

La inhibición de la cinasa de Rho como posible terapia de la hiperreactividad bronquial

BETTINA SOMMER*

VERÓNICA CARBAJAL*

* Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial.
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

Trabajo recibido: 20-IV-2009; aceptado: 20-VII-2009

Conflicto de intereses: Ninguno

RESUMEN

La contracción del músculo liso de las vías aéreas en respuesta a diversos estímulos disminuye el diámetro de las vías aéreas y en enfermedades como el asma reviste importancia, pues esta contracción se exagera. Una de las líneas de estudio que busca

Palabras clave:

Hiperreactividad bronquial, proteína G monomérica Rho, cinasa de Rho ROCK, Y-27632, fasudil.

Key words:

Airway hyperresponsiveness, monomeric G protein Rho, Rho kinase ROCK, Y-27632, fasudil.

documentar la posible alteración en la contracción del músculo liso de las vías aéreas en los asmáticos se refiere a la vía de señalización intracelular mediada por la proteína G monomérica Rho y su principal cinasa efectora (ROCK). Este artículo refiere algunos indicios que apuntan a que la inhibición farmacológica de esta vía de señalización tendría potencial terapéutico.

ABSTRACT

Airway smooth muscle contraction in response to diverse stimuli diminishes patency and this issue becomes clinically important in ailments like asthma. A researchers concern is to explain if the Rho/ROCK signaling pathway might be altered in asthmatic airways. This article reviews some of the scientific literature that points out the therapeutic potential that the inhibition of the Rho/ROCK signaling pathway would have in asthmatics.

101

INTRODUCCIÓN

Algunos padecimientos respiratorios obstructivos de los humanos se caracterizan por la constricción exagerada de las vías aéreas en respuesta a estímulos inespecíficos, y el asma es el ejemplo más ilustrativo de esta respuesta patofisiológica.

Desafortunadamente, los mecanismos que desembocan en hiperreactividad bronquial permanecen sin aclararse del todo. El alivio rápido

que experimentan la mayoría de los enfermos asmáticos con la inhalación de agonistas β_2 adrenérgicos sugiere un aumento en la capacidad de contracción del músculo liso de las vías aéreas (MLVA), predisponiendo a la broncoconstricción.¹ Por otro lado, las vías aéreas del enfermo asmático sujetas continuamente a la inflamación sufren cambios estructurales (hipertrofia e hiperplasia del MLVA, entre otros) que se piensa favorecen dicha hiperreactividad.^{2,3} Además de la hiperplasia e

hipertrofia de las células del músculo liso, los miocitos pueden sufrir cambios fenotípicos y funcionales en respuesta a los mediadores proinflamatorios asociados con la enfermedad asmática.⁴ Algunos autores han reportado alteraciones en la cantidad de proteínas relacionadas con la contracción en el músculo liso en biopsias bronquiales de enfermos asmáticos, además de que dichos miocitos se contrajeron con mayor fuerza y rapidez.⁵ Estos indicios apuntan a la importancia de tener un mejor conocimiento de los mecanismos de contracción del MLVA para implementar nuevas y mejores terapias para el asma.

CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO DE LAS VÍAS AÉREAS

En general, la contracción del MLVA comienza por el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Este catión ingresa desde el exterior a través de canales membranales y también se libera de los almacenes intracelulares (principalmente del retículo sarcoplásmico). Entre otros eventos, el Ca^{2+} citoplasmático modifica la estructura de la calmodulina de manera que ésta es capaz de activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que dispara la contracción al fosforilar a la miosina en su fracción reguladora de 20 kDa (MLC_{20}).⁶ Paradójicamente, la concentración de Ca^{2+} citoplasmático no es proporcional a la fosforilación de MLC_{20} , pues está determinada por el balance entre la actividad de MLCK y la enzima encargada de la acción contraria (desfosforilar a la MLC_{20}), la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP; Figura 1). Este fenómeno se conoce como sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil y es la expresión fisiológica (contracción sostenida) de la inacción de la MLCP.⁷ Es aquí donde interviene la cinasa de Rho (ROCK), pues fosforila a la MLCP, inactivándola (Figura 2).

CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE RHO Y ROCK

Rho es una proteína G monomérica citoplasmática y el principal activador de ROCK.⁸ La función de Rho está regulada por tres grupos de proteínas: inhibidores de la disociación de guanina

(GDI), factores de intercambio de guanina (GEF) y proteínas activadoras de GTP-asa (GAP). En su forma inactiva y unida a GDI y GDP, Rho está en el citoplasma. Los GEF activarán a Rho, al promover el intercambio de GDP por GTP; mientras que las GAP inducen lo contrario. Cuando está unida a GTP, Rho se traslada a la membrana donde activa a ROCK⁷ (Figura 3).

Está muy bien documentado que Rho y consecuentemente ROCK, se activan por una gran variedad de receptores membranales acoplados a proteínas G, particularmente a las G12/13 a través de la interacción con RhoGEFs. Los receptores Gq/11 también son capaces de activar a Rho.⁹ Considerando que la mayoría de los receptores que inducen contracción del MLVA están acoplados a Gq (muscarínico, histaminérgico, sustancia P, serotoninérgico, endotelina, etc.), recientemente se ha propuesto que Rho/ROCK es la vía de señaliza-

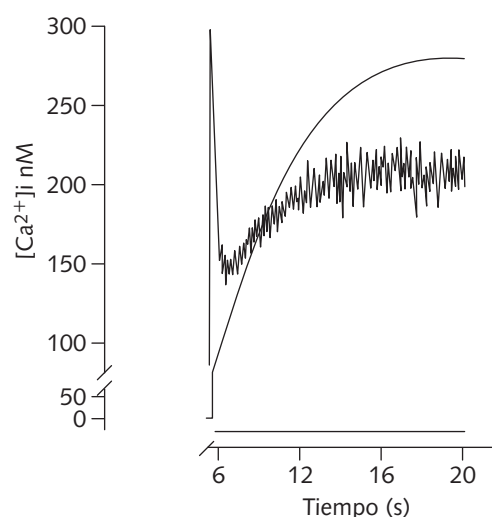


Figura 1. Registro original de la medición simultánea de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$, trazo oscilatorio) y la contracción (línea sin oscilaciones) en tiras de músculo liso de tráquea de bovino. Estos trazos se observan cuando el tejido es estimulado con un agente broncoconstrictor (carbacol, histamina, serotonina, etc.); en el registro de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se observa un pico que corresponde a la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, seguido de una meseta que representa al Ca^{2+} extracelular que entró por los canales catiónicos membranales. Nótese que la contracción se mantiene aun cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuyó; este es el fenómeno de sensibilización al Ca^{2+} .

ción intracelular en la que convergen éstos y otros estímulos generadores de hiperreactividad bronquial.¹⁰

CINASA DE RHO (ROCK)

ROCK es el efector mejor caracterizado de Rho. Es una cinasa de serina/treonina y se activa por

interacción directa con un dominio en la porción carboxi-terminal de Rho-GTP (en la membrana citoplásmica). Además de su papel en la contracción muscular, se ha postulado que ROCK participa en la migración celular, transcripción genética, adhesión celular, remodelación del citoesqueleto y proliferación celular.¹¹ En el MLVA, ROCK fosforila a la MLCP, inhibiéndola (Figura 2). Esta

