



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Inhibidores de ROCK en el tratamiento de la
Enfermedad de Alzheimer.**

Autor: Sara Solís Cuñado

Fecha: Julio 2020

Tutor: María Pilar López-Alvarado Gutiérrez

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por ser una enfermedad neurodegenerativa cuya prevalencia cada vez es mayor. Los signos patológicos de esta enfermedad son, principalmente, el acúmulo y agregación de proteínas fosforiladas, la degeneración axonal y la disminución de niveles cerebrales de determinados neurotransmisores como la acetilcolina. A pesar de la caracterización de estos mecanismos patológicos, no se han desarrollado terapias que los modifiquen hasta ahora. Los tratamientos actuales se centran en la mejora de los síntomas cognitivos y funcionales como el aprendizaje y la memoria. La búsqueda de nuevas terapias que se centren en la modulación de rutas moleculares y celulares implicadas en estos procesos y que combatan la muerte neuronal, ha descubierto el papel de ciertas proteínas quinasas en la fosforilación y posterior agregación de diversas proteínas en el cerebro. Entre las proteínas quinasas relacionadas con esta patología se encuentra la Rho quinasa (ROCK). Se ha descrito una relevante participación de la vía de señalización celular ROCK, lo que la convierte en una diana prometedora para nuevos enfoques terapéuticos. En este trabajo se hace una revisión del conocimiento que existe hasta ahora sobre el papel de ROCK en la enfermedad de Alzheimer, así como la utilidad de su inhibición. Se detallan las características tanto estructurales como funcionales de ROCK y sus interacciones moleculares, las diferencias entre las dos isoformas ROCKI y ROCKII y se comparan los niveles de expresión tanto de ROCK como de sus productos en situaciones fisiológicas y patológicas. A continuación, se hace una revisión del desarrollo de los inhibidores de ROCK que podrían aplicarse en el tratamiento del Alzheimer. Se describe el mecanismo de acción de los compuestos inhibidores, su estructura e interacciones moleculares con ROCK y los resultados obtenidos de los estudios que se están llevando a cabo con ellos. Comenzando por los que ya han sido aprobados en clínica como el fasudil y el Y-27632 hasta los que se están ensayando en modelos animales y que se postulan como más prometedores que los comercializados, debido a su elevada selectividad frente a ROCK y, por tanto, a la menor aparición de efectos adversos. La obtención de compuestos con una selectividad elevada podría dar lugar a tratamientos eficaces y seguros que podrán utilizarse de manera crónica para tratar el proceso neurodegenerativo en esta enfermedad.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is neurodegenerative disorder that is affecting an increasing population. The main pathological marks are protein accumulation and aggregation, axonal degeneration and decrease of some neurotransmitter such as Acetylcholin. Despite these pathomechanisms have been described, no disease-modifying therapies have been developed so far. Current treatments focus on functional and cognitive symptoms, enhancing learning and memory. The search of new therapies based on modifying molecular and cellular pathways that are involved in these pathological processes has discovered the roll of some protein kinases in the brain protein phosphorylation and later aggregation. Among such kinases, is the Rho kinase (ROCK). A significant involvement of ROCK signaling pathway has been described in these pathological marks making it a promising target for new therapeutic approaches. This essay reviews the knowledge of the involvement of ROCK in Alzheimer's Disease and the utility of its inhibition. Its functional and structural characteristics and its molecular interactions are described in

detail, also the differences between both isoforms ROCKI and ROCKII and the differences of ROCK and its downstream targets' expression under physiological and pathological conditions are compared. Then, a review of the pharmacological ROCK- inhibitors that could be applied to Alzheimer's Disease treatment is carried out. In this review, it is analyzed their mechanism of action, molecular structure and molecular interactions with ROCK. Moreover, the results of the current studies with these drugs are discussed. The review begins with those that have already been approved for clinical use such as Fasudil and Y-27632 and continues revising all available data from those that are being tested in different animal models. Owing to the high selectivity of the latter, the adverse effects are decreased. Therefore, these new highly selective ROCK-inhibitors present more promising prospects for the chronic treatment of Alzheimer's Disease.

2. INTRODUCCIÓN

Las **enfermedades neurodegenerativas** son un grupo de patologías caracterizadas por una disfunción progresiva del Sistema Nervioso Central. Los trastornos neurodegenerativos tienen en común, además del proceso de muerte neuronal progresiva, procesos de inflamación, niveles bajos de determinados neurotransmisores, y modificaciones post-transcripcionales en diferentes proteínas que conllevan a su plegamiento anómalo y/o acumulación en forma de agregados tanto a nivel intracelular como extracelular, dando lugar a la muerte celular¹. Cada enfermedad se caracteriza por afectar una zona concreta del SNC produciendo los síntomas característicos de degeneración de esa área, tratándose estos síntomas principalmente de problemas en el movimiento (ataxias) o en el funcionamiento cognitivo (demencias). Otra característica común es que son de etiología idiopática, es decir, se desconoce la causa que las produce. Además, muchas de estas patologías tienen como factor de riesgo común la edad. Por lo que el aumento de la esperanza de vida y con ello el progresivo envejecimiento de la población en países desarrollados ha supuesto un aumento de la prevalencia en este tipo de enfermedades².

Un estudio de la Organización Española Neuroalianza incluye en las principales enfermedades neurodegenerativas a: la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple y enfermedades neuromusculares³.

Enfermedad de Alzheimer

Centrándonos en la primera, la enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más común. La demencia es una enfermedad neurodegenerativa que conlleva a una pérdida progresiva de las capacidades cognitivas. El Alzheimer, supone entre un 50 % y 70 % de los casos de demencia, presentando una prevalencia mundial de 400 afectados por cada

100.000 habitantes³. Este trastorno, se caracteriza por una disminución de los niveles cerebrales de determinados neurotransmisores, acetilcolina principalmente, dando lugar a una pérdida gradual de memoria hasta la completa incapacidad de los afectados para poder llevar una vida autónoma. También están implícitos otros síntomas como cometer errores semánticos al hablar y/o cambios tanto en el carácter como en la personalidad. A día de hoy se desconoce su etiología por lo que llevar a cabo una prevención efectiva es un objetivo complicado. Se sabe que su principal factor de riesgo es la edad, afectando mayoritariamente a personas mayores de 65 años. La enfermedad de Alzheimer también parece ser más común en las mujeres que en los hombres⁴.

Actualmente, los fármacos que existen para el tratamiento del Alzheimer se centran en mejorar los aspectos cognitivos y funcionales de la enfermedad pero no tienen efecto sobre la progresión de esta. Se utilizan dos tipos de **medicamentos para tratar los síntomas cognitivos**:

1. Inhibidores de la colinesterasa: donezepilo, rivastigmina y galantamina. Estos fármacos incrementan los niveles de acetilcolina al inhibir la enzima que cataliza su hidrólisis. Este neurotransmisor está involucrado en el aprendizaje y la memoria. La mejora es moderada ya que la eficacia de estos fármacos dura aproximadamente un año y funciona en solo la mitad de personas a las que se les prescribe⁵.
2. Memantina. Se trata de un antagonista del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA), el cual regula la actividad del glutamato en el cerebro. Este neurotransmisor también está involucrado en el aprendizaje y la memoria. La unión del glutamato a su receptor en la superficie celular permite que el calcio pase al interior de la célula. Este proceso es importante tanto para la señalización celular como para el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, si se produce una liberación masiva de glutamato por parte de las células, como ocurre con las células dañadas en el Alzheimer, se produce una sobreexposición de calcio crónica que acelera el daño celular. La memantina ayuda a evitar esta cascada al bloquear los receptores NMDA⁶.

Estos tratamientos farmacológicos se combinan con tratamientos no farmacológicos consistentes en la estimulación cognitiva, terapias conductuales, de rehabilitación funcional, lúdicas y de adaptación al entorno y uso de productos de apoyo².

