



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

**Inhibidores de Rho quinasa en el tratamiento de
enfermedades neurodegenerativas**

Autor: PATRICIA ESTEBAN LOZANO

Fecha: Junio/Julio 2020

Tutor: MARIA PILAR LOPEZ-ALVARADO GUTIERREZ

RESUMEN:

Las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, necesitan un tratamiento farmacológico que sea capaz de frenar la muerte neuronal y así detener el desarrollo de la enfermedad.

La vía Rho/ROCK interviene en numerosas funciones fisiológicas y se ha demostrado que la sobreexpresión de ROCK interviene en múltiples mecanismos causantes de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Puesto que la función de ROCK es fosforilar numerosos sustratos, se ha identificado a esta quinasa como una diana para el tratamiento del Parkinson.

Debido a la similitud entre ROCK1 y ROCK2, es muy importante desarrollar inhibidores más potentes y selectivos hacia ROCK2, que es la isoforma que se encuentra en el cerebro, y así evitar los efectos secundarios que se producen por la inhibición de ROCK1 en otras zonas del organismo o de otras quinasas.

Actualmente se están investigando diversos compuestos con distintas estructuras con el fin de desarrollar inhibidores de ROCK2 altamente selectivos.

Palabras clave: enfermedades neurodegenerativas, enfermedad del Parkinson, inhibidores de la Rho quinasa (ROCK)

ABSTRACT:

Neurodegenerative diseases, Parkinson in this particular case, need a pharmacological treatment capable of restraining neuronal death to stop de development of the illness. The Rho/ROCK signaling pathway takes action in numerous physiological functions and it has been proven that the overexpression of ROCK interferes in multiple mechanisms responsible of the dopamirgenic brain cells degeneration. As ROCK phosphorylates many substrates, have been identified as a target for Parkinson treatments.

Due to the similarities between ROCK1 and ROCK2, it is very important to develop stronger inhinitors/blockers aimed to ROCK2, which is the isoform located in the brain, in order to avoid the side effects caused by the inhibition of ROCK1 or another kinases. Currently, diverse compounds with different structures are being studied with a view to acquire highly selective ROCK2 blockers.

Key words: neurodegenerative diseases, Parkinson's Disease, Rho kinase inhibitors (ROCK)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGÍA	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
1. Proteínas Rho quinasa	6
2. ROCK. Características estructurales y funcionales	7
3. Actividad de ROCK	9
3.1 Microglía	9
3.2 Organización del citoesqueleto	10
3.3 Supervivencia celular, apoptosis y autofagia	11
3.4 Degeneración axonal	12
4. Inhibidores de la Rho quinasa (ROCK)	13
4.1 Derivados de isoquinolina	13
4.2 Análogos de Y-27632	14
4.3 Derivados de urea	14
4.4 Derivados de tetrahidroisoquinolina	15
4.5 Derivados de pirazol	16
4.6 Derivados de benzimidazol y benzoxazol	17
4.7 Derivados de benzotiazoles	17
4.8 Derivados de indoles y 7-azaindoles	18
4.9 Derivados de 4-quinazolinonas	19
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFÍA	20

1. INTRODUCCIÓN

Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades que se caracterizan por alterar el funcionamiento cognitivo, emocional y conductual de las personas que las padecen, generando una gran dependencia y disminución de la calidad de vida, son conocidas como enfermedades neurodegenerativas y suponen un desafío médico para el siglo XXI. En la mayoría de ellas, el principal factor de riesgo es la edad. El aumento de la esperanza de vida lleva asociado un aumento de la prevalencia de este tipo de patologías. (1) (2)

Las principales enfermedades neurodegenerativas son:

- Alzheimer: primera enfermedad neurodegenerativa más común, con una prevalencia mundial del 0,5% (3). Morfológicamente se caracteriza por la presencia de ovillos neurofibrilares y placas seniles. Sus principales síntomas son: pérdida de memoria, alteraciones en el comportamiento y dificultades con el lenguaje, así como en la realización de actividades de la vida diaria (1).
- Parkinson: segunda enfermedad neurodegenerativa más común, cuya prevalencia mundial es del 0,34% (3). Debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra se producen alteraciones clínicas como bradicinesia, rigidez, temblor en reposo e inestabilidad postural (2).
- Esclerosis lateral amiotrófica (ELA): enfermedad de neurona motora más frecuente del adulto. Inicialmente se produce una debilidad muscular que se desarrolla hasta la parálisis, debido a una degeneración progresiva de las neuronas motoras en la corteza cerebral, tronco del encéfalo y médula espinal (2). Su prevalencia a nivel mundial es del 0,003% (3).
- Esclerosis múltiple: enfermedad autoinmune que comienza en la juventud. Presenta una gran variedad de síntomas: motores, cognitivos y neuropsiquiátricos. Aunque ni los síntomas, ni su severidad al igual que su aparición son iguales en todos los pacientes (1)(2). Su prevalencia a nivel mundial es del 0,03% (3).

Enfermedad del Parkinson (EP)

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa multisistémica. Se caracteriza por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra (SNpc), que a través de la vía nigroestriatal inervan el estriado. La pérdida de neuronas dopaminérgicas produce un déficit de dopamina a nivel del estriado, lo que conlleva a una alteración de importantes funciones fisiológicas. (4,6)

Otra característica neuropatológica es la presencia de inclusiones proteicas citoplasmáticas conocidas como cuerpos de Lewy, su formación se debe al fallo del sistema de degradación de la célula y están constituidos por depósitos de la proteína α -sinucleína.

Al producirse una pérdida del 50% de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y del 70-80% de la dopamina estriatal aparecen los síntomas típicos de la enfermedad, que son fundamentalmente motores, por ejemplo: acinesia (dificultad en el inicio de los movimientos), bradiquinesia. (reducción de la rapidez de los movimientos), temblor en reposo o rigidez articular. La pérdida del equilibrio y las caídas se producen en estadios más avanzados cuando se ven afectados los reflejos posturales. También existen síntomas no motores como ansiedad, depresión, demencia, trastornos del sueño. (4,6)

Las causas que originan la EP son todavía desconocidas, estudios epidemiológicos muestran que alrededor del 90 % de los casos de EP son espontáneos y de aparición tardía, mientras que el 10% restante se relaciona con antecedentes familiares y una aparición temprana de los síntomas. (6)

El desarrollo del síndrome parkinsoniano o familiar se atribuye a la aparición de mutaciones en determinados genes, como por ejemplo: PARK -1 que favorece la agregación de la α -sinucleína, ubiquitina carboxil-hidroxilasa-1 (UHCL-1) relacionada con el sistema ubiquitin-proteosoma, tres mutaciones en los genes parkina (PARK-2), DJ-1 (PARK-7), PINK-1 (quinasa 1 p-ten-inducida) (PARK-6) implicados en el metabolismo mitocondrial y LRRK2 cuya disfunción puede producir toxicidad por un mecanismo de autofosforilación. En la Enfermedad del Parkinson idiopática, afectan tanto predisposición genética como la exposición a toxinas ambientales. (6)

La degeneración de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal resulta de la acción de una mezcla de mecanismos deletéreos, que tienen lugar tanto en el interior de las propias neuronas dopaminérgicas (autónomos) como fuera de ellas (no autónomos). (4,6). Los mecanismos autónomos son:

- Neuroinflamación: a través de este proceso el sistema nervioso central (SNC) se protege frente a los agentes infecciosos, las disfunciones fisiológicas y el daño celular. La respuesta inflamatoria está mediada por células gliales, linfocitos, monocitos y macrófagos del sistema hematopoyético. (6)
- Agregación proteica: por defectos en las vías de degradación (proteosoma y autofagia), en la EP existen los cuerpos de Lewy, formados por una acumulación de α -sinucleína. (4)
- Excitotoxicidad: la activación excesiva de receptores de glutamato permite que altos niveles de iones de calcio (Ca^{2+}) entren en la célula y activen una serie de enzimas que dañan estructuras como el citoesqueleto, la membrana y el ADN. (4)
- Estrés oxidativo: Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas derivadas del metabolismo del oxígeno. Las principales fuentes de ROS en la célula son la cadena respiratoria mitocondrial y el complejo NADPH-oxidasa. La producción excesiva de ROS provoca la muerte necrótica o apoptótica de la célula al no tener suficiente capacidad reparativa. (6)
- Disfunción mitocondrial: la principal fuente de producción de ROS en la célula es la mitocondria, es un orgánulo vulnerable ya que hay algunas ROS que no atraviesan la membrana mitocondrial y pueden provocar efectos tóxicos como la disminución de los niveles de ATP al actuar sobre proteínas relacionadas con el metabolismo energético. (4,6)

