



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO: Fármacos Neuroprotectores para el  
Tratamiento de Enfermedades  
Neurodegenerativas: Inhibidores de Rho-quinasa**

Autor: Laura Hernández Jiménez

Tutor: Pilar López-Alvarado Gutiérrez

Convocatoria: Junio

# ÍNDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	4
OBJETIVOS.....	8
METODOLOGÍA.....	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
Inhibidores basados en la isoquinolina.....	9
Inhibidores derivados de 4-aminopiridina.....	12
Otros inhibidores.....	13
Nuevas perspectivas.....	16
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	17

## 1. Resumen

Actualmente, las enfermedades neurodegenerativas son un problema de salud mundial que tiene que ser abordado por motivos humanos, sociales y económicos. Son enfermedades que están ligadas a la edad, por lo que se espera un aumento exponencial en un futuro próximo de las mismas debido a la mayor esperanza de vida que tiene la población. Entre las principales enfermedades neurodegenerativas se encuentran la Enfermedad de Alzheimer (400 casos por 100.000 habitantes) y la Enfermedad de Parkinson (315 casos por 100.000 habitantes) que cuentan con la mayor parte de casos detectados en el mundo, estando éstas estrechamente relacionadas con la edad.

Existen otras enfermedades, como la ELA (2-5 casos por cada 100.000 habitantes) o las enfermedades neuromusculares (28 casos por cada 100.000 habitantes) que, a pesar de su baja prevalencia a nivel mundial por su alta tasa de mortalidad a corto plazo tras el diagnóstico, también son un objetivo en la investigación de nuevos tratamientos. [1]

Hoy por hoy no existe ningún tratamiento que cure estas enfermedades. Los fármacos existentes únicamente reducen la sintomatología clínica del paciente mejorando su calidad de vida un determinado periodo de tiempo aunque la pérdida neuronal sigue su curso. Un tratamiento eficaz sería aquel que parase totalmente la muerte neuronal o que consiguiese retrasarla considerablemente para disminuir la pérdida de neuronas y frenar la enfermedad. Por todo ello, se continúa con la investigación de nuevos fármacos dirigidos frente a nuevas dianas.

Las Rho-quinazas son unos moduladores bioquímicos que participan en múltiples procesos biológicos, por lo que sus inhibidores tienen relevancia en muy variadas aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, el inconveniente que presentan es su uso limitado debido a la presencia de efectos adversos.

Las primeras indicaciones consideradas de estos inhibidores fueron las enfermedades cardiovasculares, ya que producen un rápido y pronunciado descenso de la presión arterial. Posteriormente, se usaron en el campo de la oftalmología para el tratamiento del glaucoma por su administración por vía tópica. Ripasudil fue el fármaco aprobado para el tratamiento de esta patología mientras que se sigue investigando acerca de otros inhibidores de esta enzima. [2]

## 2. Introducción y antecedentes

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades que abarcan diversas patologías que causan la muerte progresiva de las neuronas y pérdida sináptica en distintas regiones del sistema nervioso, quedando así afectado. También tienen en común procesos de neuroinflamación, déficit en diversos sistemas de neurotransmisores y modificaciones postraslacionales en distintas proteínas que dan lugar a un plegamiento anómalo o a su agregación. Todo esto da lugar a los síntomas y signos característicos de cada una de ellas. Su etiología es desconocida, siendo el principal factor de riesgo la edad.

Son enfermedades que aparecen en edades más avanzadas, generalmente a partir de los 65 años. La mayoría de este tipo de enfermedades son de presentación esporádica y la aportación del componente hereditario es mínimo, siendo inferior al 10%, aunque en algunas de estas sí que existe componente genético, como por ejemplo la parapesia espática familiar o el corea de Huntington. Estas enfermedades son incurables y debilitantes, produciendo la degeneración progresiva y/o la muerte de las neuronas dando lugar a problemas con el movimiento (ataxias) o con el funcionamiento mental (demencias). Estas últimas son las causantes de la mayor carga de la enfermedad. [3]

Según un estudio realizado por la organización española Neuroalianza, las principales enfermedades neurodegenerativas son: [4]

- **Enfermedad de Alzheimer:** Está considerada como la primera causa de demencia en el mundo. Esta patología afecta a más de 500.000 personas en España. Es una enfermedad que afecta fundamentalmente a personas mayores de 65 años y está caracterizada por una pérdida progresiva de la memoria y deterioro cognitivo asociado a una disminución de las neuronas colinérgicas. Su síntoma principal es la pérdida de memoria. También cuenta con alteración del lenguaje, desorientación espacial y temporal... En sus estadios finales, la persona se vuelve dependiente. No hay todavía un tratamiento capaz de frenar la enfermedad. Los fármacos existentes ayudan a impedir que los síntomas empeoren durante un tiempo limitado. [5]
- **Enfermedad de Parkinson:** Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, afectando a más de 80.000 pacientes en España. Generalmente afecta a personas mayores de 65 años. Se caracteriza por una muerte selectiva de

neuronas implicadas en la producción de dopamina que se encuentran en los ganglios basales. Este neurotransmisor interviene en la regulación de los movimientos, por lo que un déficit en el mismo da lugar a síntomas como temblor, rigidez o lentitud en los movimientos. Las causas de esta enfermedad son desconocidas, aunque se cree que afectan tanto factores ambientales como genéticos. [6]