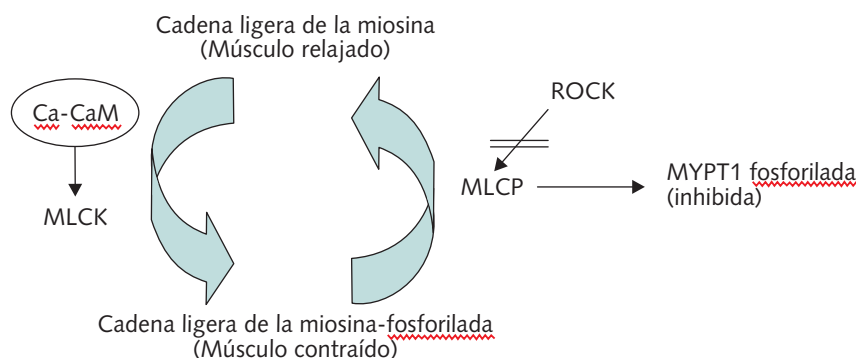


Figura 2. Inactivación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina por la cinasa de Rho. La contracción del músculo liso de las vías aéreas comienza por el aumento del Ca^{2+} intracelular. El incremento de este catión modifica la estructura de la calmodulina (Ca-CaM) y ésta activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) que fosforila a la cadena ligera de la miosina. La fosforilación de la cadena ligera de miosina está determinada por el balance entre la actividad de MLCK y la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP). La MLCP es inhibida por la cinasa de Rho (ROCK) que la fosforila en su subunidad reguladora (MYPT1).

103

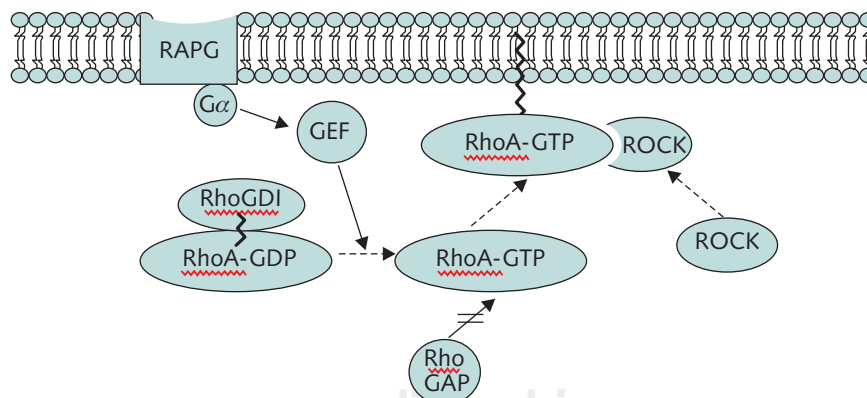


Figura 3. Vía de señalización Rho/ROCK. Rho está en el citoplasma unida al inhibidor de la disociación de guanina (RhoGDI) que la mantiene en su estado GDP (inactiva). Cuando se activa algún receptor acoplado a proteínas G (RAPG) particularmente los G12/13 y los Gq/11, los factores de intercambio de guanina (GEF) promueven la separación de GDI y el intercambio de GDP por GTP. Este es el estado activo de la Rho que se transfiere a la membrana citoplasmática para ahí activar a la cinasa de Rho (ROCK). Una vez acabada su función, Rho-GTP regresa a Rho-GDP por la desfosforilación realizada por la proteína activadora de GTPasa (GAP).

fosforilación se lleva a cabo generalmente en las treoninas 696 y/o 852 de la subunidad reguladora de la MLCP, lo cual es especie-dependiente e impide que la fosfatasa se dirija a su sustrato, la miosina fosforilada, para desfosforilarla.¹² El aumento en la tensión y/o fosforilación de la cadena ligera en su fracción regulatoria de 20 kDa a una concentración constante de calcio se define como sensibilización a calcio.

Por otro lado, la participación de ROCK en el mantenimiento de la contracción del MLVA depende, aparentemente, del estímulo que la induce. Así, en músculo liso bronquial humano, los factores de crecimiento producen una contracción mediada exclusivamente por ROCK, mientras que la contracción inducida por histamina es sólo parcialmente dependiente de ROCK.¹³ La acción de fármacos muscarínicos y la despolarización inducida por el cloruro de potasio son también parcialmente dependientes de ROCK, aunque esta última depende en mayor grado de la cinasa.^{14,15} Recientemente, se ha informado que en el músculo liso de la tráquea bovina, la contracción por serotonina depende primordialmente de ROCK.¹⁶ Estas evidencias apuntan a la complejidad de las interacciones entre receptores y canales iónicos membranales con la cascada de señalización Rho/ROCK. Sin embargo, no hay que perder de vista que un sinnúmero de agentes broncoconstrictores convergen en esta señalización: la acetilcolina, el principal neurotransmisor parasimpático y la sustancia P, que se co-libera con ella; la histamina liberada por los mastocitos en los pacientes de asma alérgica; los leucotrienos; algunas prostaglandinas; la serotonina; la endotelina, etc. No queda duda de que la inhibición farmacológica de la vía de señalización Rho/ROCK, o bien sólo de ROCK, parecen blancos interesantes para el tratamiento del asma. Más aún cuando hay múltiples evidencias de que, en condiciones patofisiológicas, los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} están incrementados.

