en el esquema 1<sup>(17)</sup>. Se representa el esquema que se ha tenido en cuenta para su síntesis de forma experimental. Cabe destacar que la amina secundaria es susceptible de formar enlace con otras estructuras para generar compuestos con actividad multidiana, los cuales se están diseñando con el fin de ser útiles en tratar alteraciones neurológicas.



A pesar de las diferencias, tanto fasudil como hidroxifasudil presentan una alta velocidad de metabolización, débil lipofilia y, con ello, baja aptitud para penetrar la barrera hematoencefálica (BHE). Para intentar subsanar esos puntos críticos, se han realizado cambios estructurales en la molécula que han permitido el desarrollo de profármacos (Fig. 7A). Todos ellos se convertirán en el hidroxifasudil, gracias al efecto aceptor de electrones del nitrógeno isoquinolínico y a la conjugación con la sulfonamida a través del anillo aromático. Otras estrategias para mejorar la estabilidad y poder vehiculizar fácilmente la molécula *in vivo* son la formulación en forma liposomal o la administración por inyección mielínica<sup>(3)</sup>.

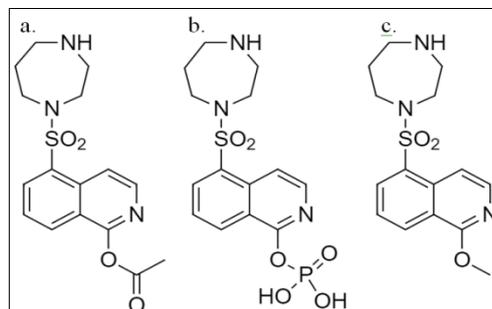


Fig. 7A.- a. Hidroxifasudil acetato, b. Hidroxifasudil fosfato, c. 1- metoxifasudil. El compuesto c es el de mayor estabilidad<sup>(12)</sup>.

A partir del fasudil, se han preparado otros derivados por modificación de su estructura, con los que se han realizado estudios de su capacidad inhibitoria, afinidad y selectividad. En el **anillo de homopiperazina** se añadieron grupos metilo, observándose que en la posición 2 se conseguía mayor actividad y selectividad que con el fasudil (H-1152P). En cambio, las metilaciones en 3, 5 y 6 ocasionaban uniones más débiles con la proteína. Al acetilar el grupo amino de este anillo en la molécula H-1152P, se ha visto que se pierde la actividad, ya que este grupo permite la formación de un enlace de hidrógeno importante con la enzima. Al introducir grupos en la posición 4 en el **anillo de isoquinolina**, la actividad varía: con un metilo (H-1152P) se consigue más actividad inhibitoria que con el fasudil; con un cloro o flúor también se favorece la interacción con el sitio activo, pero a medida que aumenta el tamaño del halógeno va disminuyendo su fuerza de unión a la diana; con un grupo etil cianoacrilato (Fig. 7B) se reduce la actividad y con el grupo vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>) aumenta mucho la potencia y especificidad. Si se sustituye el puente sulfonilo por su isómero carbonilo, se pierde actividad sobre ROCK, por lo que se supone este grupo es esencial en la inhibición. La introducción de péptidos ricos en D-arginina en un análogo abierto de piperazina (Fig. 7C), da lugar a compuestos más selectivos por la ROCK II<sup>(3)</sup>.

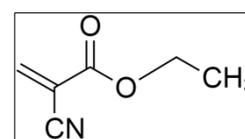


Fig. 7B. – Etilcianoacrilato

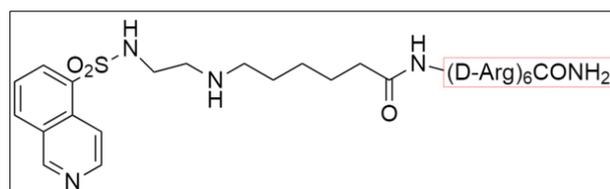
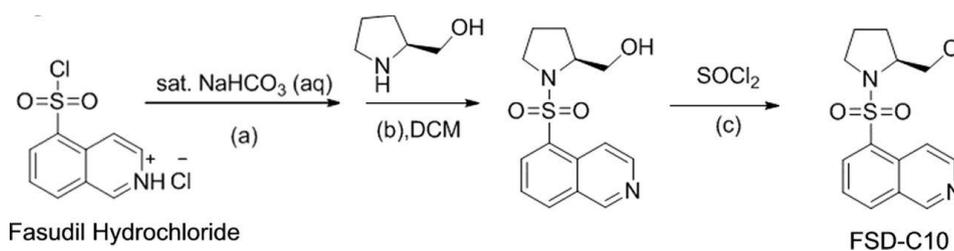


Fig. 7C.- N-(2-aminoetil)-5-isoquinolinsulfonamida con péptido rico en Arg<sup>(3)</sup>.