- **Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA):** Patología que afecta generalmente a personas entre 40 y 60 años cuyo tiempo de vida estimado tras el diagnóstico es de 5 años. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas localizadas en el asta ventral de la médula espinal y las neuronas corticales dando lugar a una pérdida progresiva sobre el control de los músculos del cuerpo que se debilitan y acaban atrofiándose. Generalmente, la función cognitiva no se ve afectada de manera significativa salvo en un 5 % de los pacientes que desarrollan demencia frontotemporal. [7] Sus causas son desconocidas y no existe cura. Los tratamientos existentes se usan para aliviar la sintomatología y en algunas ocasiones, para prolongar la supervivencia. [8]

Entre los procesos patológicos que pueden originar la pérdida progresiva de las neuronas, se encuentran el daño que provoca la inflamación, el estrés oxidativo, agentes neurotóxicos, agregación proteica y el déficit de neurotransmisores.

Las estrategias para el descubrimiento de fármacos eficaces para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas se basan en la búsqueda de dianas terapéuticas implicadas en las patologías moleculares. Estas dianas pueden ser factores secretados, receptores de superficie celular o vías de señalización intracelular.

Se ha visto recientemente que determinadas proteínas quinasas se encuentran sobreactivadas e implicadas en la fosforilación y posterior agregación proteica de distintas enfermedades neurodegenerativas. [9]

Las quinasas son unas proteínas específicas de Ser, Thr o Tyr, es decir, son las encargadas de fosforilar estos aminoácidos en las proteínas sustrato, lo que consiste en transferir grupos fosfato desde el ATP a un sustrato específico. La estructura general de estas enzimas cuenta con una región N-terminal y C-terminal unidas por una región

bisagra donde se sitúa el sitio catalítico. Debido a la conservación del sitio catalítico, es importante buscar compuestos selectivos para evitar en la medida de lo posible los efectos adversos. Los inhibidores de estas enzimas suelen ser moléculas pequeñas, de bajo peso molecular y, generalmente, de naturaleza heterocíclica. [10]

Dentro de estas enzimas se encuentra la Rho quinasa, que pertenece a la familia AGC de Serina/Treonina. Presenta dos isoformas altamente homólogas, ROCK1 y ROCK2, que son proteínas que contienen una Ser / Thr en el dominio N-terminal, que es un dominio quinasa, seguido de una estructura de espiral que contiene un sitio de unión a Rho, un dominio de homología pleckstrin y una región rica en cisteína en el C-terminal. Estas isoformas están muy conservadas y comparten un 65% de su identidad general y un 87% en su dominio quinasa en humanos. Todo esto dificulta el diseño de inhibidores selectivos de las dos isoformas. [2]

Rho es una pequeña GTPasa que puede ser activada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). RhoA se une posteriormente a GTP y este complejo activa ROCK uniéndose a su dominio de espiral enrollado  $\alpha$ -helicoidal. La ROCK activada fosforila distintos sustratos. [11]

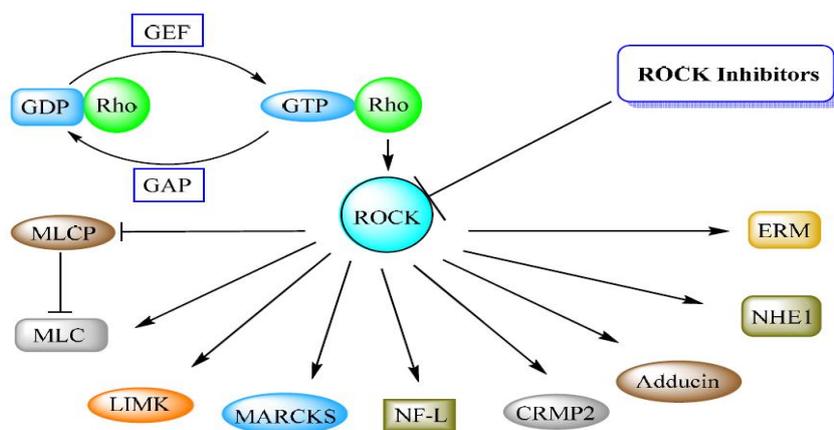


Figure 2. ROCK signaling pathways

La vía de señalización de Rho / ROCK puede **activarse** por diversos receptores de membrana activados, tales como receptores acoplados a proteína G, receptores de tirosina quinasa y receptores intracelulares. Existen al menos tres factores **inhibidores** asociados a la mielina en el sistema nervioso central, la glicoproteína asociada a la mielina, la glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos y Nogo. Estos factores inhibidores se unen a receptores de membrana como el receptor Nogo, el receptor

Lingo-1 y p75, activando así a las GTPasas intracelulares, que incluyen la cascada Rho / ROCK. Normalmente, ROCK suele estar inactivo en el citoplasma, pudiendo ser activada por Rho y por el ácido araquidónico. Una vez activada, puede regular la fosforilación de la cadena ligera de miosina o fosforilar directamente la fosfatasa de esta cadena. Esta fosfatasa inactiva no puede desfosforilar la cadena ligera de miosina, por lo que aumentan sus niveles citoplasmáticos. Esto hace que aumente la interacción entre la actina y la miosina reorganizando así el citoesqueleto lo que conduce a un colapso del cono de crecimiento y la supresión del crecimiento de neuritas.