Varios autores han reportado haber encontrado aumento de la MLCK en condiciones experimentales que emulaban inflamación asmática. Así, usando un modelo de sensibilización pasiva, Ammit AJ *et al*,¹⁷ encontraron un incremento en la cantidad de esa cinasa en bronquios humanos expuestos a suero atópico. En miocitos aislados de biopsias bronquiales de enfermos asmáticos, Ma X

et al,⁵ observaron que éstos se contraen con mayor fuerza y rapidez y que esto estaba aunado a un aumento en MLCK.

En cuanto a la vía de señalización Rho/ROCK, se ha evidenciado que Rho aumenta en cantidad en el músculo liso bronquial de ratas sometidas a retos antigénicos repetidos, y que la hiperreactividad a la acetilcolina en esos tejidos disminuye en proporción a la inhibición de Rho.¹⁸ En contraste, un reto único a ovalbúmina en cobayos no indujo hiperreactividad a la metacolina, pero sí a la histamina y la $\text{PGF}^{2\alpha}$, aun cuando los pulmones de los animales experimentales mostraron un aumento en Rho. Parece entonces que un reto antigénico repetido pudiera contribuir a la optimización de la vía de señalización Rho/ROCK, originando que las vías aéreas desarrollen hiperreactividad a los agentes colinérgicos.¹⁹

INHIBIDORES DE ROCK Y-27632

El fármaco inhibidor de ROCK más empleado experimentalmente es el Y-27632 (dihidrocloruro de (+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-4-piridil ciclohexancarbox-amida). El Y-27632 inhibe los dos tipos de ROCK (ROCK-1 y ROCK-2) con constantes de inhibición similares ($K_i = 0.22 \mu\text{M}$ y $0.30 \mu\text{M}$, respectivamente). Estas concentraciones se refieren a la CI_{50} usadas *in vitro* para la relajación de músculos lisos vascular y traqueal.²⁰ Algunas otras cinasas ($\text{PKC}\alpha$, PKA, MLCK) se alteran sólo con concentraciones mayores.²¹

Fasudil (HA-1077)

Este compuesto (1-(5-isoquinolinsulfonil)-homopiperazina) tiene alta afinidad por la ROCK ($0.33 \mu\text{M}$); sin embargo, también es un potente inhibidor de PKA, PKC y MLCK en concentraciones altas.²²

En 1999, Yoshii A *et al*,²³ publicaron que, en estudios *in vitro*, el Y-27632 relaja las tráqueas de conejo y humanas previamente contraídas con carbacol, siendo éste uno de los primeros reportes en apuntar a que la inhibición de ROCK podría ser usada como método terapéutico. Hoy en día, el fasudil está siendo probado en diversos estudios clínicos,²⁴⁻²⁸ pero en ninguno relacionado con el asma a pesar de las evidencias experimentales en animales. Los avances logrados en los protocolos

clínicos de enfermedades cardiovasculares son particularmente relevantes, por lo que se mencionarán algunos aun cuando rebasen el objetivo de este artículo. El fasudil intravenoso es usado en el tratamiento del vasoespasmo cerebral,^{29,30} y se administra por vía oral para la angina pectoris.³¹

