

9.3. Empleo y utilidad actual de los fármacos inhibidores de la RHO-quinasa en DSO

Beatriz Vidal Villegas, Bárbara Burgos Blasco, José Antonio Gegúndez Fernández, David Díaz Valle

INTRODUCCIÓN

Las células endoteliales corneales (CEC) tienen una muy escasa capacidad de división y regeneración en condiciones fisiológicas in vivo (1). Por ello, la restauración de la función del endotelio corneal cuando éste se daña sólo puede realizarse de una de estas dos formas: (i) su reemplazo con una fuente externa de CEC saludables o (ii) la estimulación de la migración y redistribución de las CEC restantes (2). En la actualidad el tratamiento de la insuficiencia endotelial corneal se basa en la reposición con una fuente exógena de CEC sanas a través de diversos tipos de trasplante corneal. Sin embargo, la escasez de donantes y la complejidad técnica hace que se estén investigando técnicas de estimulación del endotelio corneal (2-5).

Estudios recientes han demostrado que agentes farmacológicos, como los inhibidores de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCKi), pueden producir efectos potencialmente beneficiosos sobre las células endoteliales corneales. De ellos, algunos compuestos ROCKi de bajo peso molecular han recibido recientemente aprobación en algunos países para uso tópico en el tratamiento de patologías oculares.

MECANISMO DE ACCIÓN

La familia de las quinasas asociadas a Rho (ROCK) está formada por ROCK1 y ROCK2 y son los principales efectores de señalización en la reorganización del citoesqueleto de actina, uno de los componentes fundamentales del citoesqueleto celular (6). La activación del complejo ROCK conduce a la activación de diferentes cascadas de señalización intracelular (fig. 1). Así, las ROCK son importantes en el control de las vías de transducción de señales para las funciones celulares esenciales, como son la diferenciación epitelial, la proliferación celular, la reorganización del citoesqueleto, la contracción del músculo liso a través de la sensibilización a iones de calcio, las interac-

ciones entre la célula y la matriz, la apoptosis, la regulación del movimiento y la adhesión celular (2,7-9). Además, la señalización ROCK está involucrada en la regulación y diferenciación del ciclo celular (7).

En oftalmología, se ha demostrado que los ROCKi tienen un efecto hipotensor en la presión intraocular (PIO), por lo que podrían ser empleados en el glaucoma (10,11). Los ROCKi reducen la PIO aumentando el flujo de salida del humor acuoso por la vía trabecular (12-14).

Más recientemente, los ROCKi han sido investigados por sus aplicaciones en terapias regenerativas para enfermedades del endotelio corneal (15-20). La inhibición de la señalización de ROCK en cultivos de CEC humanas y de primates ha demostrado que promueve la adhesión celular, inhibe la apoptosis y mejora la proliferación celular (17-19). Además de su uso en terapias regenerativas, los ROCKi también funcionan como componente importante de los métodos de cultivo de CEC para su uso en terapias basadas en células (21,22).

PRIMEROS ESTUDIOS

La investigación sobre las ROCK comenzó a finales de la década de 1990 y sigue vigente (23-25). La inhibición de las vías de señalización de ROCK han demostrado un potencial terapéutico diverso en numerosas enfermedades vasculares, neoplásicas, neurológicas degenerativas y asma (7,26-28).

Al principio de los 2000, se realizaron numerosos estudios sobre los ROCKi y su efecto sobre el flujo de salida de humor acuoso (29,30). Varios ROCKi han demostrado eficacia ocular hipotensora y de ellos, dos han logrado ser aprobados para el tratamiento del glaucoma (31,32).

Desde hace más de una década se ha investigado la utilidad de los ROCKi para enfermedades oculares diferentes del glaucoma. Así, se ha investigado su uso en patologías, como el edema macular diabético y la descompensación endote-