Los tratamientos paliativos de los que se dispone, afectan a las manifestaciones clínicas del paciente durante un tiempo, mejoran su calidad de vida pero no frena la degeneración neuronal, tienen como objetivo la recuperación de los niveles de dopamina para mejorar los síntomas causados por el déficit dopaminérgico: precursores de la síntesis de dopamina, como la levodopa; potenciadores de su liberación en los espacios sinápticos, como la amantadina, agonistas de receptores dopaminérgicos, como la bromocriptina e inhibidores de las enzimas encargadas de su catabolismo periférico y en el sistema nervioso central. Para aumentar la concentración de levodopa en plasma se utilizan inhibidores de la *dopa descarboxilasa* como carbidopa o benserazida, junto con inhibidores de *catecol-O-metiltransferasa* (COMT) como entacapona y la tolcapona. Para evitar la degradación de la

dopamina en la neurona se utilizan los inhibidores de monoaminoxidasa B (MAO-B), como la selegilina. (4)

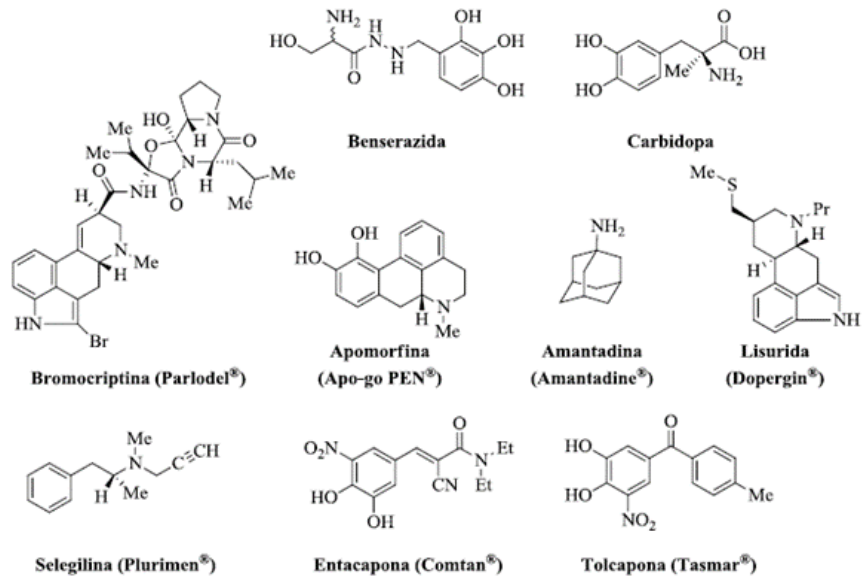


Fig.1 Fármacos aprobados para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (4)

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es analizar los distintos tipos de inhibidores de Rho quinasa como una opción terapéutica prometedora para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Estudiaremos como se desarrolla la vía de señalización Rho/ROCK así como, su participación en los distintos mecanismos involucrados en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas.

3. METODOLOGÍA

La realización de este trabajo se basa en una revisión bibliográfica de distintos artículos científicos a través de diferentes bases de datos como Pubmed y Sciendirect.

Se escogieron aquellos artículos considerados más relevantes durante los últimos años, escritos tanto en inglés como en castellano. Mediante el análisis de estos artículos se ha tratado de seleccionar la información más actual para poder analizar los distintos tipos de inhibidores de Rho quinasa.

Las palabras clave utilizadas en dicha búsqueda fueron: "ROCK and neurodegenerative disease", "Parkinson's Disease", "Rho kinase inhibitors"

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Proteína Rho quinasa

Las proteínas quinasas están implicadas en un gran número de procesos que son esenciales para la vida, pero su sobreexpresión puede contribuir al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. Es el caso de la Rho quinasa, que juega un importante papel en varias funciones celulares y su sobreexpresión se ha demostrado involucrada en múltiples mecanismos causantes de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. Por ello, en los últimos años ha aumentado el interés por la vía de señalización Rho/ROCK con la finalidad de desarrollar inhibidores de la Rho quinasa como una opción terapéutica prometedora para el tratamiento del Parkinson. (4,5)

Las proteínas Rho forman una de las subfamilias de la superfamilia Ras GTPasas pequeñas. Dentro de la subfamilia Rho los miembros mejor caracterizados son: RhoA, B, C D y E; Rac 1,2,3 y Cdc42 entre otros. Estas proteínas G pequeñas son interruptores moleculares que precisan del intercambio de moléculas GDP-GTP para modificar su actividad. Para que Rho pase a su estado activo, necesita la presencia de los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), que catalizan el intercambio de GDP a GTP, desplazando al factor inhibidor de la disociación de GDP. El paso de la forma activa de Rho (unido a GTP) a la forma inactiva (unido a GDP) es acelerado por las proteínas activadoras de las GTPasas (GAP), que estimulan la actividad GTPasa intrínseca, lo que permite la hidrólisis del GTP. (5,6)

En su estado activo, Rho puede unirse a sus proteínas efectoras para regular diversas funciones biológicas, una de ellas es ROCK, es una Rho-quinasa que a su vez interacciona con otras proteínas produciendo una cascada de señalización. (5,6)

2. ROCK. Características estructurales y funcionales

ROCK fue identificada como una proteinquinasa dependiente de Rho. Existen dos isoformas ROCK1 y ROCK 2, ambas proteínas son quinasas de serina/treonina. Su estructura consiste en un dominio catalítico que se localiza en el extremo amino-terminal, seguido de una región enrollada que contiene el dominio de unión a Rho (RBD) y por último, el extremo carboxilo-terminal que comprende un dominio de homología de pleckstrina (PHD), que contiene un dominio similar a un dedo de zink rico en cisteína (ZFD). Las dos isoformas comparten alrededor de un 64% de identidad en su secuencia aminoacídica, mientras que la homología en el dominio de la quinasa es del 92%. (7)

En cuanto a su distribución, ambas Rho quinasas se encuentran en la mayoría de los tejidos, pero hay diferencias en los niveles de expresión. ROCK1 se expresa preferentemente en pulmón, hígado, bazo, riñón y testículos, mientras ROCK2 es la isoforma dominante en neuronas y corazón. (5)

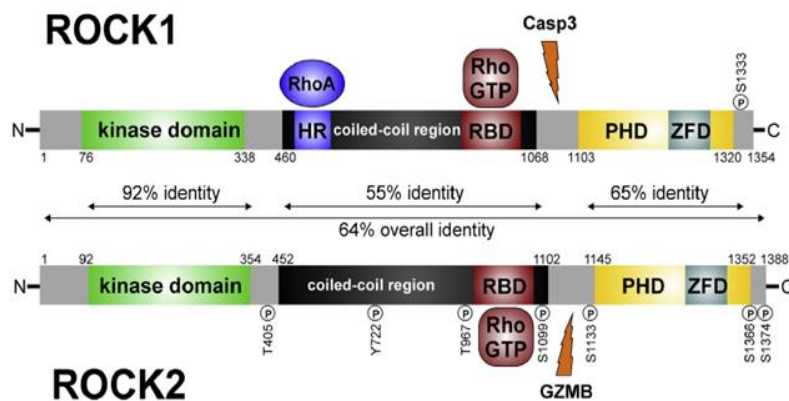


Fig 2. Estructura ROCK e isoformas (5)

En su forma natural, ROCK es enzimáticamente inactivo. El dominio del extremo carboxilo-terminal se une directamente al dominio catalítico del extremo amino-terminal, lo que ocasiona una auto-inhibición que mantiene a ROCK en su estado inactivo. Esta inhibición se puede interrumpir mediante la unión de RhoA en el dominio de unión Rho, lo que provoca cambios en la conformación de ROCK y su activación. Las proteínas ROCK también pueden activarse de manera independiente de Rho por la escisión y eliminación del terminal carboxilo inhibidor, en el caso de ROCK1 la escisión esta mediada por caspasas y en el caso de ROCK2 por granzima B. La fosforilación de ROCK2 en Thr-967, Ser-1099, Ser-1133 y Ser-1374 potencia

su actividad al aumentar la unión de RhoA, mientras que la fosforilación de ROCK2 en Tyr-722 inhibe la actividad al disminuir la unión a RhoA. (5, 7)

Dentro de la subfamilia de Rho, RhoA y RhoC son las más caracterizadas, en su estado activo se unen al dominio de unión de Rho (RBD) lo que altera la función autoinhibitoria de la región carboxilo-terminal, de forma que ROCK pasa a su estado activo. RhoB tiene acciones opuestas a RhoA e inhibe la expresión génica mediada por RhoA. Por otro lado, RhoE se une a la región N-terminal de ROCK1 (pero no ROCK2), lo que interfiere con su actividad quinasa. (5)

Entre los efectores que aumentan la actividad de Rho se encuentran: el receptor de ephrin (EphR), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), la glicoproteína de mielina oligodendrocitos, el receptor de ácido lisofosfídico (LPA), el complejo trimérico del receptor NogoR / p75 / Lingo1, el fosfato de esfingosina-1 (S-1P) y receptores de citoquinas. ROCK activado fosforila varias proteínas reguladoras que están involucradas en diferentes procesos biológicos. La especificidad y reconocimiento de sustratos, es muy similar en las dos isoformas. ROCK reconoce la secuencia R / KXXS / T o R / KXS / T (R, Arginina; K, Lisina; S, Serina; T, Treonina; X, cualquier aminoácido). (5,7) (Fig3). Algunas de las proteínas son:

- Quinasas de domino LIM (LIMK): uno de sus sustratos es la cofilina cuya función es la *despolimerización de la actina*, que es el componente más dinámico del citoesqueleto.
- Cadena ligera de miosina (MLC): interviene en la *actividad contráctil* de los filamentos de actina y miosina.
- Proteína mediadora de respuesta a la colapsina (CRMP2) está involucrada principalmente en el *crecimiento de neuritas*, aunque también en la especificación axón / dendrita, polaridad neuronal y dinámica de microtúbulos.
- Las proteínas ERM (ezrin, radixina y moesina) están involucrados en la *reorganización del citoesqueleto de actina*, la dinámica de la membrana, la migración celular.
- Aducina: La proteína aducina es activada por ROCK, de forma que se promueve la *agrupación de actinas*.
- Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa (PTEN): a través de la vía PI3K/AKT/mTOR interviene en la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y la regeneración.