En pacientes con angina vasoespástica, el fasudil intracoronario inhibe el espasmo coronario inducido por acetilcolina y la consecuente isquemia del miocardio.³² Este medicamento también es efectivo en el tratamiento de la angina microvascular³³ y del espasmo coronario resistente a terapia vasodilatadora con bloqueadores de canales de calcio y nitratos después de la cirugía de *bypass* de la arteria coronaria.³⁴

La infusión intravenosa de fasudil reduce significativamente la resistencia vascular en pacientes con hipertensión pulmonar.³⁵ La administración intravenosa en la fase aguda de un infarto demostró los efectos benéficos de este medicamento contra el daño neuronal por isquemia.³⁶ En pacientes con falla cardíaca, la infusión arterial de fasudil incrementa el flujo sanguíneo en el antebrazo, sugiriendo que RhoA/ROCK participa en el aumento de la resistencia vascular periférica por falla cardíaca en humanos.³⁷

En un modelo animal de hipertensión pulmonar, Nagaoka T *et al*,³⁸ compararon los efectos del Y-27632 y el fasudil administrados por vía oral o inhalada, y demostraron que cinco minutos de inhalación de cualquiera de ellos, producen una disminución de la presión arterial pulmonar sin reducir la presión arterial sistémica. Este hallazgo apoya el potencial terapéutico del Y-27632, también comprobado por Schaafsma D *et al*,¹⁹ quienes administraron inhalaciones del Y-27632 (5 mM, 5 minutos) a cobayos sensibilizados a la ovalbúmina y demostraron que la hiperreactividad a la histamina disminuye. Es interesante que estos últimos autores reporten que incluso los animales control que recibieron el Y-27632 inhalado mostraron una broncoconstricción menor en respuesta a la histamina, indicando que las nebulizaciones de Y-27632 podrían ser profilácticas. Esta conclusión también es sustentada por Iizuka K *et al*,³⁹ quienes informaron que el aumento en la resistencia de las vías aéreas inducido por un reto antigénico en cobayos sensibilizados es inhibido por el Y-27632.

Otros investigadores han abordado la hiperreactividad de las vías aéreas como el resultado de la acción conjunta entre sustancias inflamatorias. Liu C *et al*,⁴⁰ reportan que, en el músculo liso de tráquea bovina, algunos isoprostanoídes como la 8-isoprostaglandina E₂ (15-E_{2t}-IsoP) aumentan las respuestas de contracción a carbachol y que esa hiperreactividad se revierte con el Y-27632 y con el vaciado del Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, lo cual sugiere que esta hiperreactividad involucra la estimulación de la vía de señalización Rho/ROCK y/o la liberación del Ca²⁺ citoplasmático. Hashimoto T *et al*,⁴¹ investigaron, en cobayos *in vivo*, los efectos de la inhalación del ácido lisofosfatídico (LPA) en la inducción de hiperreactividad de las vías aéreas a la acetilcolina, misma que inhibieron con la inhalación del Y-27632. Sin embargo, LPA no produjo hiperreactividad a la acetilcolina exógena en los parénquimas pulmonares. Al usar la mepiramina, un antagonista del receptor histaminérgico H¹ o el ketotifen, un inhibidor de la liberación de histamina, inhibieron la hiperreactividad, y la incubación de fragmentos del parénquima pulmonar con LPA produjo liberación de histamina. Estos resultados sugieren que la hiperreactividad de las vías aéreas inducida por LPA es debida a la activación de Rho/ROCK y a la consecuente liberación de histamina.

En el asma atópica el flujo de células inflamatorias inducido por el reto alérgico podría considerarse fundamental en el desarrollo de la hiperreactividad de las vías aéreas. Además de otros tipos de células inflamatorias, los linfocitos CD4⁺ y los eosinófilos suelen encontrarse en el asma alérgica.⁴² En varios reportes se indica que estos últimos están involucrados en la hiperreactividad bronquial,⁴³⁻⁴⁵ mientras que Adachi T *et al*,⁴⁶ reportaron que Rho/ROCK es partícipe de la quimiotaxis de eosinófilos desencadenada por la eotaxina. Interesados en ampliar el conocimiento de la participación de Rho/ROCK en la inflamación eosinofílica del asma atópica, Henry PJ *et al*,⁴⁷ inhibieron exitosamente la migración pulmonar eosinofílica en un modelo de ratones sensibilizados a la ovalbúmina con el uso del Y-27632.