Los **marcadores histopatológicos** que caracterizan al Alzheimer son los depósitos extracelulares que se encuentran en las placas seniles, que están compuestas de péptidos β – amiloide y ovillos neurofibrilares de proteínas tau hiperfosforiladas. Estos depósitos contribuyen al deterioro de la memoria y del aprendizaje que se producen como consecuencia

de la degeneración neuronal y la disfunción sináptica características de esta enfermedad. Los péptidos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$ se producen por enzimas proteolíticas que rompen a la proteína precursora del péptido amiloide (APP). Estas enzimas se conocen con el nombre β - y γ -secretasa. La enzima α -secretasa también presenta actividad proteolítica, sin embargo, como rompe a la APP dentro del dominio βA , no da lugar a péptidos βA como productos de esta lisis. Resultados de distintos estudios en mutaciones genéticas y neurotoxicidad sugieren que tanto los péptidos βA , especialmente las fracciones solubles, como la proteína APP juegan un papel central en la enfermedad de Alzheimer⁷. Las mutaciones en el gen APP también han sido identificadas en el Alzheimer familiar (EAF). Los casos de EAF muestran un mecanismo neuropatológico muy similar a los casos esporádicos de EA. La reducción bien de la producción de βA o de su acumulación es fundamental en las estrategias terapéuticas dirigidas a la modificación de la enfermedad⁸.

La búsqueda de nuevas terapias farmacológicas que combatan los trastornos neurodegenerativos sigue dos vertientes. La primera se centra en prevenir, retardar o paliar la sintomatología que aparece cuando se produce el déficit de los neurotransmisores. La segunda se centra en el estudio de los procesos de muerte neuronal y en la búsqueda de fármacos que modulen las rutas moleculares y celulares implicadas en estos procesos⁹.

Recientemente, ha sido demostrado que ciertas proteínas quinasas se encuentran sobreactivadas e implicadas en la fosforilación y posterior agregación proteica característica de este trastorno. Por ello, se ha planteado la elección de dichas proteínas quinasas como dianas farmacológicas para el tratamiento de estas enfermedades así como intentar descubrir, sintetizar y optimizar sus inhibidores selectivos como candidatos a fármacos eficaces¹.

Las **quinasas** son una familia de proteínas que llevan a cabo la fosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina mediante la transferencia de un grupo fosfato del ATP al residuo correspondiente. Estas enzimas se diferencian en dos grandes grupos. Su clasificación se basa en la especificidad de sustrato por parte de la proteína durante la reacción de fosforilación. El primer grupo está compuesto por proteínas Ser/Thr quinasas. Mientras que el segundo lo conforman proteínas que realizan la fosforilación sobre residuos de tirosina, Tyr quinasas. El factor común de esta familia proteica es la presencia de una región, denominada *dominio catalítico quinasa*, sobre la cual reside la actividad de fosforilación. Este dominio presenta un

plegamiento bilobulado, donde se puede diferenciar una región de pequeño tamaño amino terminal separada de la región de mayor tamaño carboxilo terminal mediante un segmento bisagra de corta longitud. Entre ambos lóbulos existe una profunda cavidad en la que se sitúa el centro activo de la enzima el cual presenta el sitio de unión tanto al ATP como al sustrato específico que va a ser fosforilado¹⁰.

Dada la similitud estructural que comparten en su dominio catalítico, es muy importante centrarse en el concepto de selectividad a la hora de desarrollar inhibidores concretos de una de estas quinasas ya que, de lo contrario, se produciría la inhibición de varias quinasas al mismo tiempo apareciendo numerosos efectos secundarios como consecuencia¹⁰.

Los estudios de estas proteínas quinasas y su relación con el Alzheimer nos muestran que este grupo de enzimas está implicado en el proceso de formación del péptido β -amiloide a partir de la proteína precursora amiloidea (PPA), la fosforilación de la proteína tau, la neuroinflamación y la neurotoxicidad. Entre las proteínas quinasas relacionadas con esta patología, se encuentra la Rho quinasa que está relacionada directamente con el crecimiento neurítico vinculado al proceso de la PPA y la toxicidad de su metabolito β -amiloide¹.

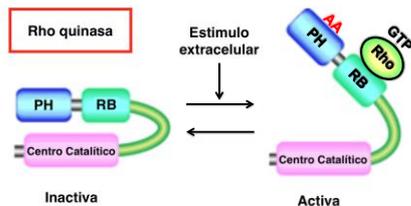
Rho quinasa

La Rho quinasa, más conocida como ROCK, es una serina/treonina quinasa perteneciente al grupo de proteínas quinasa AGC (c-AMP-dependent protein kinase/protein kinase G/protein kinase C)⁹. Han sido identificadas dos formas homólogas de ROCK en los mamíferos, **ROCKI**, también conocida como ROK β , Rho-kinasa β o p160ROCK y **ROCKII**, también llamada ROK α . Las dos isoformas comparten un 64% de identidad en su secuencia aminoacídica primaria, siendo la homología en el dominio quinasa aún mayor, 92%¹¹.

Su dominio catalítico está localizado en la región N-terminal. En el centro de la molécula se encuentra una estructura α -hélice antipática formando una región espiral que contiene el sitio de unión de la proteína Rho. A este último se unen exclusivamente las formas de GTP-RhoA y RhoC. La región C-terminal comprende dos dominios en forma de dedos de zinc ricos en cisteína y un dominio de homología pleckstrina. La elevada similitud entre ambas isoformas dificulta el diseño de inhibidores selectivos para cada una de estas estructuras¹¹.

ROCK, en su forma nativa se encuentra inactivada, debido a una autoinhibición llevada a cabo por la región C-terminal. La activación de la quinasa se produce por una depleción de esta región C-terminal. Otra manera de activar a ROCK es mediante la ya mencionada unión de

GTP-RhoA¹¹. La proteína Rho es un miembro de la subfamilia Rho de las GTPasas, presenta una masa molecular relativamente pequeña y pertenece a la superfamilia de proteínas Ras¹². Puede ser activada mediante la unión a una molécula GTP por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). Cuando se une a GTP, RhoA activa a ROCK dando lugar a cambios conformacionales que irrumpen la función auto-inhibidora de la región C-terminal. Una vez activa, ROCK va a fosforilar una gran variedad de sustratos¹³.



PH: dominio con homología a la pleckstrina. RB: dominio de unión a Rho. AA: ácido araquidónico (membrana)

En ocasiones, la región auto-inhibitoria puede ser permanentemente eliminada mediante la acción de unas proteínas llamadas caspasas para la ROCK1 y mediante granzima-B para ROCKII¹¹.

La vía de señalización Rho/ROCK, es un sistema de transducción de señales considerablemente importante en el sistema nervioso central. Esta vía está involucrada en procesos como el crecimiento celular, diferenciación, migración y desarrollo. Se trata de una de las **principales vías de transducción de señales inhibitorias**. Se ha comprobado que suprime la regeneración del sistema nervioso central en vivo. Por lo tanto, una comprensión de esta vía es esencial para poder avanzar en los estudios de regeneración. Esta vía consta de:

- Proteínas supresoras: glicoproteína asociada a la mielina, factor inhibitorio decrecimiento neuronal (Nogo A, B, C) y glicoproteína oligodendrocítica de mielina.
- Receptores de estas proteínas inhibitorias: receptor Nogo, PIR-B y receptor p75.
- La proteína Rho.
- ROCK.
- Sustratos que van a ser fosforilados por ROCK cuando se activa¹².

Regulación *upstream*

La cascada de señalización Rho/ROCK puede ser activada por varios receptores de membrana como por ejemplo por receptores acoplados a la proteína G, por receptores tirosina quinasa y por receptores intracelulares. En el sistema nervioso central existen, principalmente, tres factores inhibitorios asociados a mielina que son: la glicoproteína asociada a mielina, la

glicoproteína oligodendrocítica asociada a mielina y Nogo. Estos factores ejercen efectos inhibitorios frente al crecimiento neuronal. También se ha visto que varias citoquinas y mediadores inflamatorios son capaces de transformar a Rho en su forma activa GTP-Rho y por tanto, activando la cascada Rho/ROCK¹². ROCK también puede ser activada independientemente de Rho a través de transfosforilación en el extremo amino terminal¹⁴.