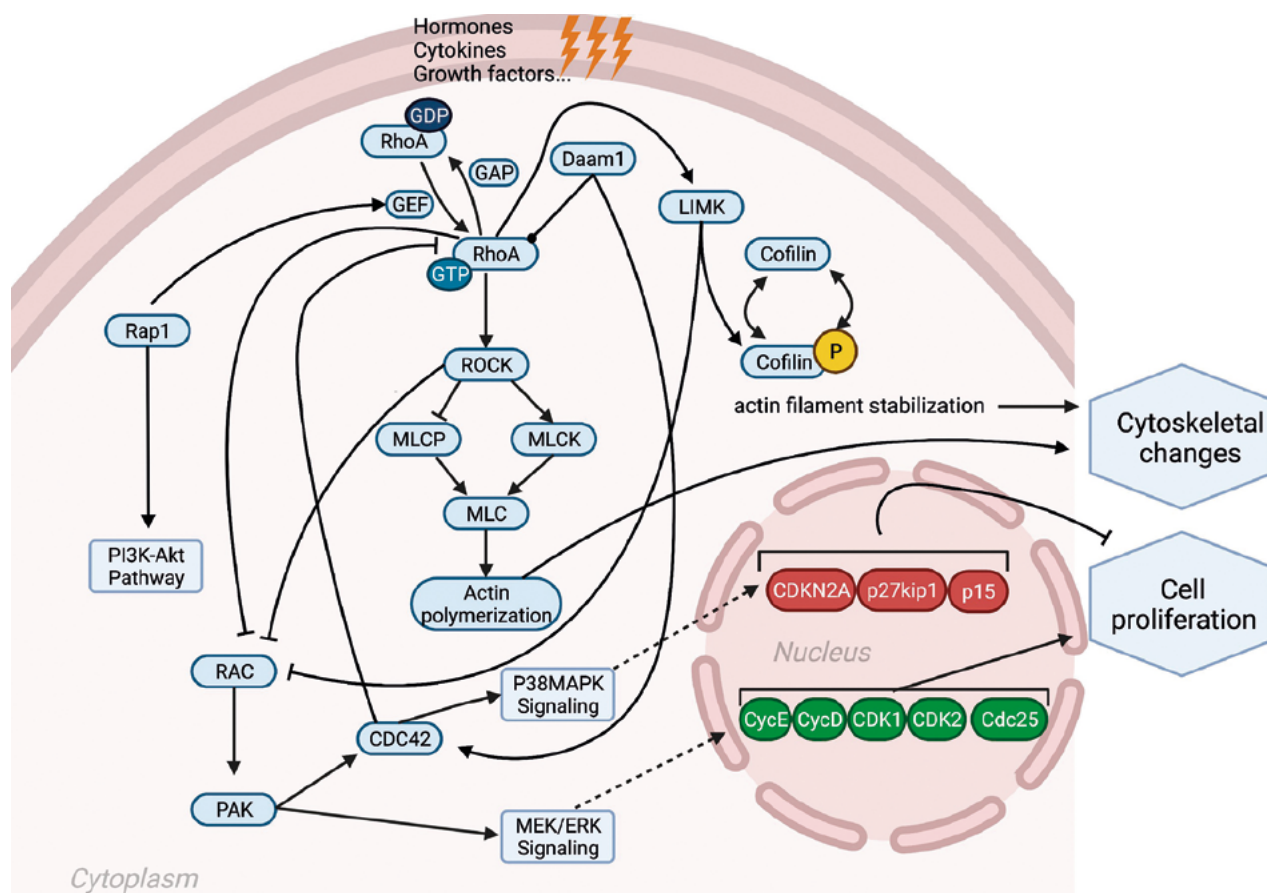


Figura 1. Vía de señalización Rho/ROCK en una célula endotelial corneal. Obtenido de Vercammen H, Miron A, Oellerich S, Melles GRJ, Ni Dhubhghaill S, Koppen C, Van Den Bogerd B. Corneal endothelial wound healing: understanding the regenerative capacity of the innermost layer of the cornea. *Transl Res.* 2022;248:111-127. doi: 10.1016/j.trsl.2022.05.003. Creative Commons Attribution 4.0 license (CC BY-NC-ND) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

lial corneal (5,33). Son varios los estudios que han mostrado un efecto prometedor de los ROCKi, ya que pueden promover la proliferación de CEC y la cicatrización endotelial (18,19). Además, han demostrado su potencial terapéutico dirigido al endotelio corneal en el tratamiento del daño endotelial corneal agudo tanto en modelos animales (16,17), como algunos estudios piloto en humanos (16,20,34). Por otra parte, se han documentado efectos citoprotectores de los ROCKi en cultivos celulares porque limitan la muerte celular y la desdiferenciación celular (35,36).

TIPOS DE INHIBIDORES ROCK

Actualmente, hay tres ROCKi aprobados para su uso clínico (Fasudil, Ripasudil y Netarsudil), aunque sólo dos están aprobados para su uso oftálmico (Ripasudil y Netarsudil). El primero de estos fármacos en ser aprobado para su uso clínico fue el Fasudil (Eiril™; Asahi Kasei Pharma Cor-

poration, Tokyo, Japan/Woolsey Pharmaceuticals Corporation, New York, NY) introducido en Japón en 1995, donde se utiliza como inyección intravenosa para suprimir el vasoespasmo cerebral mediante la inhibición de la contracción de la actomiosina (37). Los dos ROCKi disponibles comercialmente para uso oftálmico han sido aprobados únicamente para el tratamiento del glaucoma: ripasudil (K-115 o **Ripasudil** 0,4%; GLANATEC®; Kowa Co, Ltd, Nagoya, Japón), aprobado en Japón en 2014, y netarsudil (AR-13324 o **Netarsudil** 0,02%; Rhopressa®; Aerie Pharmaceuticals, Inc, Durham, NC), aprobado en Estados Unidos en 2017 (28,31).