TROY / TAJ es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral y es capaz de sustituir al receptor de neurotrofinas p75 para formar complejos de receptores de membrana funcionales con el receptor Nogo y Lingo-1. TROY / TAJ puede activar la vía de señalización Rho / ROCK y mediar la señalización inhibitoria por moléculas inhibitorias asociadas a la mielina.

PIR-B es un receptor de alta afinidad para factores inhibitorios asociados a la mielina. Una vez que se unen sus ligandos, ejercen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de neuritas.

El receptor p75 puede transducir señales en asociación con PIR-B. El bloqueo de la actividad PIR-B puede anular parcialmente los efectos inhibitorios de sus ligandos en la regeneración nerviosa *in vitro*. Sin embargo, el bloqueo del gen PIR-B no puede mejorar la plasticidad axonal o la recuperación funcional después del daño cerebral inducido por trauma *in vivo*.

No obstante, la contribución de PIR-B en la transducción de señal inhibitoria puede ser más fuerte que la del receptor Nogo. De hecho, se ha visto que el bloqueo de PIR-B tiene un efecto mayor sobre la regeneración que el bloqueo del receptor Nogo.

Esta es una vía de señalización importante a nivel del sistema nervioso central que transduce señales inhibitorias para bloquear la regeneración. También está implicada en numerosas funciones celulares, incluida la contracción de las células musculares lisas, proliferación, adhesión y migración de células. [11]

La ROCK-1 se expresa en muchos tejidos humanos, principalmente en tejidos no neurales. Entre éstos se encuentran el corazón, páncreas, pulmón, hígado, músculo esquelético y riñón, mientras que ROCK-2 se expresa principalmente en el sistema

nervioso central, incluidas las neuronas piramidales del hipocampo, la corteza cerebral y las células cerebelosas de Purkinje.

Los inhibidores de ROCK tienen un alto potencial terapéutico y se aplican para el tratamiento de una amplia variedad de condiciones patológicas en las que se incluyen asma, cáncer, disfunción eréctil, glaucoma, resistencia a la insulina, insuficiencia renal, degeneración neuronal y osteoporosis. Se ha visto que esta inhibición es capaz de mejorar la respuesta regenerativa del sistema nervioso central lesionado y que también ejerce neuroprotección a través de la activación de la señalización de la supervivencia celular intracelular, como la vía de la Akt. También atenúan la muerte apoptótica en las células ganglionares de la retina y previenen la pérdida de células dopaminérgicas en modelos de enfermedad de Parkinson basados en toxinas. [12]. Los inhibidores de la isoforma 1 son utilizados para el tratamiento de la hipertensión pulmonar, mientras que los de la isoforma 2 son los que estarían encaminados a tratar las enfermedades neurodegenerativas.

Y-27632 y en menor medida el fasudil, son los principales inhibidores de la ROCK en ensayos *in vivo* y ensayos *in vitro*. Estas moléculas muestran una potencia limitada al compararlas con otros inhibidores. Por lo general, se utilizan a altas concentraciones, a las cuales su selectividad frente a otras quinasas no está totalmente caracterizada. [2]

Hasta la fecha, sólo dos inhibidores de ROCK han sido aprobados para uso clínico, en Japón (Fasudil y Ripasudil) y uno en China (Fasudil). En 1995 se aprobó fasudil para el tratamiento de vasoespasma cerebral y, más recientemente, en 2014, ripasudil fue aprobado para el tratamiento del glaucoma.

### **3. Objetivos**

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre las recientes investigaciones encaminadas a buscar nuevas estructuras de fármacos inhibidores que sean selectivos frente a la isoforma ROCK-II. De esta manera, se podrían emplear para el tratamiento de distintas enfermedades neurodegenerativas sin que se vean afectadas otras quinasas que generarían efectos perjudiciales no deseados para el paciente.

#### 4. Metodología

El presente trabajo se basa en una revisión bibliográfica sobre los inhibidores de la Rho quinasa para su uso en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas se llevó a cabo a lo largo de los meses de febrero a mayo de 2018. En primer lugar, se consultaron las principales enfermedades neurodegenerativas para poder comprender el uso de los inhibidores de esta enzima. Para la recogida de información se utilizaron las bases de datos científicas PubMed y Scifinder, cuyo acceso es a través de internet. Los criterios de búsqueda fueron estudios, revisiones y patentes publicadas lo más reciente posible, tanto en inglés como en castellano, a partir de palabras clave enfocadas a los objetivos del trabajo como por ejemplo “Rho kinase inhibitors” y “fasudil”. Los artículos incluidos en esta revisión fueron aquellos que relacionaban las enfermedades neurodegenerativas con los inhibidores de la Rho quinasa.