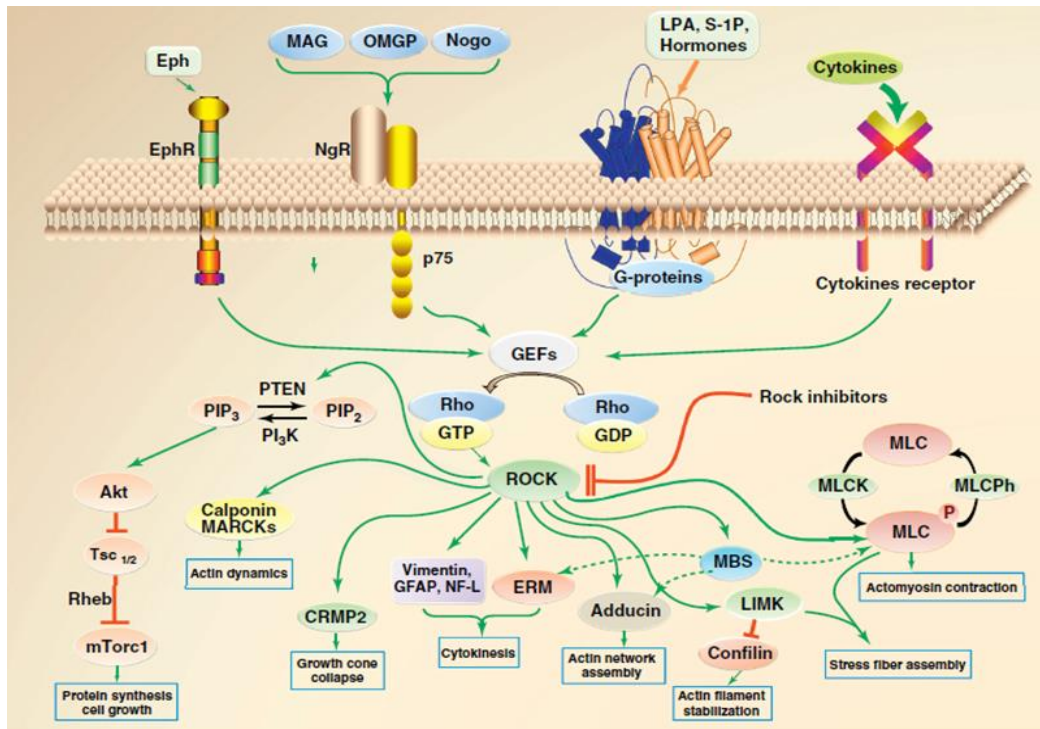


Fig 3. Vías de señalización de ROCK con sus objetivos y regulaciones biológicas directas (8)

Mediante la fosforilación de diferentes sustratos, ROCK interviene en diversas funciones celulares, como la **contracción celular** y la **organización de la actina**, la **autofagia**, la **migración celular**, el **alargamiento de neurita**, la **citocinesis**, la **supervivencia celular** y la **apoptosis**. (5,8)

3. Actividad de ROCK

3.1) Microglía

La neuroinflamación mediada por la microglía es un proceso que sufren y comparten las enfermedades neurodegenerativas. La microglía son células inmunitarias con una capacidad similar a los macrófagos en el SNC, por ello también se denominan “macrófagos del sistema nervioso”. ROCK es uno de los principales reguladores de la actividad microglial, al participar en la migración, fagocitosis y liberación de citoquinas inflamatorias. (9)

En condiciones sanas la microglía se encuentra en un estado llamado “descanso”, en el que tiene un fenotipo ramificado y lleva a cabo procesos móviles para vigilar y mantener la homeostasis del SNC. En condiciones patológicas causadas por agentes infecciosos, daño tisular o alteraciones funcionales de las neuronas vecinas, la microglía pasa a estar “activada”, con un fenotipo amebode. La microglía activada se clasifica según el sistema de clasificación de macrófagos periféricos “M1” y “M2”. La microglía "M1" actúa frente a la lesión o infección para defender el tejido y destruir a los patógenos, para ello induce la liberación de: citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, óxido nítrico (NO) y ROS. Una activación incontrolada provoca que la neurotoxicidad afecte a las neuronas sanas. La microglía "M2" actúa después de la fase proinflamatoria para promover la reparación y regeneración de tejidos, para ello induce la liberación de: citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10, IL-13 o factores de crecimiento como TGF- β (9,10)

La ROCK intrínseca de la microglía es inducida por la degeneración neuronal. Un aumento de la actividad de ROCK implica la activación de la microglía mostrando el fenotipo “M1”. La microglía activada forma “gliapsies” que son contactos entre la microglía y la neurona degenerada, además la formación de los contactos conlleva a la activación de ROCK en la neurona degenerada que inhibe la regeneración axonal. La microglía activada puede entrar en un círculo vicioso de neuroinflamación crónica, lo que implica atacar a neuronas sanas y ocasionar la degeneración neuronal y la muerte. (11)

El sistema de renina-angiotensina (RAS) del cerebro tiene un papel importante en la regulación de la neuroinflamación, degeneración dopaminérgica y el estrés oxidativo. Un estudio demostró que la angiotensina II al interactuar con los receptores AT1, induce la activación de NADPH-oxidasa que genera superóxido, lo que conduce a la translocación de NF- κ B y la activación de ROCK. La activación de ROCK induce la activación de NADPH-oxidasa a través de proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK), lo que aumenta la liberación de ROS que contribuye a la progresión de la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Además, la activación de ROCK, a través de NF - κ B, aumentó la expresión del receptor AT1 en células microgliales. (12)

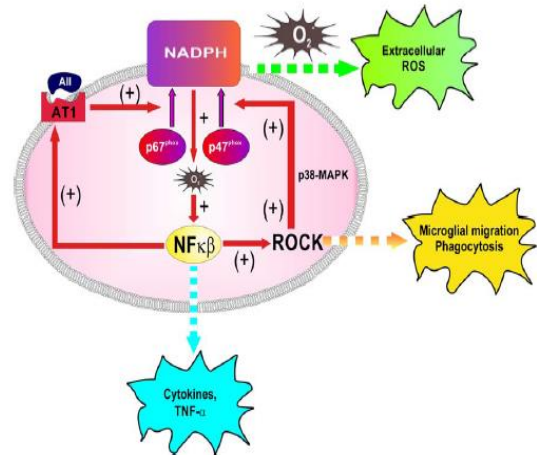


Fig 4. Modelo de la interacción entre NADPH-oxidasa y Rho-quinasa en la activación microglial inducida por A β (12)

Varios estudios han demostrado que la activación de ROCK II aumenta la degeneración celular dopaminérgica inducida por MPTP (neurotoxina que afecta a las neuronas dopaminérgicas) y que el tratamiento con los inhibidores de ROCK, como Fasudil o Y-27632, conducen a una protección de las neuronas dopaminérgicas, es decir, disminuyen la muerte celular. Sin embargo, un modelo inducido por la toxina 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) con una lesión más grave no respondió a la aplicación oral de Fasudil. Otro estudio mostró que ROCK se expresa principalmente en la microglía, por lo tanto, la inhibición de ROCK microglial es fundamental para los efectos neuroprotectores de los inhibidores de ROCK. (9)

3.2) Organización del citoesqueleto

La señalización RhoA / ROCK está involucrada en la despolimerización de actina y la contracción de la actinmiosina, regulando así la adhesión, contracción y migración, ya que presenta un papel regulador fundamental en la reorganización de la actina a través de la fosforilación de proteínas reguladoras del citoesqueleto como LIMK y MLC. Para realizar la migración, las células requieren la contracción de la actinmiosina, el reordenamiento de las fibras de estrés y la formación de adherencias focales y, estos procesos están regulados por ROCK mediante LIMK y MLC. (13)

ROCK fosforila y activa a la enzima LIMK en Thr-508, uno de sus sustratos es la cofilina cuya función es la despolimerización de la actina, que es el componente más dinámico del citoesqueleto. El mecanismo de crecimiento y acortamiento de la longitud de los filamentos de actina es por polimerización y despolimerización. La inactivación de la cofilina conlleva a la inhibición de la despolimerización de actina y al reordenamiento de las fibras de estrés.