Regulación *downstream*

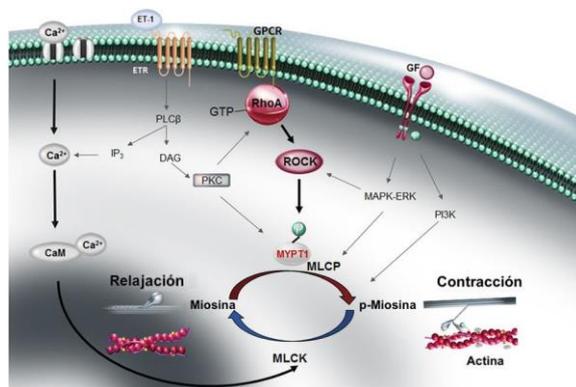
Rho/ROCK, una vez activada, interacciona con moléculas efectoras *downstream*, desencadenando cascadas de señalización específicas. Muchas de estas moléculas juegan papeles principales en la regulación de la forma celular y la movilidad así como en la supervivencia y la apoptosis.

Uno de los efectos más importantes de la ROCK activada es la **regulación del citoesqueleto de actina-miosina**. ROCK fosforila a LIM quinasa, activándola. LIM quinasa, una vez activada, fosforila a la cofilina. La cofilina es un factor despolimerizante de actina que lleva a cabo la ruptura de miofilamentos, despolimeriza las cadenas de actina y promueve el crecimiento de las neuritas. Cuando la cofilina es fosforilada se inactiva, por lo que la fosforilación de ROCK da lugar a un aumento en el número de filamentos estables de actina y en la formación de las espinas dendríticas.

Otra vía clásica en la que interviene ROCK es la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC). ROCK puede fosforilar a MLC de manera directa o bien de manera indirecta fosforilando a MLC fosfatasa. La fosforilación de MLC fosfatasa la deja inactivada y por tanto ya no lleva a cabo la defosforilación de MLC.

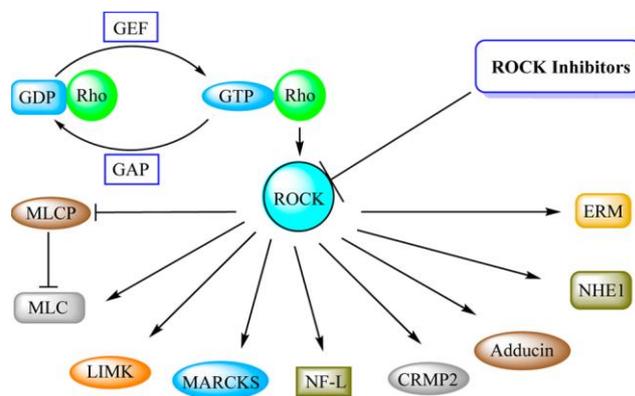
A través de ambas vías, ROCK aumenta los niveles citoplasmáticos de MLC fosforilada, promoviendo por lo tanto la interacción entre miosina y actina. Esta interacción incrementada da lugar a una reorganización citoesquelética que conlleva a un colapso del cono de crecimiento y una retracción de las neuritas¹¹.

La proteína mediadora de la respuesta a colapsina (CRMP-2) es otro efector *downstream* de ROCK. Esta proteína promueve el ensamblaje de los microtúbulos. También regula la polaridad de la célula y su diferenciación y contribuye notablemente en la regeneración axonal. La

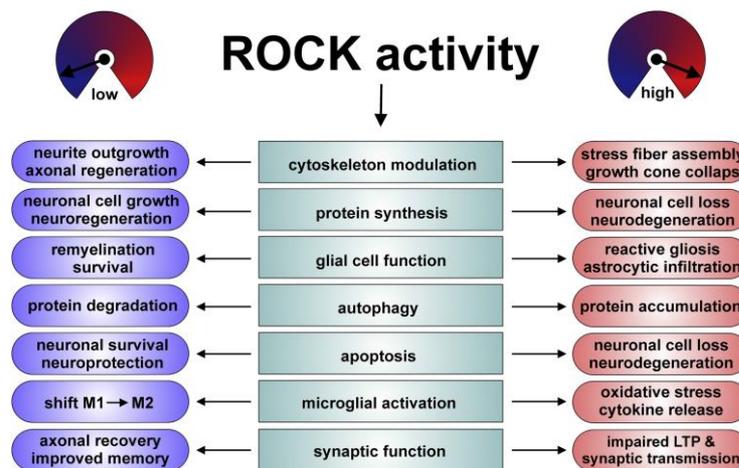


fosforilación de CRMP-2 por ROCKII, inhibe sus funciones y da paso al colapso del cono de crecimiento¹¹.

Otra diana importante de ROCK es PTEN, que es directamente activado tras ser fosforilado por ROCK. PTEN activado inhibe fosfatidilinositol(3,4,5)-trifosfato, que se trata de un activador importante de la actividad Akt/PKB. A través de esta vía, ROCK no solo es capaz de inhibir Akt sino también mTORC₁ (diana de rapamicina en células de mamífero del complejo 1 o mammalian target of rapamycincomplex1), que son ambos reguladores positivos de la síntesis de proteínas, del crecimiento celular y de la regeneración celular¹¹. ROCK puede ser autofosforilada, modulando su función¹⁴.



En su conjunto, la activación de ROCK conlleva a la fosforilación de diversas proteínas que presentan un papel central en la regulación, obteniéndose como resultado final, un descenso en el crecimiento celular, formación de fibras de tensión, colapso del cono de crecimiento, retracción de las neuritas e inducción de la apoptosis¹¹.



Isoformas de ROCK

Ambas isoformas se expresan a lo largo de la embriogénesis y están presentes en tejidos humanos adultos. Sin embargo, hay diferencias destacables en cuanto a los niveles de expresión de cada isoforma en los distintos tejidos. Mientras ROCKI predomina en órganos no neuronales como en el hígado, pulmones, testículos, sangre y en el sistema inmune, ROCKII, se encuentra mayoritariamente en neuronas, corazón y células de la musculatura lisa¹¹.

Sin embargo, un estudio de Lizuka¹⁵, ha proporcionado un mapa esquemático de los niveles de expresión de ambas isoformas en los distintos tejidos de ratones adultos. Se ha observado que ROCKI estaba presente en las células de la glía mientras que ROCKII se restringía a las neuronas. También se observó que la expresión de ROCK en el cerebro iba aumentando a medida que dichos ratones iban envejeciendo, pudiéndose considerar la edad como un factor de riesgo¹¹. En línea con estas observaciones, un mayor número de células positivas para ROCK fueron cuantificadas en cerebros humanos de sujetos de mayor edad comparándolos con controles más jóvenes¹¹. Sin embargo, a pesar de que las dos isoformas presentan una distribución tisular claramente distinta, pocas diferencias funcionales se han caracterizado entre ellas. Una de estas diferencias funcionales entre ROCKI y ROCKII se observa durante el proceso de eliminación de genes de ROCKI o de ROCKII en experimentos con ratones. En la mayoría de ratones con deficiencia de ROCKII ocurre muerte embrionaria debido a un defecto en la trombosis placentaria. Mientras que en los ratones a los que se les hizo un silenciamiento de la proteína ROCKI se detectaron fallos en el cierre de los párpados y defectos en la pared ventral. Tras un análisis detallado se observó que los fallos fenotípicos asociados al silenciamiento de ROCKI también se producían si se silenciaba ROCKII, lo que sugiere que ambas isoformas participan en algunos aspectos de determinadas funciones biológicas de la misma manera. Es importante destacar que después de superar los problemas perinatales tanto los ratones con deficiencia de ROCKI como los que presentaban deficiencia de ROCKII se desarrollaron sin sufrir ningún tipo de anomalía funcional o anatómica. Estos datos indican que ROCK actúa de manera esencial durante el estado de desarrollo⁷.

Inhibidores de ROCK

Durante los últimos años se han desarrollado un gran número de inhibidores de ROCK. Los inhibidores de la familia de las quinasas, a la que pertenece Rho quinasa se clasifican en cuatro clases basándose en su mecanismo de acción. La mayoría, pertenecen a la clase I tratándose de inhibidores competitivos de ATP. Es decir, bloquean la transferencia del grupo fosfato

terminal desde el ATP hasta el residuo aceptor. De la clase II, se conocen nueve inhibidores que estabilizan una conformación inactiva de la quinasa. La clase III la forma, de momento, una sola molécula, que se trata de un inhibidor alostérico altamente selectivo. Su nombre es trametinib. Y por último, los compuestos de clase IV se trata de inhibidores covalentes.