Por otro lado, también se ha estudiado intensamente la importancia de la vía de señalización Rho/ROCK en la migración o función de otras células inflamatorias.⁴⁸ En la inflamación, un au-

mento en la permeabilidad capilar favorece el tránsito de células inflamatorias desde el torrente sanguíneo hasta el espacio intersticial. Uno de los papeles preponderantes de Rho/ROCK parece ser mantener la fosforilación de la actinmiosina de las células endoteliales, que al estar retraídas, propician el aumento de la permeabilidad vascular.⁴⁹ Saito H *et ál*,⁴⁸ reportaron que la inhibición de ROCK o de la MLCK disminuye la fosforilación de la actinmiosina y evitan la extravasación de células inflamatorias.

Es, entonces, indudable la importancia de Rho/ROCK en la hiperreactividad pulmonar, algunos investigadores han intentado resolver el problema desde una nueva perspectiva: evitar el inicio de la cascada de señalización Rho/ROCK. Esta idea es consecuente con la inhibición de ROCK e igualmente promisoría. Partiendo de las observaciones del aumento en cantidad de Rho en tejidos de animales sensibilizados^{19,50} y de corroborar su funcionalidad midiendo el incremento de su traslado a la membrana en animales sensibilizados,⁵⁰ Chiba Y *et ál*,⁵¹ reportaron recientemente que el uso de lovastatin (4 mg/kg/día, ip) en ratas sensibilizadas, disminuyó significativamente la hiperreactividad a la acetilcolina. Unos años antes, Takeda N *et ál*,⁵² reportaron haber encontrado que el simvastatin inhibe significativamente la proliferación de células vasculares y de músculo liso de vías aéreas inducida por suero fetal bovino; ese efecto antiproliferativo fue mimetizado por la exoenzima C3, un inhibidor de RhoA y por Y-27632. Los hallazgos de estos investigadores se relacionan si consideramos que la luz de las vías aéreas hiperplásicas se cerrará más fácilmente que una vía aérea normal; es decir, estará predispuesta a la hiperreactividad.

En resumen, existen evidencias de que Rho y su cinasa efectora, ROCK, son protagonistas importantes en la hiperreactividad de las vías aéreas característica del asma,⁵³ y la investigación de los efectos de los inhibidores de esta vía de señalización en ese padecimiento debe considerarse prioritaria.

REFERENCIAS

1. Chiba Y, Misawa M. *The role of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscle contraction in*

airway hyperresponsiveness. J Smooth Muscle Res 2004;40:155-167.