MLC desempeña un papel importante en la contracción celular, la motilidad celular y la citoquinesis. ROCK al fosforilar la MLC en Ser-19 y Thr-18, los mismos sitios que son fosforilados por MLC quinasa, interviene en la actividad contráctil de los filamentos de actina y miosina al favorecer la interacción entre la actomiosina y F-actina, lo que se asocia con la formación de fibras de tensión y adherencias focales. Este efecto se ve potenciado porque ROCK también fosforila la subunidad de unión a miosina (MYPT1) de la fosfatasa MLC (MLCP) en Thr-695 y Thr-850, lo que inhibe la desfosforilación de MLC. (5,7)

3.3) Supervivencia celular, apoptosis y autofagia

La apoptosis y la autofagia son procesos intracelulares que mantienen la homeostasis del organismo y promueven la supervivencia. El desequilibrio entre estos dos procesos se asocia con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. La apoptosis es un tipo de muerte celular que elimina las células dañadas o envejecidas, por lo que es muy importante para el metabolismo y el desarrollo celular. Se caracteriza por cambios morfológicos como la contracción de la célula, la condensación de la cromatina y la desintegración de la célula en pequeños fragmentos que se eliminan por fagocitosis. Muchas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas intracelulares, como sucede en el Parkinson con la α -sinucleína. La vía encargada de eliminar estas proteínas para impedir que causen daños cerebrales es la autofagia, que también elimina orgánulos viejos o dañados. En condiciones de estrés ROCK1 fosforila a Beclin-1 para inducir la autofagia y además regula el tamaño de los autofagosomas. Estudios recientes han demostrado el papel de ROCK1 como regulador entre la apoptosis y la autofagia. (7,14,15)

La apoptosis puede llevarse a cabo mediante dos vías: la *vía extrínseca* se basa en la activación de los receptores de la muerte a través de sus ligandos de la muerte, como FasL y TNF α , y la *vía intrínseca* consistente en la señalización llevada a cabo por las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Ambas vías van a producir la activación de caspasas, como las caspasas 3, 6 y 7, que son una familia de cisteín-proteasas que escinden y provocan la muerte celular. Durante la apoptosis, la caspasa 3 escinde a ROCK1 y elimina el inhibidor de la región carboxilo-terminal, lo que da lugar a una activación de ROCK1. En el caso de la muerte inducida por células asesinas naturales, granzima B escinde y activa a ROCK2. Además, la granzima B activa caspasas que van a estimular la activación de ROCK1. (7,15)

Varios sustratos de ROCK intervienen en la regulación de la muerte celular y la supervivencia.

El aumento de la actividad de la fosfatasa lipídica PTEN altera la acción de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que es un activador central de la señalización Akt. La vía PI3K-AKT fosforila diversos sustratos, entre los que se incluyen: la glucógeno sintasa quinasa β (GSK3 β), la familia de factores de transcripción de la caja de cabeza de horquilla (FOXO), los complejos de mamíferos diana de la rapamicina (mTORC1 y mTORC2) y la proteína de muerte asociada a Bcl-2 (Bad). Mediante la fosforilación de estos sustratos, AKT fomenta el crecimiento

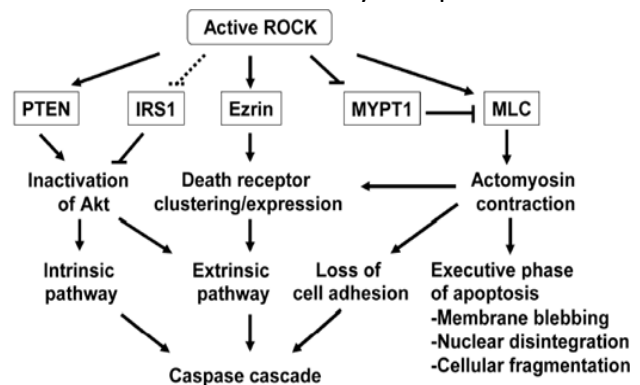


Fig 5. Sustratos de ROCK en la señalización apoptótica

celular y la supervivencia, principalmente a través de la activación de mTORC1, que es un regulador de la síntesis de proteínas y el crecimiento celular. (5,16)

El sustrato 1 del receptor de insulina (IRS1) es un regulador de la vía Akt, se ha demostrado que ROCK regula negativamente a IRS1 en las células vasculares del músculo liso y en fibroblastos de ratones que carecen de la proteína inhibidora de Rho (p190-B RhoGAP), lo que provoca la inactivación de PI3K-AKT. Otros estudios han demostrado que en adipocitos y líneas celulares musculares, ROCK fosforila a IRS1 en los sitios Ser632 / 635, lo que mejora la activación de PI3K-AKT. Por lo tanto, dependiendo del tipo celular ROCK puede regular de forma positiva o negativa la vía PI3K-AKT. Por otro lado, el aumento de la fosforilación de MLC provoca un incremento de la contracción de la actinmiosina, que regula los sucesos que tienen lugar durante la apoptosis, como la formación de ampollas en la membrana plasmática, desintegración nuclear y fragmentación de las células apoptóticas. También se observó que ROCK puede inducir la apoptosis mediante el aumento de la fosforilación de la ezrina. (15)

ROCK2 puede inducir la apoptosis mediante la calpaína, una proteasa no lisosómica activada por Ca^{2+} , que tiene un papel importante en la apoptosis, la degeneración axonal y la regeneración. En el estudio realizado en las células de ganglio retiniano de rata, se demostró que la inhibición de ROCK2 conduce a una disminución de la actividad de la calpaína. (17)

Estudios recientes han revelado que ROCK puede ser proapoptótico o antiapoptótico dependiendo del tipo celular, por ejemplo, la inhibición de ROCK dio lugar a la apoptosis de las células epiteliales de las vías respiratorias al interrumpir las fibras de estrés de actina. Sin embargo, la inhibición de ROCK por Fasudil disminuyó la apoptosis hepatocelular inducida por lipopolisacárido. (7)

3.4) Degeneración axonal

Antes de la muerte del cuerpo neuronal se produce la degeneración axonal, que produce un deterioro en la conexión de las regiones afectadas del SNC. Los déficits suelen ser duraderos debido a la incapacidad de los axones del SNC para regenerarse.

CRMP2 es una proteína citoplasmática que se expresa en las neuronas del sistema nervioso central, está involucrada en el crecimiento de neuritas, en la especificación axón / dendrita, polaridad neuronal y dinámica de microtúbulos, entre otros procesos neuronales. Se une a los dímeros de α - β -tubulina para promover la polimerización y estabilización de los microtúbulos, dando lugar a un aumento de la proliferación de neuritas.

En el modelo de lesión de aplastamiento del nervio óptico (ONC) en ratas, se demostró que en condiciones normales CRMP2 está implicada en la integridad axonal y el crecimiento de neuritas mediante el transporte axonal, el ensamblaje del citoesqueleto y la homeostasis de calcio. Pero cuando se produce la lesión del nervio, el aumento de la entrada de calcio activa a la calpaína que provoca una escisión en CRMP2, lo que conlleva a la degeneración axonal. Al igual que la fosforilación excesiva mediada por quinasas como ROCK provoca la inactivación de CRMP2, lo que conduce a un déficit en el crecimiento de neuritas. (18)

4. Inhibidores de la Rho quinasa (ROCK)

Las enzimas quinasas comparten un dominio catalítico que contiene una hendidura donde se une el trifosfato de adenosina (ATP). El estudio de esta hendidura es esencial para el diseño de fármacos. Se ha demostrado que los inhibidores de ROCK son muy importantes para el tratamiento de diversas enfermedades neurológicas. La similitud entre otras quinasas y las estructuras cristalinas de ROCK-I y ROCK-II, implica que los inhibidores presenten una elevada especificidad. Han surgido diversos compuestos como inhibidores de ROCK-II que se clasifican en función de la estructura química de la que derivan. Casi todos los inhibidores de ROCK descritos son inhibidores competitivos del ATP de las proteínas quinasas Ser / Thr. (19,20)

4.1 Derivados de isoquinolina

El más conocido es el Fasudil, fue aprobado para el tratamiento del vasoespasma cerebral y constituyó el primer inhibidor de ROCK desarrollado por Asahi Chemical Industry en Japón. (5,21)

La estructura química del **fasudil** consta de un sistema de isoquinolina, unido a un anillo de homopiperazina a través de un grupo sulfonilo, [1- (5-isoquinolinasulfonil) -homopiperazina] (HA-1077) y posee una K_i de $\sim 0.33 \mu\text{M}$ contra ROCK-II, aunque también afecta a otras quinasas como PKA, PKC y MLCK. Fasudil interactúa con ROCK-II mediante el nitrógeno de isoquinolina que forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno de la amida de Met172. Como la cadena lateral de Asp176 es más corta, fasudil desplaza el anillo de homopiperazina, lo que le permite que el nitrógeno de la homopiperazina forme enlaces de hidrógeno con el carboxilato de la cadena lateral de Asp176 y la cadena principal Asp218. También puede interactuar con los residuos hidrófobos como Ile98, Val106, Ala119, Met169, Leu221 y Phe384. (5,19,20,23)