Estudios con fasudil y uno de sus derivados, conocido como **FSD-C10** (esquema 2), han demostrado que inducen la expresión de tres factores neurotróficos: *BDNF*, *GDNF* y *NT-3*, que crean un microambiente en el entorno útil para la reparación y regeneración neuronal, marcado por la supervivencia, diferenciación, plasticidad dendrítica y crecimiento axonal. El crecimiento neuronal no consiste únicamente en la expansión y proliferación, sino también en la plasticidad neuronal; existen factores miélinicos que inhiben el crecimiento y otros que lo facilitan. Estudios con ratones modificados genéticamente para que haya una expresión mínima de *BDNF* se comprueba que los ratones fallecen en pocas semanas con dicho déficit. En aquel grupo de ratones heterocigóticos, donde la expresión se reduce al 50%, se atribuye la deficiencia a la hiperfagia, obesidad, agresividad e hiperactividad. El factor *NT-3* está concretamente especializado en la proliferación del precursor de oligodendrocitos, reducción de astrogliosis y remielinización, lo que hace tener especial interés en enfermedades como la EAE o EM. Fasudil y FSD-C10, producen por igual efectos terapéuticos en ratones con estas enfermedades con el crecimiento axonal y dendrítico, así como la remielinización y neurprotección. En este estudio, tras administrar 800  $\mu\text{g}$  de fasudil y FSD-C10 a dos grupos de ratones (a y b) respectivamente, al cabo de 30 y 60 minutos de la inyección, se aprecia un menor enrojecimiento en las patas del grupo 'b', que se traduce como un menor efecto vasodilatador; este efecto toma un segundo plano cuando se focaliza en la regeneración axonal, que es el efecto primordialmente deseado en esta situación. Del mismo modo, el porcentaje de mortalidad dosis dependiente en el grupo 'a' se hace cada vez más relevante al incrementarla, siendo nula en el grupo 'b'. Este estudio confirma una mayor seguridad y tolerancia *in vivo* de FSD-C10 en los estudios pre-clínicos frente a fasudil<sup>(18)</sup>.



Esquema 2.- Síntesis de FSD-C10 a partir de un intermedio de la síntesis de clorhidrato de fasudil<sup>(12)</sup>.

Entre otras posibles indicaciones terapéuticas del fasudil, se ha estudiado junto con el ozagrel, un inhibidor de la tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) sintasa, para **mejorar el flujo de sangre cerebral en un foco isquémico**, inducido por oclusión de la arteria cerebral media del ratón. La combinación de un inhibidor de ROCK, que consigue una mayor regeneración neuronal y vasodilatación, junto con un inhibidor de la agregación plaquetaria puede llegar a producir dicho efecto. Con dosis

que, individualmente no son efectivas (**3 mg/Kg** de fasudil junto con **10 mg/Kg** de ozagrel) se alcanza un efecto terapéutico más rápido, a los 5 minutos tras administración. También, se consigue un incremento de la producción de NO, pues se inhibe la vía Rho/ROCK que regula negativamente a la vía PI<sub>3</sub> - quinasa/Akt la que, a su vez, activa la expresión de eNOS. Además, de forma indirecta, ozagrel también incrementa la producción de NO, aunque su mecanismo aún no está del todo clarificado<sup>(3)(19)</sup>.

**Y-27632** (Fig. 8a) es una molécula inhibidora la ROCK y se desarrolló posteriormente al fasudil. Pertenece al grupo de las 4-aminopiridinas y presenta unas 200 veces más selectividad por ROCK que por otras quinasas (PKC, PKA, S6K1, MSK1 o MLCK) respecto al fasudil, con valores de Ki = 140 y 300 nM para ROCK I y ROCK II respectivamente<sup>(5)(20)</sup>. Se considera más potente que el fasudil (IC<sub>50</sub> = 800 nM) ya que su IC<sub>50</sub> es 1900 nM<sup>(20)</sup>. Este fármaco es uno de los que más se ha utilizado en los estudios de investigación y se han observado efectos favorables en enfermedades neurodegenerativas sobre animales de experimentación (*in vivo*), aún con predicciones de tener baja capacidad de atravesar BHE<sup>(5)</sup>. Al igual que ocurre con fasudil, disminuye la pérdida de motoneuronas en los estudios donde se emplean estas moléculas, presentándose como un candidato para tratar enfermedades como EM o EAE que conllevan la pérdida de motoneuronas y sus axones, debilidad muscular e incluso la muerte por un episodio final de fallo respiratorio<sup>(20)</sup>. A partir de este compuesto surgen **Y-32885** (Fig. 8b) e **Y-39983** (Fig. 8c); más potentes aún e involucrados en la estabilización del crecimiento del cono axonal y en promover la regeneración del nervio óptico dañado<sup>(5)</sup>. La molécula Y-39983 específicamente se ha ensayado para tratar el glaucoma<sup>(3)</sup>.