Además de los ROCKi ya aprobados, se han sintetizado y utilizado múltiples agentes en laboratorios de investigación, como Y-27632 (32). Todos estos agentes inhiben de manera no selectiva ambas isoformas de ROCK, aunque Ripasudil tiene mayor afinidad por ROCK2 (28), Y-27632 tiene mayor afinidad por ROCK1 (38), y netarsudil tiene igual afinidad por ambas (14).

K-115 (Ripasudil hydrochloride hydrate). 0,4% Ripasudil (GLANATEC®; Kowa Co, Ltd, Nagoya, Japan)

En 2017, Moloney y cols. describieron el uso de ROCKi en pacientes que no habían demostrado regresión del edema después de D.S.O. (Des-cemet Stripping Only) (39). Huang y cols de manera similar informaron sobre el tratamiento con Ripasudil 0,4% 6 veces al día durante 3 semanas tras la DSO en pacientes que no alcanzaban la transparencia corneal de manera espontánea (40). En 2021, de nuevo el grupo de Moloney, publicó un estudio con mayor número de participantes (n = 23) con distrofia endotelial de Fuchs (DEF) que tras la DSO fueron tratados con Ripasudil tópico al 0,4% 6 veces al día (41). En líneas similares, se están desarrollando en la actualidad varios ensayos clínicos (tabla 1), en particular uno de fase 4 randomizado (NCT03249337, tabla 1) en pacientes con DEF a los que se les practica una DSO, con evaluación de resultados a 12 meses.

AR-13324 (Netarsudil mesylate). 0,02% Netarsudil (Rhopressa®; Aerie Pharmaceuticals, Inc, Durham, NC)

En la actualidad sólo dos ensayos clínicos han publicado resultados sobre el tratamiento de la disfunción endotelial con Netarsudil. Un ensayo de fase 2 que evaluó la seguridad y eficacia de la solución oftálmica de netarsudil 0,02% en pacientes con edema corneal debido a DEF demostró una reducción del grosor corneal central, pero sin diferencias significativas entre el grupo de tratamiento de una aplicación al día con el de dos aplicaciones al día (NCT04498169).

El objetivo de otro ensayo clínico (NCT04051463) fue determinar si el uso de Rhopressa® (Netarsudil 0,02%) 1 gota 1 vez al día en ambos ojos comparado con placebo durante 3 meses, mejoraba la capacidad de las CEC para mantener una transparencia corneal adecuada en pacientes con DEF. Se demostró una reducción significativa del grosor corneal central y un aumento de la agudeza visual comparado con el grupo de placebo.

En 4 pacientes con edema corneal visualmente significativo debido a disfunción endotelial, se usó Netarsudil tópico una vez al día de manera «off-label» con desaparición del edema corneal en 3 de los 4 casos (42). Su uso aún está en fase de investigación (tabla 1).

Y-27632 diclorhidrato

Y-27632 ha demostrado en estudios in vitro que permite el aislamiento y la expansión de células progenitoras del endotelio corneal. También mejora la proliferación, viabilidad y migración de CEC diferenciadas (43). En éstas, los filamentos de actina se redistribuyeron a la periferia y las células adquirieron una morfología más alargada (44). En la actualidad, existe un ensayo clínico en fase I para evaluar la seguridad de una dosis fija de CEC humanas administrada junto a concentraciones variables del ROCKi Y-27632 en pacientes con edema corneal secundario a disfunción endotelial (NCT05309135; tabla 1).

Sovesudil (PHP-201; pH Pharma)

Se ha realizado un ensayo clínico fase 2 para evaluar la eficacia hipotensora ocular y la seguridad de Sovesudil (PHP-201) en pacientes con glaucoma normotensivo (45). Sin embargo, con respecto a su uso sobre el endotelio corneal, sólo hay un artículo publicado hasta la fecha (43). En estos experimentos se utilizaron córneas de cerdo ex vivo y cultivos celulares de CEC humanas para estudiar nuevas moléculas con actividad ROCKi como el sovesudil (PHP-201) y el PHP-0961 (pH Pharma). En todos los experimentos, los resultados de sovesudil y PHP-0961 fueron iguales o superiores a los resultados del control positivo del ROCKi Y-27632. Los nuevos ROCKi tienen la capacidad de regenerar CEC al mejorar la proliferación celular y la adhesión entre células (43).