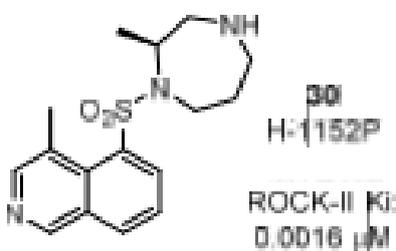
#### 5. Resultados y discusión

A nivel bioquímico y estructural, hay poca diferenciación entre estas dos isoformas.

Además de que comparten una identidad de secuencia alta, las dos isoformas comparten muchos sustratos proteicos, incluida la cadena ligera de miosina (MLC), fosfatasa de cadena ligera de miosina (MYPT1), LIM quinasa (LIMK), y S6 péptido.

Dada la similitud de la secuencia de las dos isoformas ROCK en el bolsillo ATP, los sustratos que ambas comparten, y la expresión de cada una de éstas, es necesario buscar posibles diferenciadores entre las dos.

##### 1. Inhibidores basados en la isoquinolina



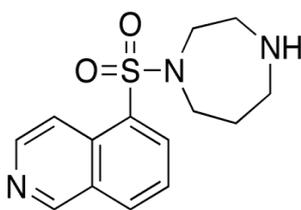
Son un tipo de inhibidores clásicos de la ROCK. El representante de este grupo es el **fasudil**. Se demostró que el nitrógeno de la isoquinolina se unía a la región bisagra. La actividad *in vivo* de éste era debida a una combinación entre el efecto de la molécula original con la de su metabolito, el hidroxifasudil. Este último tiene

una potencia similar aunque se une de manera diferente. Se pudo ver que tenían actividad inhibidora contra otras quinasa de la familia AGC, encontrando uno más selectivo, el H-1152P.

- Fasudil

El fasudil es el fármaco que ha sido comercializado y actualmente se está investigando acerca de otras acciones por ser inhibidor de una quinasa tan deslocalizada por el organismo. Es un potente inhibidor de ROCK útil para el tratamiento de enfermedades isquémicas que fue estudiado originariamente como un antagonista del calcio intracelular produciendo un efecto vasodilatador. Se utilizó para el tratamiento del vasoespasmio cerebral producido habitualmente por una hemorragia subaracnoidea, así como para mejorar el deterioro cognitivo observado en las víctimas de accidente cerebrovascular. También se ha visto que es útil para el tratamiento de la hipertensión pulmonar, mejorar la memoria y el pronóstico de los pacientes con Alzheimer. [7]

Es un derivado de la isoquinolina sulfonamida que mejora la regeneración y la supervivencia de neuronas del SNC lesionadas in vivo e in vitro. El **hidroxi fasudil** es un metabolito activo del fasudil y un inhibidor específico de ROCK muy efectivo y selectivo.



*Fasudil (1-(5-isoquinolinsulfonyl)-homopiperazina)*

La degeneración axonal es una de las características más tempranas de la patología de la enfermedad de Parkinson, que es seguida por la muerte neuronal en la sustancia negra y otras partes del cerebro. Por lo tanto, la inhibición de la degeneración axonal combinada con la neuroprotección celular parece clave para atacar una etapa temprana de la progresión de la enfermedad de Parkinson. [13]

Para estudiar los efectos neuroprotectores del fasudil, se utilizó un modelo de ratones a los que se les había inducido la enfermedad de Parkinson mediante la administración intraperitoneal de MPTP (neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), dando lugar a una disminución de la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) y el número de células inmunes positivas para TH. Tras analizar los resultados obtenidos, se pudo observar que fasudil confiere protección dopaminérgica en la intoxicación producida por MPTP en ratones. Se vio que la expresión de la TH, que es la enzima que cataliza la conversión de L-tirosina al precursor de la dopamina, aumentó significativamente tras el

tratamiento durante 15 días con fasudil en estos ratones. Además, la expresión de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria también se aumentó. [14]

Otro estudio realizado sobre este fármaco, descubrió que el fasudil es eficaz para prevenir la degeneración de la neurona motora a través de la inhibición de la activación de ROCK en ratones transgénicos con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y en estudios *in vitro*. PTEN es un modulador en la vía de señalización AKT-mTOR, que controla el ritmo del proceso de integración de las neuronas, su posicionamiento correcto, el desarrollo dendrítico y la formación de la sinapsis. La activación de ROCK en estos ratones SOD1G93A, da lugar a una disminución de la AKT fosforilada potenciando la fosforilación de PTEN, teniendo como resultado la muerte neuronal. El fasudil impide la activación de ROCK, por lo que reduce la fosforilación de PTEN produciendo una protección neuronal. Por tanto, se vio que fasudil y M3, un metabolito activo de éste, protegían a las neuronas motoras contra la neurotoxicidad inducida por SOD1G93A y modulaban la vía PTEN / Akt mediante la inhibición de la activación de ROCK en SOD1G93A.