Hasta la fecha, solo dos inhibidores de ROCK han sido aprobados para su uso clínico, tanto en Japón como en China. El fasudil fue aprobado en 1995 para el tratamiento de vasoespasm cerebral y el ripasudil fue aprobado en 2014 para el tratamiento del glaucoma¹³.

La principal desventaja de los inhibidores de ROCK es su incompleta especificidad frente a su diana, lo que implica una regulación de otras quinasas, dando lugar a la aparición de otros efectos debido a esa regulación adicional de otras vías celulares y que, como consecuencia, enmascaran los efectos sobre la quinasa original. Por este motivo, el desarrollo de inhibidores selectivos frente a ROCK está siendo uno de los principales enfoques para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Relación de la vía de señalización Wnt y la enfermedad de Alzheimer.

Los ligandos Wnt son una familia de glicoproteínas constituida por 19 miembros. La unión de estos ligandos a sus distintos receptores o co-receptores produce la transducción de señales. Las proteínas Wnt modulan dos vías de señalización: La vía canónica/ β -catetina y la vía no canónica/PCP. Se ha demostrado que esta familia de proteínas participa tanto en el desarrollo del SNC como en la fisiología de éste una vez desarrollado. Sus distintos componentes regulan procesos como la neurogénesis, la sinápsis o el mantenimiento de la barrera hematoencefálica. Distintos experimentos apuntan a una relación entre las alteraciones de las vías de señalización Wnt y la aparición y/o progresión de distintas enfermedades neurológicas como el Alzheimer¹⁶.

Durante la sinapsis fisiológica, las vías de señalización Wnt-beta-catetina (o vía canónica) y Wnt-PCP (o vía no canónica), que presentan funciones antagonistas, actúan de manera coordinada para así mantener la homeostasis sináptica. Se ha visto que APP participa en la regulación de la señalización Wnt. APP es un co-activador tanto de la vía Wnt-beta-catetina como de Wnt-PCP a través de su interacción específica con las proteínas co-receptoras de Wnt LRPD-6 (LDL-receptor related protein6) y Vangl2 (van Gogh-like2) respectivamente. Cuando se dan las condiciones que promueven la señalización Wnt por beta-catetina, se estimula la estabilidad sináptica y se reduce la producción de A β . Sin embargo, la activación de la

señalización Wnt-PCP conlleva a la retracción sináptica y a su vez se produce un aumento de la producción de A β . Además, se ha identificado como pieza clave en la enfermedad de Alzheimer a la proteína Dickkopf-1 (Dkk1), observándose niveles elevados de esta proteína en muestras cerebrales post-mortem de pacientes con EA. Dkk-1 dirige múltiples aspectos de la neurotoxicidad mediada por A β , a través de su efecto sobre la vía de señalización Wnt¹⁷.

Dkk1 actúa como un inhibidor de la vía Wnt-beta-catetina e induce además la activación de la vía Wnt-PCP. Este dato muestra una clara relación entre la pérdida sináptica y el incremento de la producción A β , ambos procesos inducidos por Dkk1. Existe por lo tanto, un bucle de retroalimentación positiva entre Dkk1 y A β ¹⁷.

Para confirmar todo esto se hicieron ensayos de genes en las células HEK293A, donde efectivamente, se afirmó la participación de APP en la regulación de la señalización Wnt. En estos ensayos se vio como la proteína APP estimula a Wnt3a (precursor de la vía canónica) o a Wnt5a (precursor no canónico) en función de las necesidades sinápticas.

Se han evaluado los efectos que produce APP sobre la modulación de Dkk1 en las dos vías de señalización Wnt. La sobreexpresión de APP potencia los efectos de Dkk1 sobre ambas vías Wnt. Por lo tanto, se plantea que la sinaptotoxicidad de Dkk1 depende de APP. Para confirmarlo se trataron con Dkk1 exógeno cultivos neuronales primarios de ratones APP+/+ y APP-/- . Los cultivos APP+/+ mostraron una clara reducción del número de espinas dendríticas, mientras que el déficit de APP protegió a las neuronas APP-/- frente a la toxicidad mediada por Dkk1¹⁸. La clara participación de APP en la señalización Wnt cuestiona si las mutaciones familiares de la EA en APP podrían afectar a su función en la señalización Wnt y por lo tanto a su función en la regulación de la formación y estabilidad sináptica. Se utilizaron los ensayos de los genes en las células HEK293A y se compararon los efectos de la APP tipo silvestre (APP₆₉₅) con los efectos de la forma mutante (APP^{swe}). Esta última, no potenciaba ambas vías sino que se comportaba como antagonista de la vía canónica y como agonista de la vía no canónica de forma más potente que la forma silvestre¹⁷.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre los avances que ha habido en la investigación y desarrollo de nuevas estructuras de inhibidores selectivos y no selectivos de ROCKII. De tal modo, que el desarrollo de nuevos fármacos selectivos se puedan emplear como terapia en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de

Alzheimer, sin que se vean afectadas otras quinasas y por tanto evitando la aparición de efectos adversos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica de distintos artículos científicos a través de diferentes bases de datos como Pubmed, y Scindirect y GoogleScholar.

Se escogieron los artículos 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 analizar los distintos tipos de inhibidores de Rho quinasas.

Las palabras clave utilizadas en dicha búsqueda fueron: "ROCK and neurodegenerative disease", "Alzheimer Disease", "Rho kinase inhibitors", "fasudil".

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Inhibidores de Rho quinasas como potenciales fármacos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

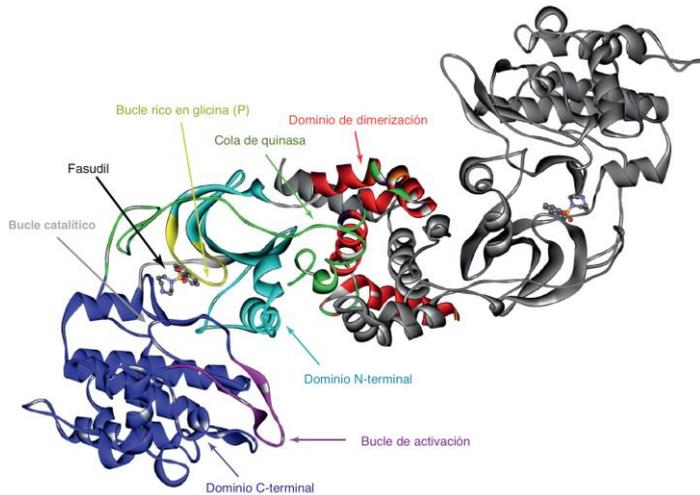
Como ya se ha comentado anteriormente, no se han observado grandes diferencias entre las dos isoenzimas de ROCK, ni a nivel funcional ni a nivel estructural. Además de la elevada similitud que presentan en la secuencia aminoacídica del dominio al que se une el ATP (92%), ambas isoformas han demostrado cristalizar de la misma manera, formando una estructura de dímero *N*-terminal cabeza a cabeza (*N*-terminal head-to-head dimer)¹⁸.

Dadas todas las similitudes entre ambas estructuras, es importante la búsqueda de aspectos que las diferencien. De esta manera se podría llevar a cabo la síntesis de inhibidores selectivos de cada isoforma, ya que disponiendo de inhibidores selectivos de ROCKII, se podrían aplicar a un amplio rango de trastornos del sistema nervioso central. Esta selectividad permitiría que la actividad de estos fármacos se desarrollara sin preocupaciones de seguridad por actuación frente a ROCKI o frente a otras quinasas¹⁹.

Los inhibidores de ROCK se dividen en distintos grupos: derivados de isoquinolina, derivados de aminopirimidina, derivados del indazol, derivados de la pirazol, derivados de la urea y otros¹⁹.