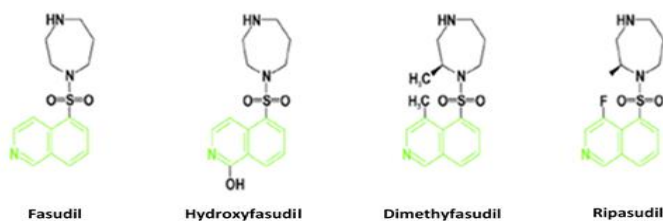


Fig. 6 Inhibidores derivados de isoquinolina (5)

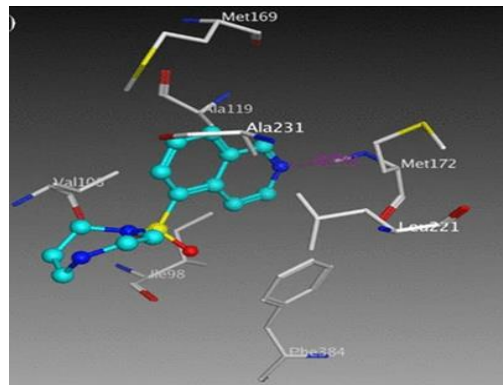


Fig 7. Fasudil y sus interacciones en el sitio de ATP de ROCK2 (19).

El **hidroxifasudil**, un metabolito activo de fasudil, es un inhibidor de ROCK más potente y selectivo que el compuesto original, posee una $K_i = 0,17 \mu\text{M}$ contra ROCK, aunque también inhibe a otras quinasas. La actividad in vivo de fasudil se debe a un efecto combinado con hidroxifasudil. (5,20)

El efecto de la quiralidad sobre la homopiperazina demostró que el enantiómero *S* es más potente que el enantiómero *R*. La incorporación de un grupo metilo en la posición 4 de la isoquinolina y otro en la posición 2 de la homopiperazina con una configuración *S*, dio lugar a la (*S*)-(+)-2-metil-1-[(4-metil-5-isoquinolina)sulfonil]homopiperazina (H-1152P) conocido como **dimetilfasudil**. Este análogo es un inhibidor más selectivo de ROCK y posee un valor de

Ki de 0,0016 μM . Dimetilfasudil interactúa estrechamente con Phe368, que es un residuo que contribuye significativamente a la selectividad del inhibidor sobre ROCK2. (20,21)

Diferentes estudios demostraron que al incorporar un grupo etilo, nitrilo o hidroxilo en la posición 4 de la isoquinolina, se producía una disminución de la potencia del inhibidor, pero al incorporar un halógeno se producía un aumento la actividad. **Ripasudil** (K-115), un derivado de isoquinolinasulfonilhomopiperazina fluorado, es un inhibidor de ROCK que muestra una alta selectividad hacia ROCK2 con una Ki 0,019 μM . Debido a que las proteínas quinasas tienen sitios de unión con una estructura muy similar, por ello la alta selectividad de K-115 le aporta un gran perfil de seguridad. Ripasudil fue aprobado en 2014 para el tratamiento del glaucoma en Japón. (21,22)

4.2 Análogos de Y-27632

Los análogos de Y-27632 son inhibidores de ROCK basados en estructuras de 4-aminopiridina (y 4-amidopirrolpiridina) desarrollados por primera vez por Yoshitomi Pharmaceutical. (5,20)

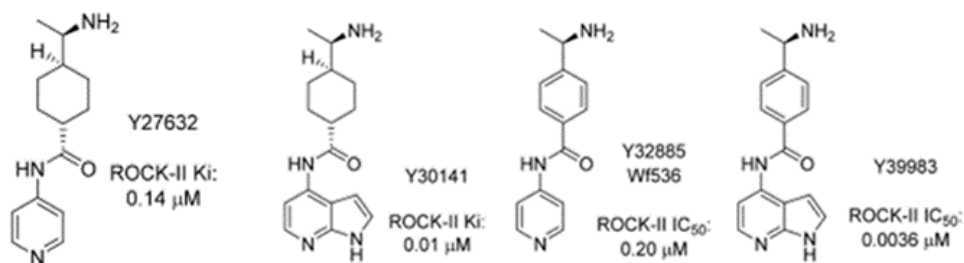


Fig 8. Inhibidores de ROCK basados en derivados de piridina/pirrolpiridina

Y-27632 presenta mayor potencia y selectividad contra ROCK2 (Ki: 0,14 μM) que el fasudil. Es uno de los fármacos que más se ha utilizado en los estudios de investigación. Al principio se creía que su penetración cerebral era insuficiente para alcanzar niveles terapéuticos al tener baja capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, pero diferentes estudios demostraron que, en modelos de animales con enfermedades neurodegenerativas, el tratamiento con Y-27632 presenta efectos favorables. (5,20)

La unión entre Y-27632 y el dominio de la quinasa se produce a través de interacciones hidrofóbicas y polares. Entre ellas se encuentran: un enlace de hidrógeno entre el grupo amida de la cadena principal de Met172 y el átomo de nitrógeno de la piridina, el grupo amino terminal forma dos enlaces de hidrógeno con los dos residuos catalíticos, Asn219 y Asp232 y el grupo carbonilo forma enlaces de hidrogeno con Lys121 y Asp232. (21,24)

Se han desarrollado diferentes análogos como **Y-30141** y **Y-39983**, que poseen una mayor potencia debido a la sustitución del anillo de piridina por pirrolopiridina, que proporciona interacciones adicionales de enlaces de hidrógeno a través del resto NH de la pirrolopiridina. Y-32885 y Y-39983 están involucrados en la estabilización del crecimiento del cono axonal y en favorecer la regeneración del nervio óptico dañado. (5,20)

4.3 Derivados de urea

Los inhibidores de ROCK basados en urea pueden utilizarse para el tratamiento del glaucoma, se aplicaron en los ojos de las ratas y se detectaron disminuciones significativas en la presión intraocular. Las estructuras de los inhibidores se optimizaron a través de modelos de relación estructura-actividad (QSAR). (25)

Estos derivados presentan un anillo de pirazol como centro básico y en ellos lo primero que se estudió fue la distancia entre el grupo carbonilo de la urea y el anillo fenilo terminal. Al aumentar la distancia de la cadena se produce una reducción significativa de la actividad, lo mismo sucede al sustituir la bencilamina por anilina. Esta disminución de la actividad puede deberse a que las interacciones hidrofóbicas no se ven favorecidas. El mejor sustituyente en el anillo de fenilo es el grupo metoxi en la posición 3, ya que el aumento del número de sustituyentes altera las interacciones hidrofóbicas. A continuación, se analizó el efecto de la sustitución sobre el grupo NH de urea más próximo al pirazol, y se observó que cualquier sustituyente provoca una disminución de la afinidad por ROCK. Por último se estudió el efecto de la alquilación del otro NH de la urea (el lado sustituido por el bencilo) y tanto los grupos metilo, etilo, ciclopropilo e isopropilo como las sustituciones con grupos que contienen oxígeno como 2-hidroxiletilo y 2-metoxiletilo, dieron lugar a un aumento de la potencia. (21,25)

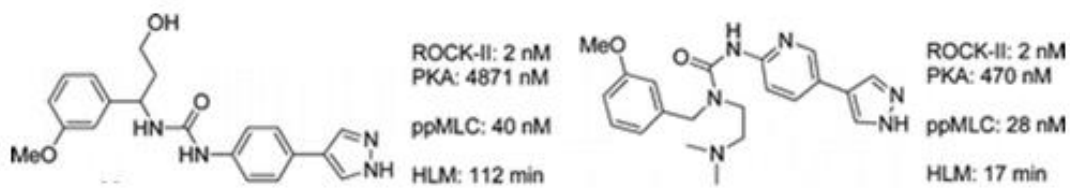


Fig 9. Ejemplos de inhibidores de ROCK derivados de urea (25)

Existen diferentes interacciones responsables de la alta potencia y selectividad de estos inhibidores, el grupo pirazol forma dos enlaces de hidrógeno entre Glu170/Met172, la amina terciaria protonada forma enlaces de hidrógeno con la cadena lateral de carboxilato de Asp176 de ROCK2 y las interacciones hidrofóbicas entre el bencilo y el bucle P. (25)

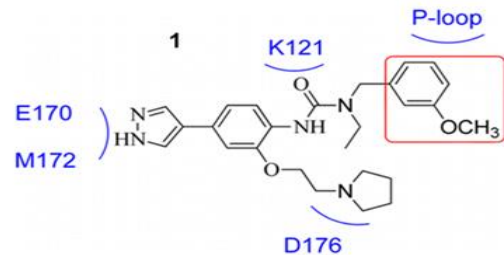


Fig 10. Inhibidor de ROCK derivado de urea y sus interacciones en el sitio de ATP de ROCK2 (25)