Además, fasudil disminuyó la progresión de la enfermedad de ELA, aumentó el tiempo de supervivencia y redujo la pérdida de neuronas motoras en ratones SOD1G93A. [15]

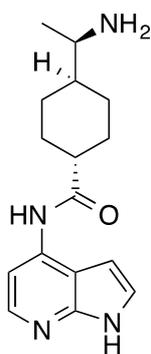
También se llevó a cabo un estudio para comprobar la eficacia terapéutica del fasudil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Hay muchas enzimas y proteínas implicadas en la neuroinflamación y en la neuropatología de EA, entre las que hay que destacar la ROCK. La vía mediada por ROCK está asociada al proceso de inflamación, por lo que su inhibición resulta beneficioso para prevenir la neuroinflamación y daño neuronal adicional. Por lo tanto, ROCK podría ser un objetivo prometedor para el tratamiento de la EA.

Para demostrarlo, se administró una inyección intracerebroventricular de  $A\beta_{1-42}$  a ratas, lo que indujo una respuesta inflamatoria significativa, muerte neuronal en el hipocampo y déficit de memoria en las ratas.

Al administrar fasudil se observa una mejora en el aprendizaje espacial y la alteración de la memoria, atenuación en la pérdida neuronal y la lesión neuronal inducida por  $A\beta_{1-42}$ .

Por tanto, se cree que este fármaco puede proteger contra la neurodegeneración hipocámpica inducida por A $\beta$  mediante la supresión de la respuesta inflamatoria, lo que sugiere que podría ser un agente prometedor para la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación, como la enfermedad de Alzheimer. [16]

## 2. Inhibidores derivados de 4-aminopiridina



**Y30141**

Ki:  
ROCK-II: 0.11  $\mu$ M

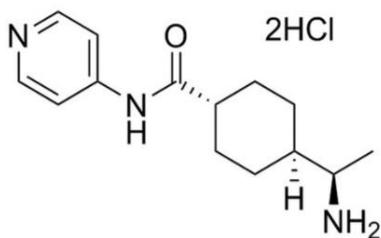
*Análogo de pirrolopiridina*

Son otro tipo de inhibidores clásicos que se basan en la estructura de 4-aminopiridina. Tiene una potencia ligeramente superior al fasudil frente a las ROCK-II. Sin embargo, su análogo de pirrolopiridina es mucho más potente debido a que presenta una superficie aromática más grande que interacciona con el centro activo y por los enlaces de hidrógeno extras del NH de la pirrolopiridina

- Y-27632

Anteriormente, se había demostrado que la inhibición de la ROCK producida por fasudil ejercía efectos neuroprotectores, progenerativos y estabilizadores de axones. El inconveniente de este fármaco es que es bastante inespecífico en comparación con Y-27632, que es más específico.

Y-27632 es un inhibidor de ROCK que puede ser internalizado por las células mediante difusión facilitada mediada por el portador. Actúa en el sitio de unión a GTP del dominio catalítico de ROCK, inhibiendo así su actividad. [11]



Y-27632(dihidrocloruro de (+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-4-piridil ciclohexancarbox-amida)

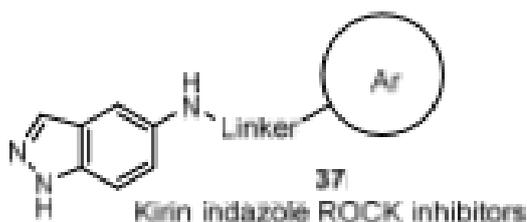
El potencial terapéutico de este inhibidor fue evaluado mediante la realización de un ensayo clínico. Fue administrado por vía oral al modelo de ratón de Esclerosis Lateral Amiotrófica SOD1G93A, que son ratones transgénicos que sobreexpresan la enzima superóxido dismutasa (SOD1) humana mutada, dando lugar a un fenotipo y unas características patológicas similares en humanos. [17] La muerte de motoneuronas y la degeneración axonal son características patogénicas críticas en el desarrollo de ELA humano.

Se demostró que Y-27632 protege frente a las neuronas del hipocampo contra la muerte celular neuronal inducida por glutamato *in vitro* y por ácido kaínico *in vivo*. Redujo la pérdida de motoneuronas en cultivo celular dissociado y promovió el crecimiento de neuritas en un sustrato permisivo.