INDICACIONES Y PAUTA

Se han propuesto dos métodos de administración de ROCKi para el tratamiento del endotelio corneal, que incluyen colirios tópicos e inyecciones en cámara anterior junto con CEC cultivadas (25).

Actualmente, las dosis y frecuencia diarias más adecuadas de ROCKi en patología corneal y particularmente después de DSO no están bien definidas, aunque no se hayan encontrado contraindicaciones para su uso tópico ocular (46). Las dosis se han extrapolado de los ensayos clínicos en fase I, II y III de estos mismos compuestos para el tratamiento del glaucoma. De esta manera nos estamos asegurando de que son dosis tolerables que no producen efectos secundarios, pero se desconoce

Tabla 1. Ensayos clínicos activos con ROCKi para enfermedades corneales. Enero 2023 (<https://clinicaltrials.gov>)

N.º Identificación:	Fase	Condición	Intervención	País
RIPASUDIL				
NCT03249337	4	D. Fuchs	DSO + a) ripasudil 0.4% 3 veces al día b) ripasudil 0.4% 6 veces al día	EEUU
NCT03813056	2	D. Fuchs	DMEK+ a) ripasudil 0.4% 6 veces al día b) placebo 6 veces al día	EEUU
NCT03575130	2	D. Fuchs	DSO+ a) ripasudil 0.4% b) placebo	Alemania
NCT05275972 (DETECT II)	3	D. Fuchs	a) DMEK + placebo b) DSO + ripasudil 0.4%	EEUU Multicéntrico
NCT05289661 (DETECT I)	3	D. Fuchs	a) UT-DSAEK + ripasudil 0.4% a) UT-DSAEK + placebo a) DMEK + ripasudil 0.4% a) DMEK + placebo	EEUU Multicéntrico
NCT05636579	1	D. Fuchs	Inyección intracamerular de células endoteliales corneales humanas magnetizadas (EO2002) + a) ripasudil 0.4% b) sin ripasudil	Méjico
NCT05528172	3	Postoperatorio cirugía catarata	Cirugía de catarata + a) Ripasudil 0.4% 4 veces al día b) placebo	EEUU Multicéntrico
NETARSUDIL				
NCT04752020	1	D Fuchs	DSO + netarsudil 1 gota al día por la noche	EEUU
NCT05309135	1	Disfunción endotelial	a) HCEC-1 + Y-27632 a dosis bajas b) HCEC-1 + Y-27632 a dosis medias c) HCEC-1 + Y-27632 a dosis altas	El Salvador

D. Fuchs= Distrofia Endotelial Corneal de Fuchs, DSO = Descemet's Stripping Only, UT-DSAEK= ultrathin Descemet's Stripping Endothelial Keratoplasty, DMEK= Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty, HCEC-1 = human cultured corneal endothelial cells; EO2002 = células endoteliales corneales humanas magnetizadas.

si la dosis es la óptima para su acción sobre el endotelio corneal.

Dentro de las posibles pautas, se han evaluado: una vez al día, dos veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día y 6 veces al día (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03249337) (41,42). Mediante microscopía especular se ha confirmado que, en sujetos normales, el efecto de una sola instilación tópica de Ripasudil al 0,4% tiene un efecto en la córnea, medido como la alteración morfológica de las CEC, durante aproximadamente 6 horas (47). Sin embargo, la duración de los efectos biológicos debe evaluarse teniendo en cuenta su farmacocinética en la córnea y el humor acuoso tras su aplicación tópica (48).

Distrofia Endotelial de Fuchs

Una de las opciones de tratamiento de los ROCKi, consiste en su administración tópica en forma de colirio para ayudar con las primeras etapas de la DEF (46). En un estudio piloto, se reclutaron 8 pacientes con distrofia de Fuchs, que se dividieron entre los que presentaban edema de predominio central o los que presentaban edema difuso. Fueron tratados con un ROCKi (Y-27632 colirio 10 mM aplicado 6 veces al día durante una semana) tras dañar el endotelio corneal central con una sonda de crioterapia de 2 mm. El número limitado de pacientes impidió obtener diferencias estadísticamente significativas, aunque

se observó una clara tendencia hacia la reducción del grosor corneal central en el grupo de edema central, aunque no en el grupo de edema difuso (46).

DSO

En 2017, Moloney y cols. fueron los primeros en describir el uso de ROCKi en tres pacientes que no habían demostrado regresión del edema entre los 2-4 meses después de DSO. Dos pacientes fueron tratados con Ripasudil 6 veces al día y lograron una recuperación completa después de 10 a 14 días de tratamiento. El tercer paciente, tratado con Y-27632, no mejoró (39). Huang y cols. informaron sobre tres casos en los que se «rescató» el edema persistente después de DSO con el inicio de Ripasudil 0,4% 6 veces al día durante 3 semanas (40).