4.4 Derivados de tetrahydroisoquinolina

Los inhibidores de ROCK derivados de tetrahydroisoquinolinas son eficaces para el tratamiento del glaucoma. Se modificaron las estructuras de los inhibidores mediante estudios QSAR, y de esta forma se mejoró la potencia, la selectividad y las propiedades farmacocinéticas de los inhibidores. (26)

Para ello, se reemplazó el resto de 3-fluorofenilalanina del inhibidor por diferentes estructuras hasta que se sintetizó la 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-3-carboxamida, que demostró una alta selectividad frente a ROCK. Se investigó la sustitución de grupos donadores de electrones (metoxi y etoxi) y aceptores de electrones (flúor, cloro) en la posición seis de este anillo, así como la quiralidad en la posición tres. Los grupos voluminosos en la posición 6 del anillo de tetrahydroisoquinolina no se acoplaban adecuadamente en el bolsillo de unión de ROCK2, por ello se utilizaron grupos más pequeños como hidrógeno, flúor y metoxi que favorecieron tanto la potencia como la selectividad. La sustitución del grupo metoxi en la posición 6 producía un aumento de la potencia, pero en las posiciones 7 y 8 se reducía la potencia ya que se demostró que no había mucho espacio disponible alrededor de dichas posiciones. La cadena lateral en

el anillo de fenilo central es crítica para la selectividad del inhibidor, por ello se realizaron diferentes sustituciones en posición *orto* a la amida y se observó que los compuestos que tenían una cadena lateral de alcoxi, que contiene una amina terciaria presentaban una selectividad y potencia elevada. (21,26)

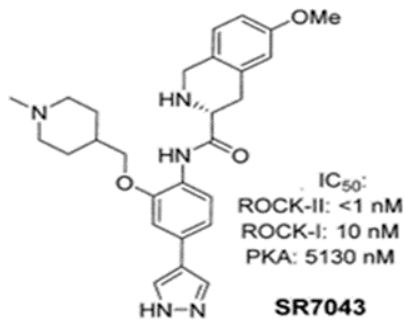


Fig 11. Inhibidor de ROCK basados en tetrahidroisoquinolina (20)

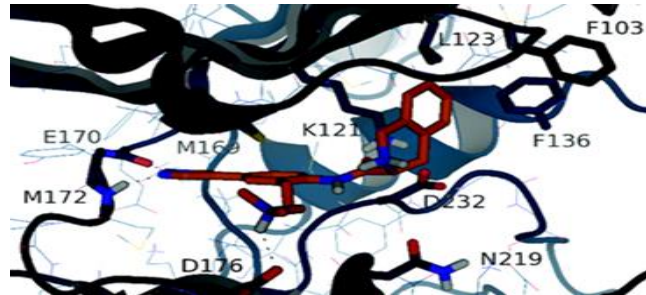


Fig 12. Inhibidor de ROCK derivado de tetrahidroisoquinolina y sus interacciones en el sitio de ATP de ROCK2. (26)

Como se observa en la figura 12, el anillo de pirazol forma dos enlaces de hidrógeno con Glu170 y Met172, el grupo carbonilo forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno de la cadena lateral de Lys121, la amina terciaria de la cadena lateral de dimetilaminoetoxi forma un enlace de hidrógeno muy importante con la cadena lateral de carboxilato de Asp176. Esta interacción explica la alta selectividad del compuesto. Por último, se establecen interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático de la tetrahidroisoquinolina y los residuos Phe103, Ala102, Leu123 y Phe136 que se encuentran en el bucle P. (21,26)

4.5 Derivados de pirazol

Los inhibidores basados en la estructura amidofenilpirazol se desarrollaron a partir de la optimización de una amida que contenía un sistema de piridina-tiazol, descubierto por The Scripps Research Institute en procesos de cribado de alto rendimiento. En estas estructuras se reemplazó el grupo tiazol central por un anillo de fenilo, lo que supuso una disminución de la potencia. A continuación, sobre este sistema de piridina-fenilo se reemplazó la piridina por un pirazol, de forma que la nueva estructura (pirazol-fenilo) dio lugar a un aumento de la potencia. Para mejorar la selectividad hacia ROCK2 se introdujo un resto dimetilaminoetoxi en el anillo de fenilo. El derivado de benzodioxano 3'-carboxamida (**SR3677**), además de presentar una elevada potencia inhibidora de ROCK, se demostró que era capaz de reducir la actividad de la β -secretasa 1 (BACE1) en modelos de ratón, enzima que en la enfermedad del Alzheimer es la encargada de la formación de β -amiloide. (20,21,27)

El grupo pirazol forma dos enlaces de hidrógeno, el primero entre el grupo carbonilo principal del Glu170 y el hidrógeno del nitrógeno tipo azol y el segundo enlace entre el grupo amino principal de Met172 y el nitrógeno contiguo tipo piridínico. En la región de unión a fosfato, el carbonilo de la amida y la cadena lateral de amina de Lys121 forman otro enlace de hidrógeno. Este inhibidor tiene una elevada potencia, probablemente por al enlace de hidrógeno adicional que existe entre la amina terciaria del grupo dimetilaminoetoxi y la cadena lateral de carboxilato del Asp176. También las interacciones hidrofóbicas que tienen lugar entre el benzodioxano y el bucle P contribuyen al aumento de la potencia. (21,27)

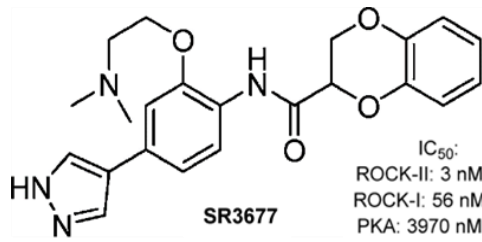


Fig 13. Inhibidor derivado de pirazol (20)

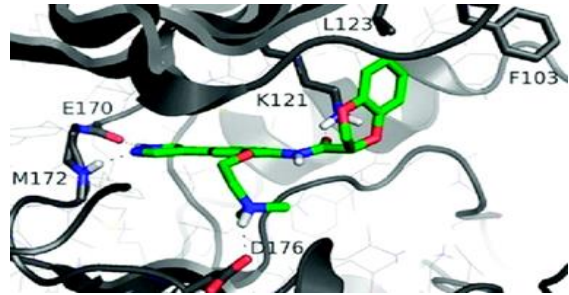


Fig 14. SR3677 y sus interacciones en el sitio de ATP de ROCK2. (27)

4.6 Derivados de benzimidazol y benzoxazol

Los inhibidores derivados de benzimidazol y benzoxazol tienen una elevada afinidad por ROCK2. La introducción de 2-aminopirimidina en la posición 6 del heterociclo nitrogenado, aumenta significativamente la selectividad por ROCK2. Cuando un anillo de 3'-ilcromano se une directamente a la posición 2 del núcleo de benzimidazol, se obtiene una potencia menor hacia ROCK2. En el anillo de cromano se realizaron distintas sustituciones en la posición 6, y se observó que la introducción de un grupo metoxi o de un grupo carboxamida aumenta la selectividad, mientras que los grupos alcoxi más grandes no son tolerados. La afinidad mejora al reemplazar el grupo amida por un éster. (20,21,28)

El sustituyente 2-aminopirimidina forma dos enlaces de hidrógeno con Glu170 y Met172, e interacciones hidrofóbicas entre el anillo de cromano y el bucle P que contiene Phe103, Ala102, Leu123 y Lys121. Además, a través de moléculas de agua se puede producir una interacción con las cadenas laterales de Lys121 y Asp232. (28)

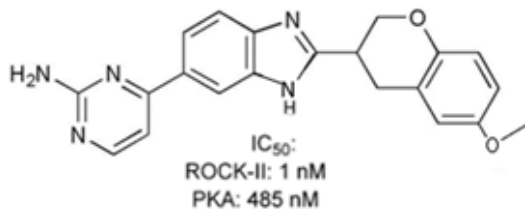


Fig. 15 Inhibidor derivado de benzoxazol y benzimidazol (20)

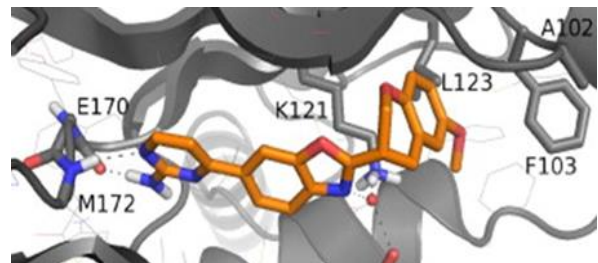


Fig.16 Inhibidor de ROCK derivado de benzimidazol y benzoxazol y sus interacciones en el sitio de ATP de ROCK2. (28)