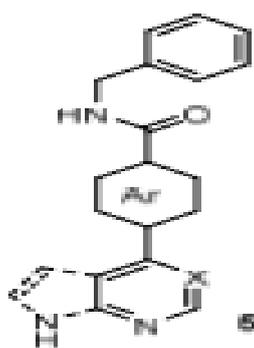
Se observó que la administración de fasudil estaba mejorando la supervivencia de los ratones SOD1G93A, mientras que con Y-27632 en dos dosis diferentes no se encontró. Estas diferencias pueden ser debidas a la administración de dosis inferiores a la ventana terapéutica así como la inhibición de otras quinasas. Como la mayoría de los estudios se han realizado en ratones hembras, puede resultar un factor limitante, siendo la capacidad de respuesta dependiente del género a la inhibición de ROCK. [12]

### 3. Otros inhibidores

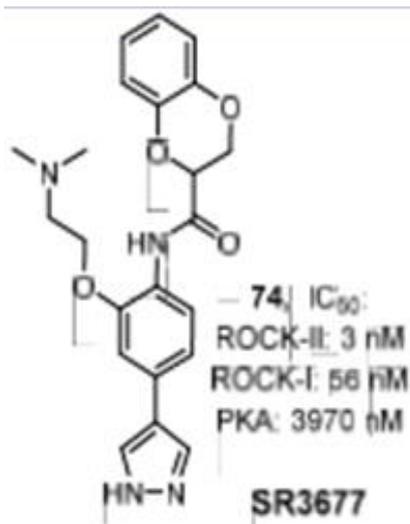
Los que están basados en el indazol también pueden ser considerados como inhibidores clásicos. En estos compuestos, el indazol se une a la región bisagra mientras que el grupo aromático en posición terminal se une a la bolsa hidrofóbica.



*Estructura inhibidores basados en el indazol*

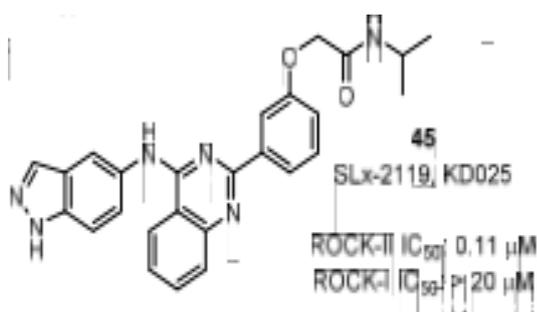


Los inhibidores de ROCK constituidos por un 4-carboxiamido-aryl-piridina, están formados por un anillo aromático unido a la posición 4 de una piridina, pirrolopiridina o una pirimidina. Se supone que estos últimos son los que se unen a la región bisagra, mientras que el anillo aromático terminal se une a la bolsa hidrofóbica, concretamente al lazo en P.



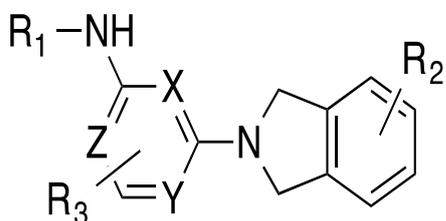
Los inhibidores basados en el conjunto amido-fenilpirazol han demostrado reducir la actividad de la  $\beta$ -secretasa 1 (BACE1), una proteasa de ácido aspártico importante en la formación de vainas de mielina en células nerviosas periféricas. En la enfermedad de Alzheimer, esta enzima es la encargada de la escisión extracelular de la proteína precursora de amiloide (APP), dando lugar a un fragmento soluble y a otro denominado C99, que tras la actuación de otra secretasa produce el  $\beta$ -amiloide. Por esta razón, además de reducir

la actividad de ROCK, también disminuye la producción de  $\beta$ -amiloide en el modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer.



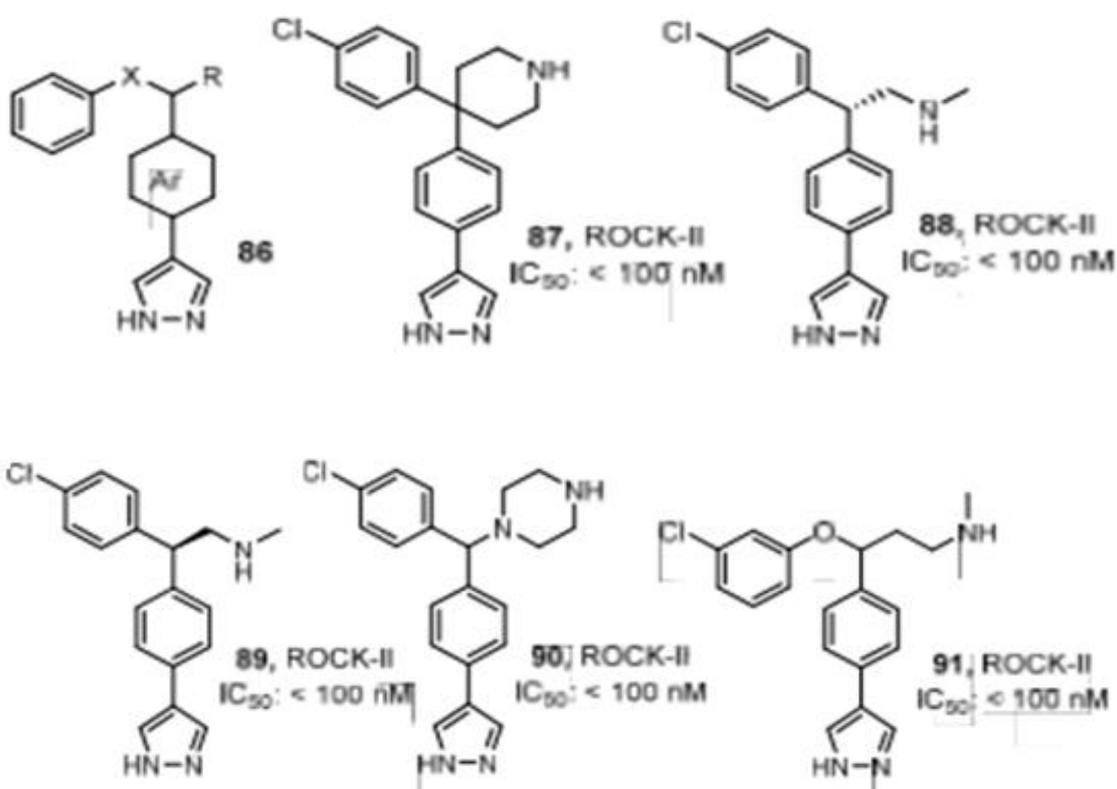
Este compuesto es un derivado indazolamino-quinazolina. Hasta hace poco fue el único compuesto específico para inhibir a ROCK-II. Al remplazar la quinazolina central por un anillo heteroarilo monocíclico y, sustituyendo éste por