Los derivados de isoquinolina y de aminopirimidina son inhibidores clásicos de ROCK. La mayoría de los inhibidores que pertenecen a estos dos grupos son de tipo I, compiten con el ATP para unirse. El bolsillo de unión del ATP está rodeado por los lóbulos *C*-terminal y *N*-terminal. En la interfaz de ambos lóbulos aparece un sitio de unión en forma de ranura. Además, está rodeado de la región bisagra, el bucle rico en glicina y el bucle de activación. El sitio de unión del ATP tiene tres regiones: la región adenina (A), región furanosa (F) y región

distal (D). La región adenina es hidrofóbica y se localiza en la parte inferior del bolsillo. En ella se forma un enlace de hidrógeno entre la región adenina y la adenina del anillo del ATP. Sobre la región adenina está la región de furanosa, con forma esférica. También es una zona hidrofóbica y a ella se une al anillo de furanosa del ATP. La región distal interacciona con el grupo ácido fosfórico del ATP¹⁹.

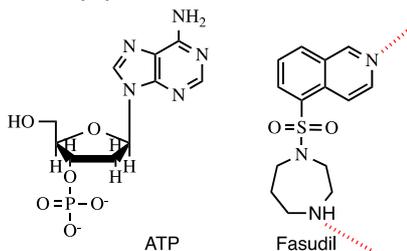


Inhibidores derivados de isoquinolina: fasudil

Los inhibidores basados en la estructura de la isoquinolina tienen como representante al fasudil.

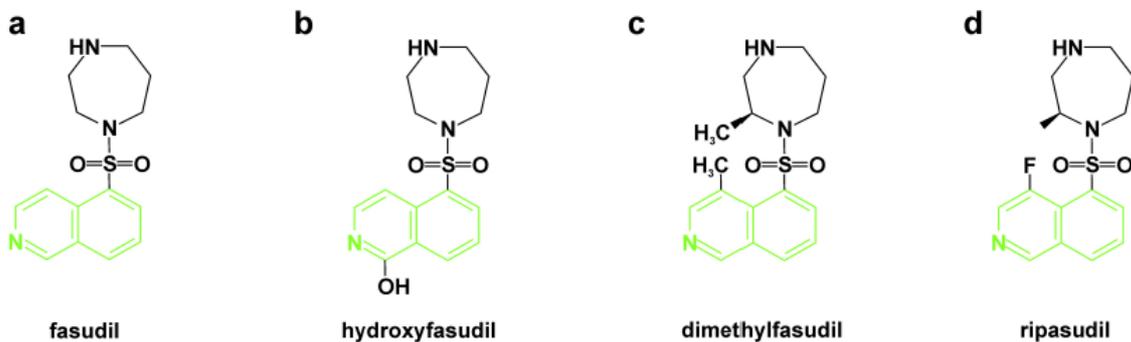
El fasudil no solo fue el primer Inhibidor de ROCK en desarrollarse sino también el primer inhibidor de quinasas aprobado para su uso clínico en el vasoespasma cerebral en China y Japón.

La estructura química del fármaco fasudil consiste en un anillo de isoquinolina que se conecta a través de un grupo sulfonilo a un anillo de homopiperazina. Este fármaco se une a la región bisagra de ambas isoformas, ROCKI y ROCKII¹¹. En la siguiente figura, se observa como el anillo isoquinolínico del fasudil se asemeja al anillo de adenina del ATP. El nitrógeno isoquinolínico del fasudil forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno del grupo amida del aminoácido Met¹⁵⁶. El resto de la estructura del fármaco ocupa el sitio de unión de la ribosa donde se produce un enlace de hidrógeno entre el carbonilo de la cadena lateral del residuo Asp¹⁶⁰ y la amina secundaria del anillo de homopiperazina del fasudil¹⁹.



Los valores de CI_{50} frente a ROCKI y ROCKII son de $0,26 \mu M$ y $0,32 \mu M$ respectivamente⁷. Pero también afecta a otras quinasas.

En vivo, el fasudil está sujeto a metabolismo hepático, donde se metaboliza a hidroxifasudil. Su metabolito activo es ligeramente más potente, sin embargo, tampoco presenta selectividad frente a ROCK actuando frente a otras quinasas como PKC o MLCK. Una mayor optimización de la estructura del fasudil dio lugar al desarrollo de un inhibidor de ROCK más potente que los anteriores, el dimetilfasudil (H-1152P) con valores de $K_i = 1,6 nM$. En 2014, ripasudil otro análogo de fasudil, fue aprobado para el tratamiento del glaucoma. Este último presenta actividad frente a ambas isoformas, aunque presenta mayor actividad frente a ROCKI¹¹.



En la enfermedad de Alzheimer, además de la muerte neuronal y la acumulación anómala de proteínas, se produce una evidente alteración de las espinas dendríticas. La degradación dendrítica y la disminución de la densidad espinosa se han observado principalmente en la corteza y en el hipocampo²⁰.

La **vía de señalización PCP-Wnt** actúa también a través de la actividad de ROCK y puede ser inhibida farmacológicamente con fasudil. Se ha comprobado que el fasudil en concentración de $10 \mu M$ sobre células HEK293A es suficiente para revertir los efectos de Dkk1 y de Vangl2 sobre la señalización Wnt-PCP. También se ha podido comprobar, mediante cuantificación de los niveles de $A\beta_{1-40}$ por el método Elisa, como el fasudil puede revertir los efectos que producen Dkk1 y Vangl2 en las mismas células sobre el incremento de la producción y acumulación de $A\beta$ ¹⁷.

Se ha observado que el tratamiento de cultivos de neuronas corticales de rata con Dkk1 exógeno provocaba una disminución de la densidad espinosa (DE). Además, Dkk1 es capaz de producir un incremento de la secreción de las tres especies de $A\beta$ ($A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$) en estas neuronas. Se ha comprobado que el tratamiento de estos cultivos con fasudil $10 \mu M$

bloquea la acción de la proteína Dkk1. El fasudil, además de demostrar su efecto protector en la sinapsis mediante el bloqueo de la reducción de la DE, revirtió los efectos estimulantes que presentaba Dkk1 sobre la producción de A β en estas neuronas. Sin embargo, en ausencia de Dkk1 exógeno los efectos protectores de fasudil sobre la secreción del péptido A β fueron insignificantes en este experimento¹⁷.

Después de demostrar la actividad protectora de fasudil frente a la pérdida sináptica y el deterioro cognitivo *in vitro*, se investigó si el fasudil podría producir los mismos estos efectos *in vivo*. Para ello se utilizó un modelo de ratones transgénicos 3xTGAD, que expresaban APP^{swe}. Al cabo de 12 meses comenzaba a detectarse la carga A β , que iba aumentando hasta producirse abundantes depósitos de amiloide en los cerebros de estos ratones a los 18 meses. En ese momento, se trató a un grupo de estos ratones con 10 mg/Kg de fasudil. Estos animales, tras los 14 días que duró el experimento, mostraron una clara reducción del péptido respecto a los controles. Además, se demostró que la administración de fasudil durante 14 días disminuía la carga de la placa amiloide en todas las regiones corticales del cerebro que se examinaron¹⁷.

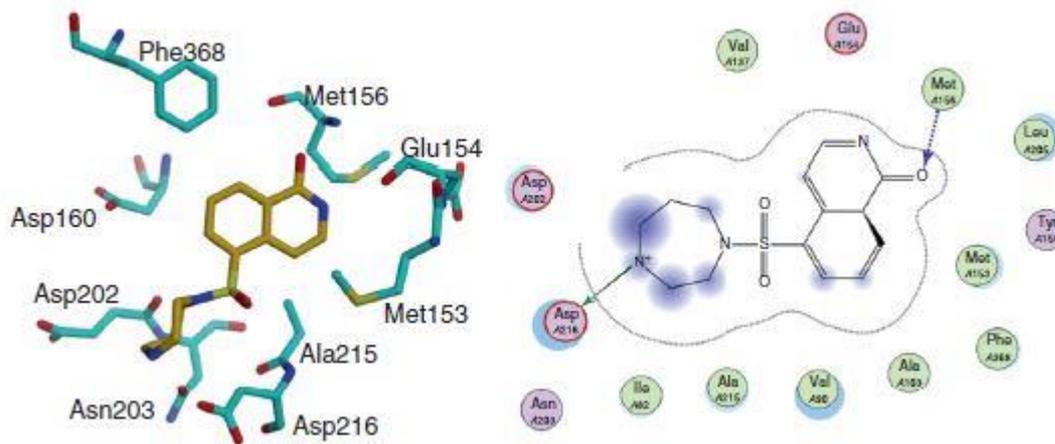
Inmunidad y enfermedad de Alzheimer

En la enfermedad de Alzheimer se ve afectado principalmente el sistema nervioso central, sin embargo, distintas comunicaciones entre el SNC y el sistema inmune periférico demuestran jugar un papel importante en esta enfermedad. Se ha planteado que la patología de esta enfermedad implica una disfunción inmunitaria. Los ratones transgénicos APP/PS1 (APP/PS1 Tg), que se han empleado en estudios de este trastorno, comienzan a mostrar deterioro de aprendizaje y memoria a los ocho meses de edad y placas significativas a los 9 meses ²¹.