2. Lambert RK, Wiggs BR, Kuwano K, Hogg JC, Paré PD. *Functional significance of increased airway smooth muscle in asthma and COPD*. J Appl Physiol 1993;74:2771-2781.
3. Macklem PT. *A theoretical analysis of the effect of airway smooth muscle load on airway narrowing*. Am J Respir Crit Care Med 1996;153:83-89.
4. Halayko AJ, Camoretti-Mercado B, Forsythe SM, *et ál*. *Divergent differentiation paths in airway smooth muscle culture: induction of functionally contractile myocytes*. Am J Physiol 1999;276:L197-L206.
5. Ma X, Cheng Z, Kong H, *et ál*. *Changes in biophysical and biochemical properties of single bronchial smooth muscle cells from asthmatic subjects*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;283:L1181-L1189.
6. Pfitzer G. *Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle*. J Appl Physiol 2001;91:497-503.
7. Somlyo AP, Somlyo AV. *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. Physiol Rev 2003;83:1325-1358.
8. Kimura K, Ito M, Amano M, *et ál*. *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science 1996;273:245-248.
9. Lutz S, Freichel-Blomquist A, Yang Y, *et ál*. *The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA*. J Biol Chem 2005;280:11134-11139.
10. Janssen LJ, Killian K. *Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions*. Respir Res 2006;7:123-134.
11. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. *Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells*. Trends Pharmacol Sci 2001;22:32-39.
12. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. *Regulation and functions of Rho-associated kinase*. Exp Cell Res 2000;261:44-51.
13. Gosens R, Schaafsma D, Grootte Bromhaar MM, *et ál*. *Growth factor-induced contraction of human bronchial smooth muscle is Rho-kinase-dependent*. Eur J Pharmacol 2004;494:73-76.
14. Janssen LJ, Tazzeo T, Zuo J, Pertens E, Keshavjee S. *KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004;287:L852-L858.
15. Janssen LJ, Wattie J, Lu-Chao H, Tazzeo T. *Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles*. J Appl Physiol 2001;91:1142-1151.
16. Sommer B, Montaña LM, Carbajal V, *et ál*. *Extraction of membrane cholesterol disrupts caveolae and impairs serotonergic (5-HT_{2A}) and histaminergic (H₁) responses in bovine airway smooth muscle: role of Rho-kinase*. Can J Physiol Pharmacol 2009;87:180-195.
17. Ammit AJ, Armour CL, Black JL. *Smooth-muscle myosin light-chain kinase content is increased in human sensitized airways*. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:257-263.

18. Chiba Y, Takada Y, Miyamoto S, Mitsui Saito M, Karaki H, Misawa M. *Augmented acetylcholine-induced, Rho-mediated Ca^{2+} sensitization of bronchial smooth muscle contraction in antigen-induced airway hyper-responsive rats.* Br J Pharmacol 1999;127:597-600.
19. Schaafsma D, Gosens R, Bos IS, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA. *Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction.* Br J Pharmacol 2004;143:477-484.
20. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, et al. *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension.* Nature 1997;389:990-994.
21. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. *Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases.* Mol Pharmacol 2000;57: 976-983.
22. Sasaki Y, Suzuki M, Hidaka H. *The novel and specific Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoline)sulfonyl]-homopiperazine as a probing molecule for Rho-kinase-involved pathway.* Pharmacol Ther 2002;93:225-232.
23. Yoshii A, Iizuka K, Dobashi K, et al. *Relaxation of contracted rabbit tracheal and human bronchial smooth muscle by Y-27632 through inhibition of Ca^{2+} sensitization.* Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:1190-1200.
24. Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, Sugiyama H, Seto M, Takakura K. *Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study.* Neurol Med Chir (Tokyo) 2008;48:241-247.
25. Otsuka T, Ibuki C, Suzuki T, et al. *Administration of the Rho-kinase inhibitor, fasudil, following nitroglycerin additionally dilates the site of coronary spasm in patients with vasospastic angina.* Coron Artery Dis 2008;19:105-110.
26. Fukumoto Y, Mohri M, Inokuchi K, et al. *Anti-ischemic effects of fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina.* J Cardiovasc Pharmacol 2007;49:117-121.
27. Hinderling PH, Karara AH, Tao B, Pawula M, Wilding I, Lu M. *Systemic availability of the active metabolite hydroxy-fasudil after administration of fasudil to different sites of the human gastrointestinal tract.* J Clin Pharmacol 2007;47:19-25.
28. Li F, Xia W, Yuan S, Sun R. *Acute inhibition of Rho-kinase attenuates pulmonary hypertension in patients with congenital heart disease.* Pediatr Cardiol 2009;30:363-366.
29. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, et al. *Dose escalation trial of a novel calcium antagonist, AT877, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage.* Acta Neurochir (Wien) 1990;107:11-15.
30. Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K, et al. *Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial.* J Neurosurg 1992;76:571-577.
31. Vicari RM, Chaitman B, Keefe D, et al; Fasudil Study Group. *Efficacy and safety of fasudil in patients with stable angina: a double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial.* J Am Coll Cardiol 2005;46:1803-1811.
32. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. *Suppression of coronary artery spasm by a Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina.* Circulation 2002;105:1545-1547.
33. Mohri M, Shimokawa H, Hirakawa Y, Masumoto A, Takeshita A. *Rho-kinase inhibition with intracoronary fasudil prevents myocardial ischemia in patients with coronary microvascular spasm.* J Am Coll Cardiol 2003;41:15-19.
34. Inokuchi K, Ito A, Fukumoto Y, et al. *Usefulness of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, to treat intractable severe coronary spasm after coronary artery bypass surgery.* J Cardiovasc Pharmacol 2004;44:275-277.
35. Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, et al. *Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension.* Heart 2005;91:391-392.
36. Shibuya M, Hirai S, Seto M, Satoh S, Ohtomo E; Fasudil Ischemic Stroke Study Group. *Effects of fasudil in acute ischemic stroke: results of a prospective placebo-controlled double-blind trial.* J Neurol Sci 2005;238:31-39.
37. Kishi T, Hirooka Y, Masumoto A, et al. *Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure.* Circulation 2005;111:2741-2747.
38. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, et al. *Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension.* Am J Respir Crit Care Med 2005;171:494-499.
39. Iizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, et al. *Evaluation of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs.* Eur J Pharmacol 2000;406:273-279.
40. Liu C, Tazzeo T, Janssen LJ. *Isoprostane-induced airway hyperresponsiveness is dependent on internal Ca^{2+} handling and Rho/ROCK signaling.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2006;291:L1177-L1184.
41. Hashimoto T, Nakano Y, Yamashita M, Fang YI, Ohata H, Momose K. *Role of Rho-associated protein kinase and histamine in lysophosphatidic acid-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs.* Jpn J Pharmacol 2002;88:256-261.
42. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. *Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling.* Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1720-1745.
43. Gleich GJ, Flavahan NA, Fujisawa T, Vanhoutte PM. *The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperactivity.* J Allergy Clin Immunol 1988;81:776-781.
44. Costello RW, Jacoby DB, Gleich GJ, Fryer AD. *Eosinophils and airway nerves in asthma.* Histol Histopathol 2000;15:861-868.
45. Lee JJ, Dimina D, Macias MP, et al. *Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils.* Science 2004;305:1773-1776.
46. Adachi T, Vita R, Sannohe S, et al. *The functional role of rho and rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils.* J Immunol 2001;167:4609-4615.
47. Henry PJ, Mann TS, Goldie RG. *A rho kinase inhibitor, Y-27632 inhibits pulmonary eosinophilia, bronchocon-*