una isoindolina o tetrahydroisoquinolina, a través de un enlace CN, se obtienen inhibidores de ROCK-II muy potentes y selectivos.



*Derivado constituido por el heteroarilo monocíclico sustituido con una isoindolina*

Por último, caben destacar aquellos derivados formados por un pirazol sustituido con metileno fenil. En estas estructuras un carbono  $sp^3$  está unido directamente a un grupo fenilo o a otros anillos aromáticos. Además, este carbono está sustituido con una cadena alquílica que normalmente tiene un heteroátomo como nitrógeno u oxígeno. En los compuestos **88** y **89** la quiralidad del carbono  $sp^3$  no tuvo mucha influencia en la actividad inhibidora de ROCK.



Todos estos son los principales inhibidores de ROCK según su estructura química, También es importante el estudio de las propiedades farmacocinéticas para crear moléculas que presenten una baja exposición sistémica, ya que se descubrió que al inhibir la ROCK de esta manera, da lugar a una reducción reversible en el recuento de los linfocitos. En la actualidad, está siendo investigado el desarrollo de inhibidores de ROCK para el tratamiento de afecciones agudas mediante la acción localizada de los compuestos.

Otro estudio reciente es el descubrimiento y desarrollo de pequeñas moléculas que actúan como inhibidores con una doble función. Por un lado inhiben la ROCK, por otro una diana no quinasa que es terapéuticamente relevante. Un ejemplo de esto es el inhibidor doble ROCK-NAMPT (nicotinamida fosforribosiltransferasa). Éste es una enzima que permite la biosíntesis de NAD<sup>+</sup>. La inhibición de esta transferasa tiene potencial terapéutico para el tratamiento del cáncer, enfermedades inflamatorias y trastornos metabólicos. [18]

#### **4. Nuevas perspectivas**

Se están investigando diferentes compuestos con distintas estructuras derivadas del fasudil para ver si son capaces de unirse al centro activo de la enzima. Todo esto se está realizando de manera teórica con el uso de distintos programas. Se estudia si distintas moléculas con un determinado tamaño pueden formar enlaces con los aminoácidos que rodean el centro activo de la enzima.

Para poder estudiar la selectividad de la molécula diseñada, buscan inhibición frente a otra quinasa más general. Si ésta no es inhibida, quiere decir que presenta mayor selectividad.

De una manera teórica, se ha visto que introducir un resto de glicina puede resultar beneficioso en cuanto a la selectividad frente a ROCK-II, ya que el nitrógeno de la glicina puede establecer un enlace por fuerzas electrostáticas entre la amina y el ácido del aspártico que está presente en el centro activo.

Sabiendo los procesos patológicos que pueden originar la pérdida progresiva de neuronas, se podrían incorporar a la molécula captadores de radicales libres como el ácido cafeico o fenoles para evitar el estrés oxidativo.

## 6. Conclusión

Lo que se busca con el uso de los inhibidores de la Rho quinasa es el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que, al ser crónicas, necesitan un tratamiento prolongado que se administre las menos veces posibles al día para que sea eficaz. Cuando éstos entran en circulación sistémica, sufren una conversión metabólica a compuestos no tóxicos y que son predecibles. Con el uso de estos, podemos limitar la duración de la acción y maximizar la exposición a la diana. [2]

Los estudios realizados acerca de los inhibidores de esta enzima han demostrado previamente que la inhibición farmacológica de la Rho-quinasa por Y-27632 (un derivado de 4-aminopiridina) y fasudil (un derivado de isoquinolina) no solo mejora la regeneración, sino también la supervivencia de neuronas del SNC lesionadas *in vivo* e *in vitro*. Además de los efectos establecidos sobre el citoesqueleto de actina, se ha podido aclarar que la inhibición de ROCK da como resultado la activación de rutas intracelulares que median en la supervivencia neuronal.