Las inyecciones de células del estroma de la médula ósea humana (BMSCs), que presentan funciones inunomodulatorias, en los ratones modelo reducen la neurotoxicidad mediada por β A. Se ha comprobado que la combinación del inhibidor de la proteína ROCK, fasudil y BMSCs presenta una mayor eficacia en el tratamiento del Alzheimer. Los bazo de los ratones cuyo tratamiento había consistido en la inyección de células BMSCs mostraban expresión de ROCKII mientras que los ratones tratados con fasudil presentaban una reducción en la expresión de esta proteína. Se encontró que la expresión de ROCKII estaba considerablemente reducida en los ratones que recibieron terapia combinada de fasudil y células estromales de médula ósea humana ya que el fasudil, como inhibidor de ROCKII, reduce la expresión de esta

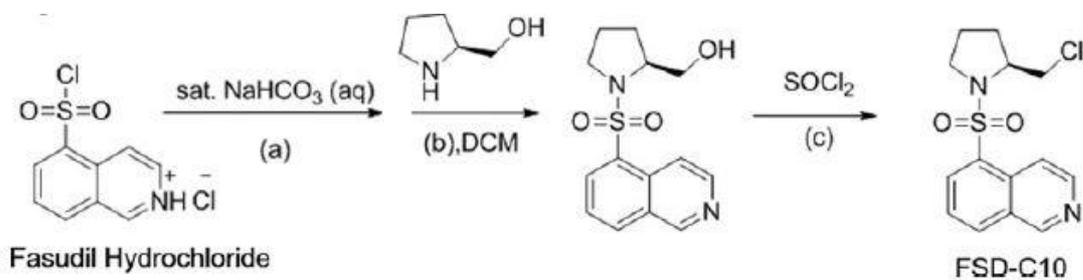
quinasa en el bazo de estos ratones y las células estromales potencian el efecto inhibitorio del fasudil sobre ROCKII a través de una inmunoregulación del sistema inmune periférico²¹. En 2009, se informó que la administración periférica de su metabolito, el hidroxifasudil, también demostraba mejorar el aprendizaje del espacio y trabajaba la memoria en los modelos de roedores con los que se llevó a cabo el experimento¹⁹.

La única diferencia a nivel estructural entre ambos compuestos es el grupo hidroxilo unido al anillo de isoquinolina del hidroxifasudil. Sin embargo, a pesar de que exista solo una ligera diferencia entre ambas estructuras, el nitrógeno y el C-1 de la isoquinolina se enlazan de manera invertida con los residuos del sitio de unión del ATP de ROCKII con respecto a la unión de esta con el fasudil. De esta manera, el nitrógeno isoquinolínico del hidroxifasudil reacciona con el carbonilo del grupo amida del aminoácido Glu¹⁵⁴ en lugar de hacerlo con el residuo Met¹⁵⁶. Mientras que el oxígeno del grupo hidroxilo forma un enlace de hidrógeno con el nitrógeno de la amida de la cadena principal de Met¹⁵⁶. Otra diferencia¹⁹ con respecto a los patrones de unión del fasudil es que la amina secundaria del anillo de homopiperazina del hidroxifasudil interactúa con la cadena lateral del Asp²¹⁶ en lugar de con Asp¹⁶⁰.



A pesar de que el fasudil muestra efectos beneficiosos en esta enfermedad, se observan diversas limitaciones para establecer su uso clínico a largo plazo. Estas limitaciones imposibilitan su uso en una enfermedad crónica como es el Alzheimer. Entre estas limitaciones se encuentran una baja biodisponibilidad oral, la toxicidad celular que provoca como consecuencia de su baja selectividad, así como la vasodilatación y la fluctuación que produce en la presión arterial, proceso que se correlaciona con la inhibición de la isoforma ROCKI. Debido a todas estas limitaciones se ha impulsado el estudio de nuevos inhibidores selectivos

de ROCKII que presenten una mayor biodisponibilidad oral, una menor citotoxicidad, que comprometan en menor grado a la fluctuación de la presión sanguínea, y que permitan por lo tanto un tratamiento de larga duración. Estos esfuerzos en el desarrollo de nuevos compuestos han permitido el diseño de un nuevo inhibidor selectivo de ROCKII **FSD-C10**. En el año 2004, Tamaki comunicó un modelo de unión ligado al bolsillo de unión del ATP de ROCK. Este modelo se dividió en tres partes: región A, F y D. Se especuló que el nitrógeno del anillo de homopiperazina, que pertenecía a la región D del fasudil, podría formar un enlace de hidrogeno con el ATP, lo que podría aumentar la actividad del compuesto. Por lo tanto, teniendo como objetivo la región D del fasudil se diseñó y sintetizó este nuevo compuesto derivado de la isoquinolina²².

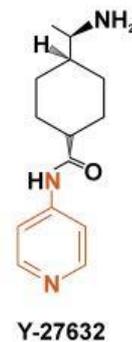


El FSD-C10 ha demostrado su potencial terapéutico en modelos de ratones transgénicos con proteína precursora del amiloide/presilina-1.APP/PS1. El FSD-C10 mejoró el deterioro de la memoria y el aprendizaje y mostró la capacidad de reducir la expresión del péptido β_{A1-42} , de la fosforilación de la proteína Tau y de la enzima β -secretasa (BACE1) en las áreas cerebrales del hipocampo y la corteza de estos ratones transgénicos. Además, el FSD-C10 potenció la expresión de proteínas asociadas a la sinapsis. En el Alzheimer, como ya se ha comentado, hay una clara correlación entre la disfunción cognitiva que se observa y la pérdida de la sinapsis que se va produciendo a lo largo de la enfermedad. La proteína sináptica PSD-95 organiza al resto de proteínas sinápticas, media en la plasticidad funcional y estructural de la sinapsis excitatoria y mantiene la homeostasis sináptica. Los ratones que fueron tratados con FSD-C10 presentaron una elevación de la expresión de PSD-95 y de otras proteínas asociadas a la sinapsis en sus cerebros. Estos resultados indican que la mejora en el deterioro del aprendizaje y de la memoria gracias al tratamiento con FSD-C10 podría estar relacionada con el aumento de la expresión de estas proteínas en el hipocampo y la corteza.

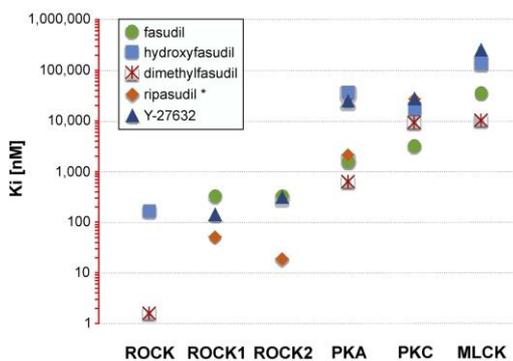
Los factores neurotróficos también destacan en el Alzheimer por su importancia en la supervivencia, diferenciación, crecimiento y regeneración de las neuronas así como en la plasticidad y transmisión sináptica. El compuesto FSD-C10 presentó un efecto neuroprotector a través de la producción de factores neurotróficos en los ratones que se sometieron al experimento²³. Todos estos resultados demuestran que el nuevo inhibidor selectivo de ROCKII, FSD-C10, presenta una esperanza más prometedora y segura que el fasudil en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer²².