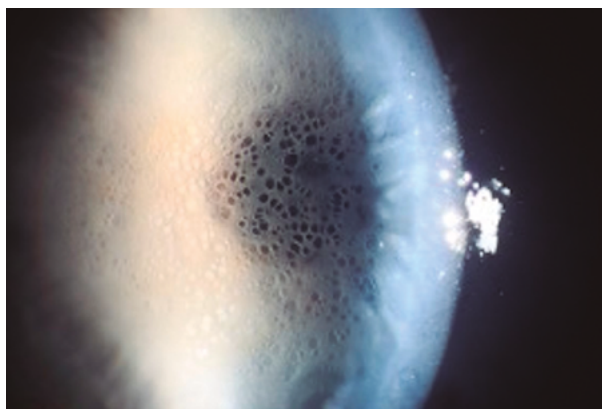
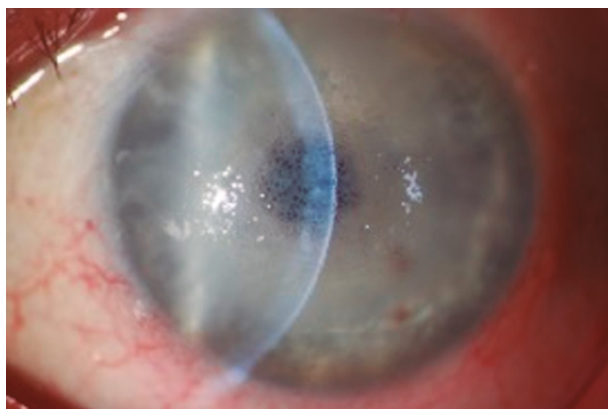
En 2021, el grupo de Moloney publicó un estudio a 12 meses en 23 pacientes con DEF a los que se les practicaba una DSO y comenzaban tratamiento posoperatorio con Ripasudil tópico al 0,4% 6 veces al día (41). El tratamiento con ROCKi comenzó el día después de la cirugía y continuó hasta el aclaramiento completo de la córnea, con un éxito del 95,7%. El tiempo medio de aclaramiento fue de 4,1 semanas. Realizaron una comparación con su estudio inicial de DSO sin ROCKi adyuvantes, demostrando una diferencia significativa entre los grupos (41). Se está desarrollando en la actualidad un ensayo clínico fase 4 randomizado (NCT03249337, tabla 1) en pacientes con DEF a los que se les practica una DSO, con evaluación de resultados a 12 meses. Los dos brazos de tratamiento son Ripasudil 0,4% 3 veces al día y Ripasudil 0,4% 6 veces al día.

EFFECTOS SECUNDARIOS

En líneas generales, los ROCKi son bien tolerados y tienen un perfil de seguridad óptimo (28,49,50). Los estudios que evaluaron la eficacia y la seguridad de netarsudil (0,02%) como hipotensor (Estudios ROCKET), describieron como efectos secundarios más comunes del tratamiento la hiperemia conjuntival (50%), la córnea verticillata (20,9%) y las hemorragias subconjuntivales (17,2%) (51). Otros ensayos clínicos para el tratamiento de la disfunción endotelial en los que las posologías eran una y dos aplicaciones al día (NCT04498169; NCT04051463) también demostraron su tolerabilidad, con un 0% de efectos secundarios adversos graves y un 25% de leves, sin efectos sistémicos y siendo la hiperemia conjuntival el más frecuente.

En un estudio similar para investigar el Ripasudil, los resultados mostraron que la hiperemia conjuntival (dependiente de la dosis) y la irritación ocular eran los efectos secundarios más comunes (28,50,52,53). Otro efecto secundario, aunque raro, es el aplanamiento corneal reversible, descrito por Ganesh y cols. en una niña de 4 años con glaucoma (54).

Más recientemente, se ha descrito la aparición de edema corneal epitelial reticular en panal (figs. 2 y 3) lo que conduce a una disminución brusca de la agudeza visual. Aunque este efecto secundario se ha asociado más al uso de netarsudil (55,56), también hay casos descritos con ripasudil (57-59). Se ha propuesto la presencia de edema corneal previo como un factor de riesgo, pero aún se requieren más estudios para investigar si es una asociación o una coincidencia, ya que estos fármacos se indican principalmente en ojos con alteraciones corneales (58). La causa exacta aún se desconoce,



Figuras 2 y 3. Edema epitelial en «panal de abejas» en un paciente intervenido de DSO y tratado con colirio de Ripasudil. Cortesía del Centro de Oftalmología Barraquer. Barcelona.

aunque Wisely y cols. (60) postularon un desplazamiento de parte del edema estromal preexistente a las capas epiteliales de la córnea.