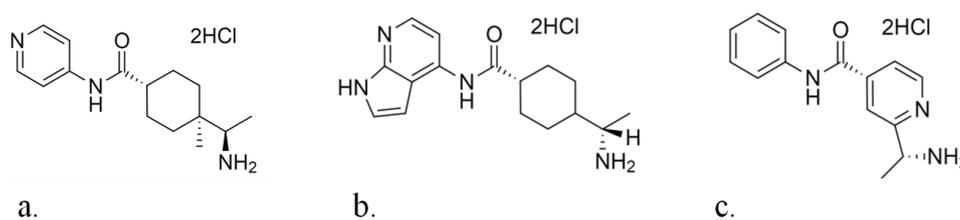


Fig. 8.- a. Y-27632<sup>(6)</sup>; b. Y-39983<sup>(6)</sup>; c. Y-32885<sup>(21)</sup>.

Recientemente se ha estudiado otro inhibidor de ROCK, **FPND** (Fig. 9). Una molécula que presenta actividad a concentraciones del orden de micromolar y con una alta selectividad frente a ROCK I. En estudios de *docking* se ha observado que con ROCK I existen interacciones apolares por fuerzas de Van der Waals mayoritariamente con los residuos enzimáticos de dicha isoforma (*Ile 82, Arg84, Gly85, Gly88, Val90, Ala103, Lys105, Leu107, Met153 y Met156*), en

comparación con ROCK II, donde apenas existen. Se ha comprobado en animales de experimentación que es un fármaco mucho más seguro, ya que sus datos de LD<sub>50</sub> (*Letal Dose 50*) son muy superiores a 5 mg/Kg y 0.5 mg/Kg por vía oral e intravenosa, respectivamente. Comparándolo con H-1152P, se vio que tenía efectos mucho más potentes y beneficiosos para las hemorragias cerebrales inducidas por consumo de estatinas. Se ha visto que el consumo de estos fármacos afecta a las interacciones entre las células, provocando que colapsen y no se mantenga la integridad estructural. Debido al mecanismo de inhibición de ROCK I, se ve afectado la estructura del citoesqueleto de las células, lo que permite una mejor plasticidad y una mejora en las uniones célula-célula de las células endoteliales. Por esta razón, este fármaco se considera neuroprotector en estas condiciones, siendo más potente que cualquiera de los anteriores mencionado<sup>(22)</sup>.