Inhibidores derivados de la aminopiridina: Y-27632

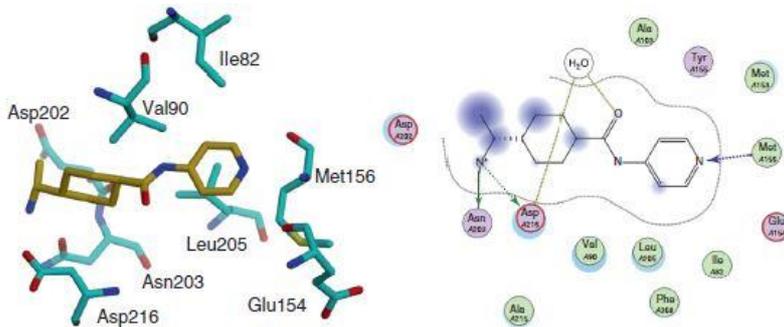
Los inhibidores clásicos de ROCK basados en la estructura de 4-aminopiridina fueron desarrollados por primera vez por Yashitomi Pharmaceutical. El representante de este grupo es el Y-27632¹¹. Este compuesto presenta una mayor actividad frente a ROCK con respecto al fasudil, con una constante de inhibición (K_i) de 140 nM frente a ROCKI y de 300 nM frente a ROCKII. El Y-27632 se considera



selectivo frente a ROCK ya que presenta una selectividad de 200 veces mayor sobre ROCK que sobre otras quinasas, entre las que se incluyen PKC, MLCK, PKA y la proteína quinasa dependiente de AMPc. Al principio se pensaba que los niveles de Y-27632 que llegaban al cerebro eran demasiado bajos como para que éste fuera capaz de ofrecer efectos terapéuticos en las enfermedades del sistema nervioso central, sin embargo, distintos estudios *in vivo* han demostrado que el tratamiento con Y-27632 en modelos de animales que presentan enfermedades neurodegenerativas produce efectos beneficiosos¹¹. La interferencia¹⁹ de la vía Rho/ROCK por el compuesto Y-27632 ha demostrado reducir la prevalencia del Alzheimer mediante la reducción de los niveles del péptido β -amiloide en concreto del péptido β -amiloide₁₋₄₂.



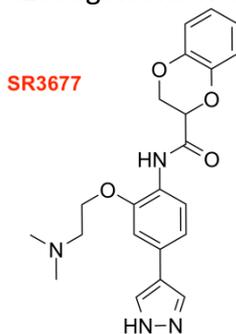
El compuesto Y-27632 también se trata de un inhibidor competitivo del ATP, por lo que actúa sobre ROCK a través del sitio de unión del ATP. Se ha examinado la unión del compuesto Y-27632 con Rho quinasa. En la estructura del complejo que forma el Y-27632 con ROCK²⁴, se observa que el grupo piridina de Y-27632 interactúa con el aminoácido Met¹⁵⁶ de ROCK mediante un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno piridínico y el nitrógeno de la amida de Met¹⁵⁶. El carbonilo de la cadena principal de Glu¹⁵⁴ forma otro enlace de hidrogeno con el nitrógeno del grupo piridina. Es necesaria la presencia de una molécula de agua para que haya interacción entre el nitrógeno del grupo amida de la cadena principal del aminoácido Asp²¹⁶ y el carbonilo de la amida del Y-27632. Por último¹⁹, el grupo amino de la cadena alquímica interactúa con las cadenas laterales de los aminoácidos As²¹⁶ y Asn²⁰³.



Para determinar como la actividad de ROCKI y de ROCKII influye en el proceso de formación de A β a partir de APP, se midieron en células SH-SY5Y de neuroblastoma, los niveles de proteína APP entera, sAPP α secretado y de A β 40. Los niveles secretados de A β 40 habían aumentado un 65 % en las células donde se había producido un silenciamiento de ROCKI mientras que en las que se llevó a cabo una depleción de ROCKII se produjo un descenso del 50 %. Con estos resultados tan opuestos, se concluye que al inhibir las dos isoformas se obtiene un efecto limitado en la reducción del péptido por lo que se propone la inhibición selectiva de ROCKII para reducir significativamente el procesamiento amiloidogénico del APP⁸.

Inhibidores derivados de la pirazol: SR3677

Para abordar el papel de ROCKII en la producción de A β , se llevó a cabo la transducción en unas neuronas corticales primarias murinas (de un modelo de rata o de ratón) con A β 40 y A β 42. Seguidamente, estas neuronas fueron expuestas a Y-27633 o a **SR3677**. Este último es



un **inhibidor selectivo de ROCKII** que también pertenece a la clase I, es decir, se trata de un inhibidor competitivo del ATP. De acuerdo con lo anterior mientras que el tratamiento con Y-27632 tuvo un efecto limitado sobre β A, el compuesto SR3677 redujo los niveles de A β 40 Y A β 42 en más de un 75 %. Para determinar si SR3677 presentaba el mismo efecto sobre el β A endógeno de las células

humanas, se examinaron las células SH-SY5Y del neuroblastoma, donde el β A endógeno disminuyó en un 68 %. Para hacer una mayor caracterización de los efectos de SR3677 sobre el procesamiento de APP a $A\beta$, las neuronas primarias que expresaban APP₆₉₅ fueron expuestas a dosis mayores de SR3677, y tanto sAPP β como $A\beta$ 40 mostraron una clara reducción dosis dependiente. En este estudio SR3677 fue comparado con el fasudil, el cual a una concentración ≥ 20 μ M redujo tan solo un 17-22 % la acumulación de $A\beta$ 40 en dichas neuronas primarias que expresaban APP₆₉₅. Además, el tratamiento con SR3677 no afectó a la viabilidad celular, lo que demuestra que se trata de un inhibidor selectivo de ROCKII y que la inhibición de ésta suprime el procesamiento amiloidogénico de la APP de manera dosis dependiente⁸.

β -Amiloide se produce por la acción proteolítica de β -secretasa (BACE1), que rompe a la proteína APP por el sitio β . Cuando se caracterizó que la mutación Swedish de la APP se producía justo en el sitio de acción de BACE1 sobre la proteína APP, se resaltó la importancia de modular esta actividad enzimática para regular la producción β A. Distintos estudios genéticos que se hicieron en Islandia demostraron como las sustituciones que se producían en APP, y que como consecuencia causaban una anulación de la actividad proteolítica de β -secretasa, protegían frente al desarrollo de la enfermedad. Basándose en la considerable reducción de sAPP β por la exposición al compuesto SR3677, se postuló si la inhibición de ROCKII suprimiría la actividad de BACE1 sobre APP. Un análisis de los cerebros de ratones con Alzheimer 5XFAD que fueron tratados con SR3677 demostró que la actividad de BACE1 se había reducido en un 31% en comparación con los ratones control. Se hicieron ensayos con las células SH-SY5Y que fueron expuestas a dosis cada vez mayores de SR3677, en los que finalmente se demostró que la actividad de β -secretasa estaba significativamente reducida, mientras que los niveles de la proteína se mantenían intactos. Este resultado sugiere que la reducción de **la conversión de la APP en β A debido a la disminución de la actividad de BACE1 es en parte debido a la inhibición de ROCKII**. Esto se explica porque la actividad enzimática de β -secretasa depende de la fosforilación de su cadena citoplasmática en la posición S498. ROCKII lleva a cabo dicho proceso de fosforilación, por lo que β -secretasa es un sustrato de ROCKII. Por tanto, la reducción que se observa en la actividad enzimática de β -secretasa tras la exposición al SR3677 se relaciona con la incapacidad de ROCKII de fosforilar a dicho enzima⁸.

Otro proceso que se ha visto que juega un papel importante en el procesamiento de la APP a β A es la fosforilación de la cola citoplasmática de la proteína APP. Al conocerse la capacidad que tiene el dominio quinasa de ROCK de fosforilar a APP se planteó la hipótesis de si ROCKII fosforila el dominio catalítico de la APP y si esta acción influye en la producción de $A\beta$. Se observó que en presencia de ROCKII se identificó un solo fosfopéptido a lo largo de toda la cadena citoplasmática de APP que corresponde con la fosforilación en la posición T654. Se planteó si la fosforilación en T654 influía en la producción de $A\beta$ ya que está presente en el cerebro, y para estudiarlo, se llevó a cabo el intercambio de T654 por una alanina, lo que da lugar a una nueva APP mutante a la que se nombra T654A. Para evaluar los efectos de esta mutación en la producción de $A\beta$, unas neuronas corticales primarias son transfectadas con lentivirus que expresaba APP T654A. Estas neuronas reducen la secreción de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ en un 40 % y 26 % respectivamente, lo que indica que la fosforilación en la posición T654 de la APP por ROCKII es un proceso crítico en la generación de $A\beta$. Este descubrimiento indica que el acoplamiento del tratamiento SR3677 con la mutagénesis de APP en T654 reduciría sinérgicamente los niveles de β A. Además, SR3677 es capaz de alterar el transporte del APP que se encuentra en los endosomas, y dirigirlo de manera temprana hacia los lisosomas, promoviendo su degradación e impidiendo así la formación del péptido β A⁸.