Dentro de los efectos secundarios sistémicos, Moloney y cols. describieron que un 24% de los pacientes con Ripasudil presentaban molestias gastrointestinales (41).

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

A pesar de los estudios sobre el uso de ROCKi, aún se debe investigar más detalladamente la seguridad clínica y la eficacia de los ROCKi en el tratamiento de la patología endotelial, debiéndose abordar tanto la restauración del endotelio corneal gravemente dañado como inmediatamente después de la cirugía de cataratas y DSO, así como la preservación las CEC en deterioro en casos crónicos.

La ingeniería de tejidos se ha propuesto como una terapia que puede reemplazar el trasplante de córnea convencional utilizando córneas de donantes. Hay al menos dos posibles estrategias disponibles para trasplantar CEC cultivadas a córneas receptoras (46).

1) Una estrategia es crear una lámina endotelial corneal cultivada y trasplantarla en un procedimiento muy parecido a la DSAEK o DMEK (61,62). Varios grupos de investigación han cultivado CEC en un sustrato compatible biológicamente y han trasplantado la lámina de CEC resultante en modelos animales (25,61,63,64).

2) La segunda estrategia es inyectar CEC cultivadas en forma de suspensión celular en la cámara anterior (21,25,65). Estas células se pueden inyectar de manera aislada, o asociadas a un ROCKi (66,67). Se ha demostrado que la inyección de CEC cultivadas en un medio de crecimiento potenciado con un ROCKi en humanos trató eficazmente el edema corneal y restauró la visión (65).

Por otra parte, se ha investigado el uso de ROCKi en otras indicaciones distintas de la distrofia de Fuchs. Achiron y cols. (68) evaluaron ex vivo si la exposición profiláctica de CEC a un ROCKi inhibe la apoptosis de las CEC después de la cirugía de catarata. Después de la facoemulsificación, las CEC expuestas al ROCKi demostraron una reducción en la tasa de apoptosis en comparación con los controles. Los autores sugieren que podría usarse un ROCKi como tratamiento neoadyuvante a la cirugía de cataratas, especialmente en pacientes de alto riesgo.

¿Qué aporta este capítulo?

- Los inhibidores de la proteína quinasa asociada a Rho, han demostrado que promueven la adhesión celular, inhiben la apoptosis y mejoran la proliferación celular.
- Actualmente hay dos fármacos autorizados para el tratamiento del glaucoma, Ripasudil y el Netarsudil, que han mostrado beneficios en la recuperación del edema corneal tras una DSO.
- Se necesitan ensayos clínicos adicionales que investiguen las opciones de tratamiento revisadas de los inhibidores de la Rho quinasa para validar los hallazgos previos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2012; 95(1): 16-23.
2. Ong HS, Ang M, Mehta J. Evolution of therapies for the corneal endothelium: past, present and future approaches. *Br J Ophthalmol.* 2021; 105(4): 454-467.
3. Birbal RS, Hsien S, Zygoura V, et al. Outcomes of hemi-Descemet membrane endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Cornea.* 2018; 37(7): 854-858.
4. Zygoura V, Baydoun L, Ham L, et al. Quarter-Descemet membrane endothelial keratoplasty (Quarter-DMEK) for Fuchs endothelial corneal dystrophy: 6 months clinical outcome. *Br J Ophthalmol.* 2018; 102(10): 1425-1430.
5. Ho WT, Chang JS, Chen TC, et al. Inhibition of Rho-associated protein kinase activity enhances oxidative phosphorylation to support corneal endothelial cell migration. *FASEB J.* 2022; 36(7): e22397.
6. Shi J, Wei L. Rho kinases in embryonic development and stem cell research. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2022; 70(1): 4.
7. Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 50(1): 17-24.
8. Lakshman N, Kim A, Bayless KJ, et al. Rho plays a central role in regulating local cell-matrix mechanical interactions in 3D culture. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2007; 64(6): 434-445.
9. SundarRaj N, Kinchington PR, Wessel H, et al. A Rho-associated protein kinase: differentially distributed in limbal and corneal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39(7): 1266-1272.
10. Pakravan M, Beni AN, Ghahari E, et al. The ocular hypotensive efficacy of topical Fasudil, a Rho-associated protein kinase inhibitor, in patients with end-stage glaucoma. *Am J Ther.* 2017; 24(6): e676-e680.
11. Wang SK, Chang RT. An emerging treatment option for glaucoma: Rho kinase inhibitors. *Clin Ophthalmol.* 2014; 8: 883-890.
12. Isobe T, Mizuno K, Kaneko Y, et al. Effects of K-115, a rho-kinase inhibitor, on aqueous humor dynamics in rabbits. *Curr Eye Res.* 2014; 39(8): 813-822.
13. Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, et al. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 19640.
14. Lin CW, Sherman B, Moore LA, et al. Discovery and preclinical development of Netarsudil, a novel ocular hypotensive agent for the treatment of glaucoma. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2018; 34(1-2): 40-51.