- striction and airways hyperresponsiveness in allergic mice.* Pulm Pharmacol Ther 2005;18:67-74.
48. Saito H, Minamiya Y, Saito S, Ogawa J. *Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation.* J Leukoc Biol 2002;72:829-836.
49. Wettschureck N, Offermanns S. *Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology.* J Mol Med 2002;80:629-638.
50. Chiba Y, Sakai H, Misawa M. *Augmented acetylcholine-induced translocation of RhoA in bronchial smooth muscle from antigen-induced airway hyperresponsive rats.* Br J Pharmacol 2001;133:886-890.
51. Chiba Y, Arima J, Sakai H, Misawa M. *Lovastatin inhibits bronchial hyperresponsiveness by reducing RhoA signaling in rat allergic asthma.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008;294:L705-L713.
52. Takeda N, Kondo M, Ito S, Ito Y, Shimokata K, Kume H. *Role of RhoA inactivation in reduced cell proliferation of human airway smooth muscle by simvastatin.* Am J Respir Cell Mol Biol 2006;35:722-729.
53. Hirst SJ. *Airway smooth muscle as a target in asthma.* Clin Exp Allergy 2000;30 Suppl 1:54-59.

Correspondencia:

Dra. Bettina Sommer,
Departamento de Investigación en
Hiperreactividad Bronquial.
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
Calzada de Tlalpan 4502, colonia
Sección XVI. México, D.F., 14080
Teléfono 56 66 58 68
Correo electrónico:
bsommerc@hotmail.com