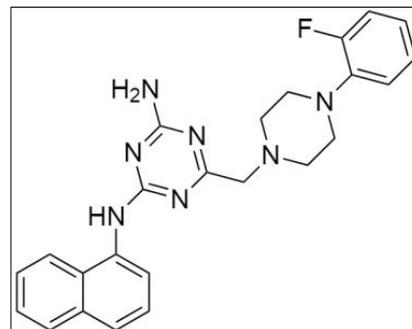


Fig. 9.- FPND<sup>(20)</sup>

## 5. CONCLUSIÓN

La vía de Rho/ROCK se encuentra implicada en numerosas funciones fisiológicas, entre las que se encuentra la organización de filamentos de actina, apoptosis o supervivencia celular. En el sistema nervioso, Rho – quinasa se encuentra en las células nerviosas, glia y microglia y presenta efectos inhibitorios del crecimiento axonal y dendrítico. Además, también contribuyen al efecto pro-inflamatorio por inducción en la liberación de citoquinas proinflamatorias. Estas circunstancias agravan la situación de las células del SNC, por lo que contribuyen a ocasionar problemas neurodegenerativos por alteraciones funcionales. Contando con otros muchos procesos en los que está implicada, se puede decir que ROCK es una buena diana terapéutica para tratar enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, EAE o EM, así como para ejercer neuroprotección ante cuadros de ictus hemorrágicos o isquémicos. Los resultados esperanzadores en estudios *in vitro* y con animales de experimentación, animan al desarrollo de fármacos inhibidores de ROCK, que sean más selectivos por la isoforma ROCK II, ya que predomina en el cerebro, con objeto de poder llegar a ser tratamientos coadyuvantes para circunstancias de neurodegeneración.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Jalil J, Lavandero S, Chiong M. 'La vía de señalización Rho/Rho-cinasa en la enfermedad y el remodelado cardiovascular'. Rev Esp Cardiol. **2005**. 58(8):951-61.
2. Feduchi Canosa E, Blasco Castiñeyra I, Romero Magdalena C, Yáñez Conde E. 'Bioquímica: Conceptos Esenciales'. 2ª. Madrid. Panamericana; **2015**. 478 págs.
3. Chen M, Liu A, Ouyang Y, Huang Y, Chao X, Pi R. 'Fasudil and its analogs: a new powerful weapon in the long war against central nervous system disorders?' Expert Opinion on Investigational Drugs. **2013**; 22(4):537-50.
4. Mulloy JC, Cancelas JA, Filippi M-D, Kalfa TA, Guo F, Zheng Y. 'Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies'. Blood. **2010**; 115(5):936-47.
5. Koch JC, Tatenhorst L, Roser A-E, Saal K-A, Tönges L, Lingor P. 'ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation'. Pharmacology & Therapeutics. **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.008>
6. Kubo T. 'The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders'. Therapeutics and Clinical Risk Management. **2008**; Vol. 4:605-15.
7. Brot S, Auger C, Bentata R, Rogemond V, Ménigoz S, Chounlamountri N, et al. 'Collapsin Response Mediator Protein 5 (CRMP5) Induces Mitophagy, Thereby Regulating Mitochondrion Numbers in Dendrites'. Journal of Biological Chemistry. **2014**; 289(4):2261-76.
8. Borrajo A, Rodriguez-Perez AI, Villar-Cheda B, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 'Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death'. Neuropharmacology. **2014**; 85:1-8.
9. Julian L, Olson MF. 'Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions'. Small GTPases. **2014**; 5(2):e29846.
10. Breitenlechner C, Gaßel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, et al. 'Protein Kinase A in Complex with Rho-Kinase Inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P'. Structure. **2003**; 11(12):1595-607.
11. Yamaguchi H, Kasa M, Amano M, Kaibuchi K, Hakoshima T. 'Molecular Mechanism for the Regulation of Rho-Kinase by Dimerization and Its Inhibition by Fasudil'. Structure. **2006**; 14(3):589-600.
12. Li Y, Liu N, Luo H, Yuan Y, Xing Y, Chen L. 'Synthesis and Stability of Hydroxyfasudil Derivatives as Prodrugs'. Transactions of Tianjin University. enero de **2017**; 23(1):87-92.
13. Bobo-Jiménez V, Delgado-Esteban M, Angibaud J, Sánchez-Morán I, de la Fuente A, Yajeya J, et al. 'APC/C<sup>Cdh1</sup>-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory. Proceedings of the National Academy of Sciences'. **2017**; 114(17):4513-8.
14. Cai C, Wu Q, Luo Y, Ma H, Shen J, Zhang Y, et al. 'In silico prediction of ROCK II inhibitors by different classification approaches'. Molecular Diversity. **2017**; 21(4):791-807.

15. Qin J, Lei B, Xi L, Liu H, Yao X. '*Molecular modeling studies of Rho kinase inhibitors using molecular docking and 3D-QSAR analysis*'. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2010**; 45(7):2768-76.
16. Koch JC, Tatenhorst L, Roser A-E, Saal K-A, Tönges L, Lingor P. '*ROCK inhibition in models of neurodegeneration and its potential for clinical translation*'. *Pharmacology & Therapeutics*. [Internet] **2018** [citado 20 de mayo de 2018]. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725818300561>
17. YAO Jian-wen, WANG Cheng-peng, ZHANG Xiu-juan, XU Wen-fang. '*Synthesis of fasudil hydrochloride*'. *Qilu Yaoshi*. **2012**; 31(8):438-9.
18. Xin Y-L, Yu J-Z, Yang X-W, Liu C-Y, Li Y-H, Feng L, et al. '*FSD-C10: A more promising novel ROCK inhibitor than Fasudil for treatment of CNS autoimmunity*'. *Bioscience Reports*. **2015**; 35(5): e00247.
19. Koumura A, Hamanaka J, Kawasaki K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, et al. '*Fasudil and Ozagrel in Combination Show Neuroprotective Effects on Cerebral Infarction after Murine Middle Cerebral Artery Occlusion*'. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2011**; 338(1):337-44.
20. Günther R, Saal K-A, Suhr M, Scheer D, Koch JC, Bähr M, et al. '*The rho kinase inhibitor Y-27632 improves motor performance in male SOD1G93A mice*'. *Frontiers in Neuroscience*. **2014**; 8:304.
21. Logé C, Wallez V, Scalbert E, Cario-Tourmaniantz C, Loirand G, Pacaud P, et al. '*Rho-kinase Inhibitors: Pharmacomodulations on the Lead Compound Y-32885*'. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **2002**; 17(6):381-90.
22. Li S, Ai N, Shen M, Dang Y, Chong C-M, Pan P, et al. '*Discovery of a ROCK inhibitor, FPND, which prevents cerebral hemorrhage through maintaining vascular integrity by interference with VE-cadherin*'. *Cell Death Discovery*. **2017**; 3:17051.