Además, diversas investigaciones han demostrado que la inhibición farmacológica de ROCK en el paradigma de lesión del nervio óptico conduce a una regeneración de los axones del nervio óptico lesionado y es capaz de mejorar la supervivencia de las células ganglionares de la retina lesionadas. El potencial neuroprotector de la inhibición de ROCK en enfermedades neurodegenerativas ha sido corroborado por varios grupos.

Se demostró que Y-27632, fasudil e hidroxifasudil promueven la regeneración neuronal y bloquean el proteoglicano sulfato de condroitina, sugiriendo que pueden usarse como fármacos candidatos para tratar enfermedades neurodegenerativas.

## 7. Bibliografía

[1] «Informe NeuroAlianza,» [En línea]. Available: <http://neuroalianza.org/wp-content/uploads/Informe-NeuroAlianza-Completo-v-5-optimizado.pdf>.

[2] O, Defert; S, Boland, «Rho kinase inhibitors: a patent review (2014 - 2016),» *Expert Opin Ther Pat*, pp. 507-515, Apr 2017.

[3] «Medline Plus,» [En línea]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/degenerativenervediseases.html>.

- [4] «TiTi,» [En línea]. Available: <https://infotiti.com/2017/03/enfermedades-neurodegenerativas/>.
- [5] «MedlinePlus Alzheimer,» [En línea]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/alzheimersdisease.html>.
- [6] «Fundación del cerebro,» [En línea]. Available: <http://www.fundaciondelcerebro.es/index.php/enfermedades-neurologicas>.
- [7] P. Lingor y L. Tönges, «Rho Kinase Inhibitors for use in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis». Patente WO/2013/135596, 19 Sept **2013**.
- [8] «MedlinePlus ELA,» [En línea]. Available: <https://medlineplus.gov/spanish/amyotrophiclateralsclerosis.html>.
- [9] J. M. S. D. Arana y F. M. Teruel, «Farmaindustria,» **2002**. [En línea]. Available: [http://www.farmaindustria.es/idc/groups/public/documents/publicaciones/farma\\_1041.pdf](http://www.farmaindustria.es/idc/groups/public/documents/publicaciones/farma_1041.pdf). [Último acceso: 14 03 2018].
- [10] I. G. Salado, *Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador*, Páginas 31-59, Madrid, **2014**.
- [11] J, Liu; H, Gao; X, Wang, «The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system,» *Neural Regeneration Research*, vol. 10, nº 11, pp. 1892-1896, **2015**.
- [12] G. René, S. Kim-Ann, S. Martin, S. David, K. J. Christoph, B. Mathias, L. Paul y T. Lars, «The Rho kinase inhibitor Y-27632 improves motor performance in male SOD1G93A mice,» *Frontiers in Neuroscience*, vol. 8, p. 304, **2014**.
- [13] L, Tönges; T, Frank; L, Tatenhorst; al, et, «Inhibition of Rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease,» *Brain*, vol. 135 (11), pp. 3355-3370, **2012**.
- [14] Y, Zhao; Q, Zhang; J, Xi; B, Xiao; Y, Li; C, Ma, «Neuroprotective effect of fasudil on inflammation through PI3K/Akt and Wnt/ $\beta$ -catenin dependent pathways in a mice model of Parkinson's disease,» *Int J Clin Exp Pathol*, vol. 8 ( 3), pp. 2354-64, 1

Mar **2015**.

[15] R, Günther; A, Balck; JC, Koch; T, Nientiedt; M, Sereda; M, Bähr; P, Lingor; L, Tönges, «Rho Kinase Inhibition with Fasudil in the SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Symptomatic Treatment Potential after Disease Onset,» *Front Pharmacol*, vol. 31 (8), p. 17, Jan **2017**.

[16] Y, Song; X, Chen; LY, Wang; W, Gao; MJ, Zhu, «Rho kinase inhibitor fasudil protects against  $\beta$ -amyloid-induced hippocampal neurodegeneration in rats,» *CNS Neurosci*, vol. 19 (8) pp. 603-10, Aug **2013**.

[17] G, Domínguez Vías «MasScience,» 7 Feb **2018**. [En línea]. Available: <https://www.masscience.com/2018/02/07/sod1g93a-algo-mas-que-una-sigla-ratones-que-ayudan-contra-la-ela/>. [Último acceso: 30 Abril 2018].

[18] Y. Feng, P. V. LoGrasso, O. Defert and Rongshi, «Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential,» *Journal of Medicinal Chemistry*, pp. 1-104, **2015**.

[19] «NeuronUp,» [En línea]. Available: <https://www.neuronup.com/es/neurorrehabilitacion/disease>.

[20] M, Ohbuchi; T, Kimura; T, Nishikawa; T, Horiguchi; M, Fukuda; Y, Masaki, «Neuroprotective Effects of Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, After Spinal Cord,» *NCBI*, vol. 126 (3), pp. 815-823, Mar **2018**.