4.7 Derivados de benzotiazoles

El anillo de benzotiazol es más grande que los anillos de benzoxazol y benzimidazol, por ello presenta diferentes propiedades. Cuando un resto 2-aminopirimidina se introduce en la posición 6 del anillo de benzotiazol, disminuye la selectividad hacia ROCK2. Cuando se reemplaza el resto 2-aminopirimidina por un grupo pirazol se obtiene un aumento de la potencia. En el anillo de cromano, la introducción en la posición 6 de un grupo metoxi o de una carboxamida permitió obtener compuestos con una alta afinidad por ROCK2, como el **SR6074**. Al reemplazar el resto cromano con grupos aquirales se descubrió que las bencil carboxamidas formaban inhibidores de ROCK2 potentes y selectivos. La alquilación de la amida por grupos alquilo simples como metilo, etilo y ciclopropilo disminuyó la inhibición de ROCK2, pero la sustitución con grupos que poseen heteroátomos dio lugar a inhibidores muy

potentes, como es el caso del inhibidor **SR6494** que presenta un grupo dimetilaminoetilo. (21,29)

El grupo pirazol forma dos enlaces de hidrógeno con Glu170 y Met172. El tercer enlace de hidrógeno se forma entre el carbonilo de la amida y la cadena lateral de amina de Lys121 en la región de unión a fosfato. Se forma un cuarto enlace de hidrógeno entre el grupo carbonilo de Asp232 y la amina terciaria protonada del resto dimetilaminoetilo del inhibidor. Entre el bucle P, que está formado por Phe103, Leu123 y Phe136 y las bencil carboxamidas se forman interacciones hidrofóbicas que favorecen la potencia del inhibidor. (21,29)

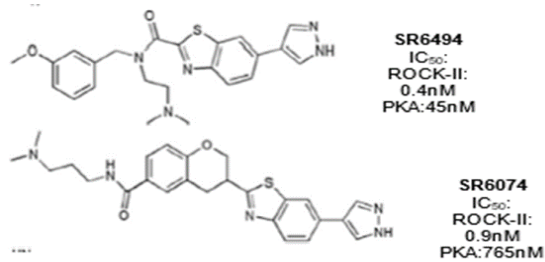


Fig 17. Inhibidores derivados de benzotiazol (21)

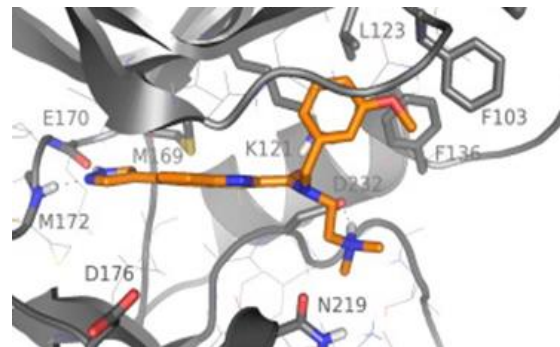


Fig 18. SR6494 y sus interacciones en el sitio de ATP de ROCK-II (29)

4.8 Derivados de indoles y 7-azaindoles

Los inhibidores de ROCK basados en indol 2- y 3-carboxamidas y sus análogos 7-azaindol poseen una alta selectividad hacia ROCK2. Se observó que el sustituyente más efectivo en la posición 6 era un grupo pirazol, que forma un enlace de hidrógeno con la región bisagra. El mejor sustituyente en la posición 3 de la bencilamida es el grupo metoxi para interactuar con el bucle P. Con esta estructura se obtienen potentes inhibidores de ROCK como **SR8363**. Otros estudios analizaron los cambios que se producen en la potencia de los inhibidores al incorporar cadenas laterales en diferentes posiciones. En los inhibidores de la serie 2-carboxamida los sustituyentes sobre el nitrógeno del indol no se toleran, mientras que la sustitución sobre la amida por grupos con capacidad de formar enlaces de hidrógeno da lugar a un aumento de la selectividad. La incorporación de cadenas laterales polares en la posición 3 del indol aumentó la afinidad por ROCK2, como es el caso de **SR7309** que presenta como sustituyente un grupo dimetilaminometilo. En los inhibidores de 3-carboxamida, la sustitución sobre la amida proporciona los mismos resultados que en los inhibidores anteriores. La sustitución en el nitrógeno del indol por cualquier tipo de sustituyente, es decir, independientemente del tamaño y de la capacidad o no de formar enlaces de hidrogeno, aumentó la potencia, como por ejemplo el inhibidor **SR6781**. (21,30,31)

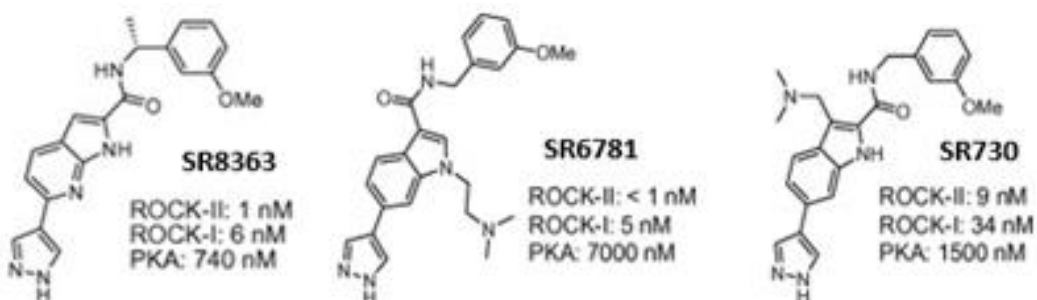


Fig 19. Inhibidores derivados de indoles y 7-azaindoles (30,31)

Para analizar las interacciones se han propuesto dos orientaciones invertidas del núcleo de indol. En las 2-carboxamidas, el indol se proyecta lejos de Asp-176 de ROCK2, por ello no hay espacio para introducir un grupo alquilo grande. En las 3-carboxamidas, el indol se proyecta hacia Asp-176, y de esta forma se obtiene más espacio y el nitrógeno del indol puede ser sustituido. Ambas orientaciones permiten que el pirazol forme enlaces de hidrógeno con Glu170 y Met172, así como la formación del enlace de hidrogeno entre el carbonilo de la amida y el grupo amino de la cadena lateral de Lys121. (30,31)

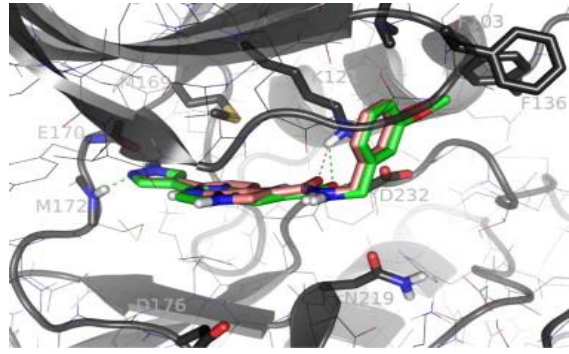


Fig. 20 Inhibidor derivados de 7-azaindol 2- (color verde) y 3-carboxamidas (color rosa) y sus interacciones con ROCK2 (30)

4.9 Derivados de 4-quinazolinonas

Para optimizar la estructura de los inhibidores derivados de 4-quinazolinonas se llevaron a cabo modelos de relación estructura-actividad. Se probaron distintos sustituyentes en la posición 6 de la quinazolinona, hasta que se observó que con el grupo pirazol se obtenían los mejores resultados. Al introducir en la posición 2 de la quinazolinona el grupo benzodioxano se obtiene un inhibidor con una elevada selectividad hacia ROCK2, pero también hacia ROCK1 y PKA. Por ello, al sustituir el grupo benzodioxano por 6'-metoxi-3'-cromano se produce el inhibidor **SR8046** que tiene una elevada potencia frente a ROCK2 y menos hacia ROCK1 y PKA. La actividad inhibitoria sobre PKA se puede disminuir aún más mediante la introducción de un grupo de alcoxi en la posición 8 de la quinazolinona, como lo demuestra el inhibidor **SR6246**. Cuanto más grande sea el grupo alcoxi, más baja es la inhibición de PKA. La introducción de una cadena lateral de dimetilaminoetoxi, ya sea en la posición 8 de la quinazolinona o en la posición 6' del cromano, aumenta la potencia de inhibición contra ROCK2 alrededor de 10 o 12 veces más que sobre ROCK1. (20,32)

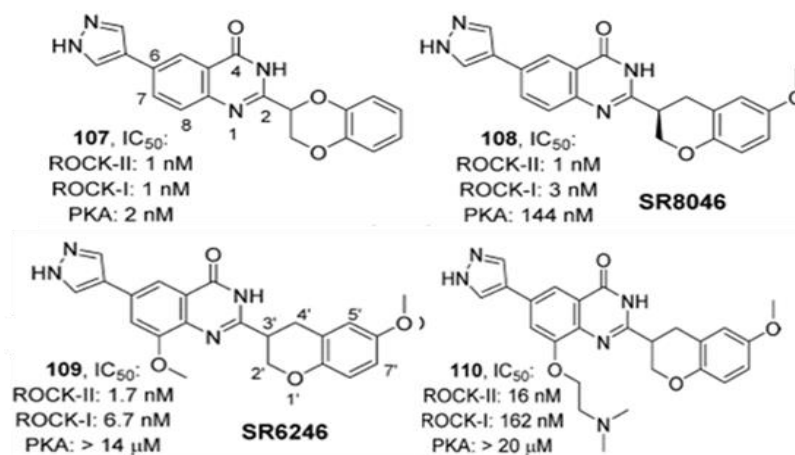


Fig 21. Inhibidores de ROCK derivados de 4-quinazolinonas (20)