Relación entre la administración de fármacos y la enfermedad de Alzheimer

Estudios epidemiológicos demuestran que el riesgo de desarrollar EA se reduce en personas que consumen ciertos fármacos como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o estatinas. Determinados tipos de AINEs reducen selectivamente la producción de βA_{1-42} tanto *in vitro* como *in vivo*. El *R*-flurbiprofeno reduce los niveles de este péptido y mejora los déficits de memoria y aprendizaje en modelos de animales transgénicos con EA. Se sugiere que el efecto inhibitorio de determinados AINEs sobre la producción del péptido βA_{1-42} se relacionan con la inhibición de la vía Rho-ROCK⁷.

La acción inhibitoria de las estatinas sobre la producción de $A\beta$ se lleva a cabo a través del mecanismo reductor de colesterol, pero también a través de un mecanismo de acción independiente. Este mecanismo independiente consiste en la inhibición de GTPasas entre ellas Rho, por tanto, en la inhibición de la vía Rho/ROCK. La inhibición de esta vía de señalización celular sugiere que se desencadenen dos procesos, la activación de la enzima

proteolítica α -secretasa y un aumento de la degradación de APP por los lisosomas. Ambos procesos conllevan a una inhibición de la producción de βA^7 .

7. CONCLUSIONES

La principal limitación de los tratamientos actuales para el Alzheimer viene determinada por el carácter crónico de la enfermedad, ya que, para conservar a largo plazo el balance beneficio-riesgo estos tratamientos deben ser altamente selectivos. La síntesis de nuevos compuestos inhibidores de ROCK, en los que se busca una mayor selectividad frente a ROCKII, suponen una gran esperanza en la terapia efectiva para esta enfermedad. En los estudios descritos hasta el momento, se pone de manifiesto que los nuevos compuestos sintetizados presentan un aumento de la biodisponibilidad oral así como la disminución de efectos adversos a medida que aumenta la selectividad del fármaco. La mayor eficiencia de estos fármacos puede facilitar su administración al reducirse el número de dosis diarias, suponiendo todas estas características una posible mejora de la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Tesis Doctoral presentada por Irene García Salado: Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador para enfermedades neurodegenerativas. Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Química Orgánica I. Madrid, **2014**.
<https://eprints.ucm.es/27788/1/T35581.pdf>
- 2- Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud Estrategia aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud el 13 de abril de **2016**. Informes, Estudios e Investigación. Ministerio De Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
https://www.mschs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/Est_Neurodegenerativas_APROBADA_C_INTERTERRITORIAL.pdf
- 3- Informe documental por M. Garcés: La enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. Desarrollado bajo el contrato de investigación suscrito entre Neuroalianza y Universidad Complutense de Madrid. Febrero, **2016**.
<http://neuroalianza.org/wp-content/uploads/Informe-NeuroAlianza-Completo-v-5-optimizado.pdf>

- 4- familydoctor.org [Internet] Estados Unidos: American Academy of Family Physicians; [actualizado 7 jul 2017; citado 2 mar 2020]. Disponible en: <https://familydoctor.org/condition/alzheimers-disease/>
- 5- MayoClinic.org [Internet]. Enfermedad de Alzheimer; [actualizado 5 Feb 2019; citado 9 abr 2020]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/alzheimers-disease/diagnosis-treatment/drc-20350453>
- 6- Albert M.J., Martínez R., Gutiérrez A., Hakim D., Pérez G. Pathogenesis and current treatment of Alzheimer's disease. *Rev Cubana Farm.* 2014, 48(3), 508-518. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-751520140003000161
- 7- Kubo T., Yamaguchi A., Iwata N., Yamashita T. The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitoris on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag.* 2008, 4(3), 606-615.
- 8- Herskowitz J.H., Feng Y., Mattheyses A.L., Hales C.M., Higginbotham L.A., Duong D.M., Montine T.J., Troncoso J.C., Thambisetty M., Seyfried N.T., Levey A.I., Lah J.J. Pharmacologic Inhibition of ROCK2 Suppresses Amyloid- β Production in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J. Neurosci.* 2013, 33(49), 19086-19098.
- 9- Jordán J. Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Offarm.* 2003, 22(3), 102-114.
- 10- Tesis doctoral presentada por Alfredo Castañeda García: Análisis de las proteínas quinasas de tipo eucariota de *Myxococcus xanthus*. Caracterización molecular de la proteína PksA (Mxan5695). Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. Granada, 2017. <https://hera.ugr.es/tesisugr/17098609.pdf>
- 11- 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. *Pharmacol. Therapeut.* 2018, 189, 1-21.
- 12- Liu J., Gao H.Y., Wang X.F. The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system. *Neural. Regen. Res.* 2015, 10(11), 1892-1896.
- 13- Feng Y., LoGrasso P. V., Defert O., Li R. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 2269–2300. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00683
- 14- Liao J.K., Seto M., Noma K. Rho Kinase (ROCK) Inhibitors. *J Cardiovas Pharmacol.* 2007, 50(1), 17-24. Doi:10.1097/FJC.0b013e318070d1bd

- 15- Lizuka M., Kimura K., Wang S., Kato K., Amano M., Kaibuchi K., Mizoguchi A. *Cell. Struct. Funct.* **2012**, 37(2), 155-175.
- 16- Tesis doctoral presentada por Carlos González Fernández: Caracterización del patrón de expresión de la familia de proteínas Wnt en la lesión medular. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Madrid, **2015**.
<https://eprints.ucm.es/33318/1/T36426.pdf>
- 17- Elliot C., Rojo A.I., Ribe E. *et al.* A role for APP in Wnt signaling links synapse loss with β -amyloid production. *Transl. Psychiatry.* **2018**, 8(1), 179. Doi: 10.1038/s41398-018-0231-6.
- 18- 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, 589-600. doi: 10.1016/j.str.2005.11.024
- 19- 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, 1323-1333.
- 20- Valencia R.K., Colín L., Fortoul T.I. Dendritic spines, its function and some alterations. *Rev. Fac. Med. (Mex).* **2018**, 61(1), 1-46.
- 21- Yu J.; Yan Y.; Gu Q.; Kumar G.; Yu H.; Zhao Y.; Liu C.; Gao Y., Chai Z., Chumber J., Xiao B.G., Zhang G.X., Zhang H-T., Jiang Y., Ma C.G. Fasudil in combination with Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) Attenuates Alzheimer's Disease-Related Changes through the Regulation of the Peripheral Immune System. *Font. Aging Neurosci.* **2018**, 10(216), 1-9. Doi:10.3389/fnagi.2018.00216
- 22- Xin Y.L., Yu J.Z., Yang X.W., Liu C.Y., Li Y.H., Feng L. FSD-C10: A more promising novel ROCK inhibitor than Fasudil for treatment of CNS autoimmunity. *Biosci. Rep.* **2015**, 35, e00247, doi:10.1042/BSR20150032.
- 23- Gu Q.F., Yu J.Z., Wu H., Li Y.H., Liu C.Y., Feng L., Zhang G.X., Xiao B.G., Ma C.G., Therapeutic effect of Rho kinase inhibitor FSD-C10 in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Ther. Med.* **2018**, 16, 3929-3938. Doi: 0.3892/etm.2018.6701.
- 24- Yamaguchi H., Yukiko M., Miyuyi K., Ken K., Mutsuki A., Kozo K., Toshio H. Structural Basis for Induced-Fit Binding of Rho-Kinase to the Inhibitor Y-27632. *J.Biochem.* **2006**, 140, 305-311. Doi: 10.1093/jb/mvj172.