15. Feng Y, LoGrasso PV, Defert O, et al. Rho Kinase (ROCK) inhibitors and their therapeutic potential. *J Med Chem.* 2016; 59(6): 2269-2300.
16. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, et al. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(4): 2493-2502.
17. Okumura N, Nakano S, Kay EP, et al. Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(1): 318-329.
18. Okumura N, Okazaki Y, Inoue R, et al. Effect of the Rho-associated kinase inhibitor eye drop (Ripasudil) on corneal endothelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 57(3): 1284-1292.
19. Okumura N, Ueno M, Koizumi N, et al. Enhancement on primate corneal endothelial cell survival in vitro by a ROCK inhibitor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50(8): 3680-3687.
20. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, et al. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea.* 2013; 32(8): 1167-1170.
21. Peh GSL, Adnan K, George BL, et al. The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach. *Sci Rep.* 2015; 5: 9167.
22. Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, et al. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci Rep.* 2016; 6: 26113.
23. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 1998; 279(5350): 509-514.
24. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 2004; 116(2): 167-179.
25. Moshirfar M, Parker L, Birdsong OC, et al. Use of Rho kinase inhibitors in Ophthalmology: A review of the literature. *Med Hypothesis, Discov Innov Ophthalmol J.* 2018; 7(3): 101-111.
26. Olson MF. Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20(2): 242-248.
27. Suzuki Y, Shibuya M, Satoh SI, et al. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol.* 2007; 68(2): 126-131.
28. Garnock-Jones KP. Ripasudil: first global approval. *Drugs.* 2014; 74(18): 2211-2215.
29. Honjo M, Tanihara H, Inatani M, et al. Effects of rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 on intraocular pressure and outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(1): 137-144.
30. Kaufman PL, Gabelt B, Tian B, et al. Advances in glaucoma diagnosis and therapy for the next millennium: new drugs for trabecular and uveoscleral outflow. *Semin Ophthalmol.* 1999; 14(3): 130-143.
31. Hoy SM. Netarsudil ophthalmic solution 0.02%: first global approval. *Drugs.* 2018; 78(3): 389-396.
32. Yuan AE, Pineda R. Regenerative medicine in Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Taiwan J Ophthalmol.* 2021; 11(2): 122-131.
33. Mateos-Olivares M, García-Onrubia L, Valentín-Bravo FJ, et al. Rho-Kinase inhibitors for the treatment of refractory diabetic macular oedema. *Cells.* 2021; 10(7).
34. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. The Role of Rho kinase inhibitors in corneal endothelial dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(4): 660-666.
35. Matsumoto E, Furumatsu T, Kanazawa T, et al. ROCK inhibitor prevents the dedifferentiation of human articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 420(1): 124-129.
36. Qi Y, Liang X, Dai F, Guan H, et al. RhoA/ROCK pathway activation is regulated by AT1 receptor and participates in smooth muscle migration and dedifferentiation via promoting actin cytoskeleton polymerization. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(15).
37. Zhao J, Zhou D, Guo J, et al. Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2006; 46(9): 421-428.
38. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 2000; 57(5): 976-983.
39. Moloney G, Petsoglou C, Ball M, et al. Descemetorhexis without grafting for Fuchs endothelial dystrophy-supplementation with topical Ripasudil. *Cornea.* 2017; 36(6): 642-648.
40. Huang MJ, Kane S, Dhaliwal DK. Descemetorhexis without endothelial keratoplasty versus DMEK for treatment of Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Cornea.* 2018; 37(12): 1479-1483.
41. Moloney G, Garcerant Congote D, Hirnschall N, et al. Descemet stripping only supplemented with topical Ripasudil for Fuchs endothelial dystrophy 12-Month outcomes of the Sydney Eye Hospital Study. *Cornea.* 2021; 40(3): 320-326.
42. Davies E. Case Series: Novel utilization of Rho-Kinase inhibitor for the treatment of corneal edema. *Cornea.* 2021; 40(1): 116-120.
43. Kim KW, Shin YJ, Lee SCS. Novel ROCK Inhibitors, Sovesudil and PHP-0961, enhance proliferation, adhesion and migration of corneal endothelial cells. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(23).
44. Shin H, Min JK, Kim NR, et al. Effects of Y-27632, a ROCK inhibitor on human corneal endothelial cells cultured by isolating human corneal endothelial progenitor cells. *Korean J Ophthalmol.* Published online December 22, 2022.
45. Ha A, Kim YK, Jeoung JW, et al. Sovesudil (locally acting rho kinase inhibitor) for the treatment of normal-tension glaucoma: the randomized phase II study. *Acta Ophthalmol.* 2022; 100(2): e470-e477.
46. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. Application of Rho Kinase inhibitors for the treatment of corneal endothelial diseases. *J Ophthalmol.* 2017; 2017: 2646904.
47. Nakagawa H, Koizumi N, Okumura N, et al. Morphological changes of human corneal endothelial cells after Rho-Associated kinase inhibitor eye drop (Ripasudil) administration: A prospective open-label clinical study. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0136802.
48. Kinoshita S, Colby KA, Kruse FE. A close look at the clinical efficacy of Rho-associated protein kinase inhibitor eye drops for Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Cornea.* 2021; 40(10): 1225-1228.
49. Al-Humimat G, Marashdeh I, Daradkeh D, et al. Investigational Rho Kinase inhibitors for the treatment of glaucoma. *J Exp Pharmacol.* 2021; 13: 197-212.
50. Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, et al; K-115 Clinical Study Group. Intra-ocular pressure-lowering effects of a Rho kinase inhibitor, ripasudil (K-115), over 24 hours in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension: a randomized, open-label, crossover study. *Acta Ophthalmol.* 2015; 93(4): e254-60.
51. Singh IP, Fechtner RD, Myers JS, et al. Pooled efficacy and safety profile of Netarsudil ophthalmic solution 0.02% in patients with open-angle glaucoma or ocular hypertension. *J Glaucoma.* 2020; 29(10): 878-884.
52. Tanihara H, Inoue T, Yamamoto T, et al; K-115 Clinical Study Group. Phase 2 randomized clinical study of a Rho kinase