El grupo pirazol forma dos enlaces de hidrógeno con Glu170 y Met172. El carbonilo de la amida y la cadena lateral de amina de Lys121 interaccionan a través de un enlace de

hidrógeno. Se forma un cuarto enlace de hidrógeno entre el grupo carbonilo de Asp232 y el nitrógeno de la amida. El sustituyente en la posición 8 de la quinazolinona se une al bucle catalítico, mientras que el grupo de la posición 6' del anillo de cromano interacciona con los residuos hidrofóbicos del bucle P. (32)

4. CONCLUSIÓN

La sobreexpresión de ROCK2 causa la degeneración de neuronas dopaminérgicas, dando lugar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson. La inhibición de ROCK2 se ha establecido como una estrategia clave para el tratamiento. Se han desarrollado numerosos inhibidores derivados de estructuras variadas, siendo el principal inconveniente la falta de selectividad hacia ROCK2 provocada por la inhibición de otras quinasas y con ello la aparición de efectos secundarios. Por ello, se han utilizado estudios QSAR para optimizar las estructuras de los inhibidores y mejorar así la potencia y selectividad hacia ROCK2. También es importante analizar los aminoácidos que conforman el sitio de unión de ATP de ROCK2 para conseguir reforzar las interacciones con él. Aunque actualmente todavía no se dispone de un inhibidor totalmente eficaz, los estudios realizados en modelos de animales han demostrado que estos compuestos son una terapia prometedora para el tratamiento del Parkinson.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Jurado, M.^a A.; Mataró M.; Pueyo, R. Neuropsicología de las enfermedades neurodegenerativas. **2013**;239.
2. Ministerio de Sanidad. Estrategia en Enfermedades Raras del Sistema Nacional de Salud [Internet]. **2016**. Disponible en: <https://www.mssi.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/enfermedadesRaras.htm>
3. Estudio de las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social . Prevalencia y costes de las enfermedades neurodegenerativas. Febrero **2016**. Neuroalianza y UCM.
4. García, I. Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador para enfermedades neurodegenerativas. Tesis doctoral. **2014**. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Orgánica I. Universidad Complutense de Madrid.
5. Koch, J.C., 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**;189:1–21.
Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.008>
6. Joglar, B. Sistema Renina-Angiotensina y degeneración dopaminérgica: Papel de la activación microglial, el complejo NADPH-oxidasa y canales de potasio mitocondriales dependientes de ATP. Implicaciones en neuroprotección. Sistema Renina-Angiotensina y degeneración. **2012**. Facultad de Medicina. Departamento de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela.
Disponible en: <http://hdl.handle.net/10347/6253>
7. Julian, L., Olson, M.F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases*. **2014**;5(2):e29846. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4161/sgtp.29846>
8. Pan, P., Shen, M., Yu H., Li, Y., Li, D., Hou, T. Advances in the development of Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitors. *Drug Discovery Today*. **2013**;18(23–24):11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.09.010>
9. Roser, A.E., Tönges, L., Lingor, P. Modulation of microglial activity by rho-kinase (rock) inhibition as therapeutic strategy in parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Front Aging Neurosci*. **2017**;9:1–8. Disponible en: 10.3389/fnagi.2017.00094
10. Tang, Y., Le, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. **2016**;53(2):1181–94. Disponible en: 10.1007/s12035-014-9070-5
11. Hensel, N., Rademacher, S., Claus, P. Chatting with the neighbors: Crosstalk between Rho-kinase (ROCK) and other signaling pathways for treatment of neurological disorders. *Front Neurosci*. **2015**;9:10. Disponible en: 10.3389/fnins.2015.00198

12. Rodriguez-Perez, Al., Borrajo, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M.J., Labandeira-Garcia, J.L. Interaction between NADPH-oxidase and Rho-kinase in angiotensin II-induced microglial activation. *Glia*. **2015**;63(3):466–82. Disponible en: 10.1002/glia.22765
13. Liu, J., Wada, Y., Katsura, M., Tozawa, H., Erwin, N., Kapron, C.M., et al. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) in molecular regulation of angiogenesis. *Theranostics*. **2018**;8(21):6053–69. Disponible en: 10.7150/thno.30305
14. Liu, J., Liu, W., Yang, H. Balancing apoptosis and autophagy for parkinson's disease therapy: Targeting BCL-2. *ACS Chem. Neurosci*. **2019**;10(2):792-802. Disponible en: 10.1021/acscchemneuro.8b00356
15. Shi J., Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **2007**;55(2):61-75. Disponible en:10.1007/s00005-007-0009-7
16. Raj, S.N., Dilnashin, H., Birla, H., et al. The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotox Res*. **2019**;35(3):775-795. Disponible en: 10.1007/s12640-019-0003-y
17. Koch, J.C., Tönges, L., Barski, E., Michel, U., Bähr, M., Lingor, P. ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. *Cell Death Dis*. **2014**;5(5):1–12. Disponible en: 10.1038/cddis.2014.191
18. Zhang, J.N., Koch, J.C. Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration. *Neural. Regen. Res*. **2017**;12(5):6.
19. Cai, C., Wu, Q., Luo, Y., et al. In silico prediction of ROCK-II inhibitors by different classification approaches. *Mol. Divers*. **2017**;21(4):791-807. Disponible en: 10.1007/s11030-017-9772-5
20. Feng, Y.,LoGrasso, P.V.,Defert,O., Li,R. Rho kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potencial. *J. Med. Chem*. **2016**;59(6):2269-2300. Disponible en: 10.1021/acs.jmedchem.5b00683
21. Shah, S., Savjani, J. A review on ROCK-II inhibitors: From molecular modelling to synthesis. *Bioorg Med Chem Lett*. **2016**;26(10):238-2391. Disponible en: 10.1016/j.bmcl.2016.03.113
22. Yamamoto, K., Maruyama, K., Himori, N., et al. The novel Rho kinase (ROCK) inhibitor K-115: a new candidate drug for neuroprotective treatment in glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **2014**;55(11):7126-7136. Disponible en: 10.1167/iovs.13-13842
23. 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.Disponible en: 10.1016/j.str.2005.11.024
24. Yamaguchi, H., Miwa, Y., Kasa, M., et al. Structural basis for induced-fit binding of Rho-kinase to the inhibitor Y-27632. *J. Biochem*. **2006**;140(3):305-311. Disponible en: :10.1093/jb/mvj172
25. Yin, Y., Lin, L., Ruiz, C., et al. Synthesis and biological evaluation of urea derivatives as highly potent and selective rho kinase inhibitors. *J. Med. Chem*. **2013**;56(9):3568-3581. Disponible en:10.1021/jm400062r
26. Fang, X., Yin, Y., Chen, Y.T., et al. Tetrahydroisoquinoline derivatives as highly selective and potent Rho kinase inhibitors. *J. Med. Chem*. **2010**;53(15):5727-5737. Disponible en: 10.1021/jm100579r
27. Feng, Y., Yin, Y., Weiser, A., et al. Discovery of substituted 4-(pyrazol-4-yl)-phenylbenzodioxane-2-carboxamides as potent and highly selective Rho kinase (ROCK-II) inhibitors. *J. Med. Chem*. **2008**;51(21):6642-6645. Disponible en:10.1021/jm800986w
28. Yin, Y., Bannister, T.D., Weiser, A., Griffin, E., et al. Benzimidazole- and benzoxazole-based inhibitors of Rho kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2008**;18(24):6390-6393. Disponible en: 10.1016/j.bmcl.2008.10.095
29. Yin, Y., Lin, L., Ruiz, C., Weiser, A., Griffin, E., et al. Benzothiazoles as Rho-associated kinase (ROCK-II) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2009**;19(23):6686-6690. Disponible en: 10.1016/j.bmcl.2009.09.115
30. Chowdhury, S., Sessions, E.H., Pocas, J.R., et al. Discovery and optimization of indoles and 7-azaindoles as Rho kinase (ROCK) inhibitors (part-I). *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2011**;21(23):7107-7112. Disponible en: 10.1016/j.bmcl.2011.09.083
31. Sessions, E.H., Chowdhury, S., Yin, Y., et al. Discovery and optimization of indole and 7-azaindoles as Rho kinase (ROCK) inhibitors (part-II). *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2011**;21(23):7113-7118. Disponible en: 10.1016/j.bmcl.2011.09.084
32. Chowdhury, S., Chen, Y.T., Fang, X., et al. Amino acid derived quinazolines as Rock/PKA inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2013**;23(6):1592-1599. Disponible en: 10.1016/j.bmcl.2013.01.109