- inhibitor, K-115, in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Am J Ophthalmol.* 2013; 156(4): 731-736.
53. Tanihara H, Kakuda T, Sano T, et al. Safety and efficacy of ripasudil in Japanese patients with glaucoma or ocular hypertension: 12-month interim analysis of ROCK-J, a post-marketing surveillance study. *BMC Ophthalmol.* 2020; 20(1): 275.
 54. Ganesh D, Coleman AL, Shibayama VP, et al. Netarsudil-induced corneal flattening in a child with secondary open-angle glaucoma. *Case Rep Ophthalmol.* 2022; 13(2): 330-335.
 55. Fernandez MM. Reticular epithelial edema in edematous corneas treated with Netarsudil. *Ophthalmology.* 2018; 125(11): 1709.
 56. Tran JA, Jurkunas U V, Yin J, et al. Netarsudil-associated reticular corneal epithelial edema. *Am J Ophthalmol case reports.* 2022; 25: 101287.
 57. Garcerant D, Hirschall N, Toalster N, et al. Descemet's stripping without endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol.* 2019; 30(4): 275-285.
 58. Bhargava M, Sen S, Bhambhani V, et al. Reticular epithelial corneal edema as a novel side-effect of Rho Kinase Inhibitors: An Indian scenario. *Indian J Ophthalmol.* 2022; 70(4): 1163-1170.
 59. Lyons LJ, Wu KY, Baratz KH, et al. Honeycomb epithelial edema associated with Rho Kinase inhibition: a case series and review of the literature. *Cornea.* 2022; 41(2): 243-248.
 60. Wisely CE, Liu KC, Gupta D, et al. Reticular bullous epithelial edema in corneas treated with Netarsudil: a case series. *Am J Ophthalmol.* 2020; 217: 20-26.
 61. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial transplantation in a primate: possible future clinical application in corneal endothelial regenerative medicine. *Cornea.* 2008; 27 Suppl 1: S48-55.
 62. Song ES, Park JH, Ha SS, et al. Novel corneal endothelial cell carrier couples a biodegradable polymer and a mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022; 14(10): 12116-12129.
 63. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(10): 4519-4526.
 64. Kimoto M, Shima N, Yamaguchi M, et al. Development of a bioengineered corneal endothelial cell sheet to fit the corneal curvature. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014; 55(4): 2337-2343.
 65. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. *N Engl J Med.* 2018; 378(11): 995-1003.
 66. Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S. Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. *Exp Eye Res.* 2012; 95(1): 60-67.
 67. Ye EA, Chung HS, Park Y, et al. Induction of corneal endothelial-like cells from mesenchymal stem cells of the umbilical cord. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(23).
 68. Achiron A, Feldman A, Karmona L, et al. Prophylactic exposure of human corneal endothelial cells to Rho-associated kinase inhibitor reduced apoptosis rate after phacoemulsification: Ex vivo study. *J Cataract Refract Surg.* 2018; 44(10): 1261-1266.