# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Medicina

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA







# La quinasa ROCK2 regula el pronóstico funcional en los pacientes con hemorragias intraparenquimatosas

# **TESIS DOCTORAL**

María Dolores Calabria Gallego

Septiembre de 2021



# VNiVERSiDAD ÐSALAMANCA

Dra. Ángeles Almeida Parra, Investigadora Científica del Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG. Universidad de Salamanca, CSIC), Jefa del Grupo Neurobiología Molecular del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL. Hospital Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, CSIC) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca y Dra. Cristina Rodríguez González, Investigadora del IBSAL y del IBFG y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

#### CERTIFICAN

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> María Dolores Calabria Gallego, titulado "La quinasa Rock2 regula el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragias intraparenquimatosas", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan su presentación

Y para que así conste, firman la presente certificación en Salamanca, a 25 de septiembre de 2021.

Fdo. Dra Ángeles Almeida Parra

Fdo. Dra Cristina Rodríguez González

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que han palpado el misterio de hacer el bien al prójimo.

### Agradecimientos

Agradezco a Cristina Rodríguez y a Ángeles Almeida, por tener tanta paciencia conmigo.

A Juan Pedro Bolaños por su interacción y colaboración en la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) por su colaboración para la realización de este trabajo.

A los miembros del laboratorio 2.7/2.8, por acogerme y hacer simpáticas mis tardes allí. A mis padres por estar incondicionalmente a mi favor.

A Lydia Jiménez y a Maripina Sanz por situarme en la realidad.

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

- AAC: Angiopatía amiloide cerebral
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ANG-1: Angiopoyetina 1
- ANOVA: Análisis de la varianza
- ATP: Adenosín trifosfato
- BCL-2: B-cell B linfoma 2
- BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
- BHE: Barrera hematoencefálica
- CPI17: Proteína de 17 kD inhibidora de proteína fosfatasa 1
- EPCs: Células progenitoras endoteliales
- HIC: Hemorragia intracerebral
- HIP: Hemorragia intraparenquimatosa
- HSA: Hemorragia subaracnoidea
- HTA: Hipertensión arterial
- INR: International normalized ratio
- LDL: Colesterol de baja densidad
- mRankin o mRS: Escala de Rankin modificada
- MMP: Metaloproteasas de la matriz
- MLC: Cadena ligera de la miosina
- MLCK: Miosina quinasa
- MLCP: Miosina fosfatasa
- MYPT1: Subunidad reguladora de la miosina fosfatasa

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale (escala para ictus del instituto

nacional de salud de Estados Unidos)

NLR: receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótido

NLRP3: NLR dominio contenedor de pirina 3

NMDA: N-metil-D-aspartato

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PAR: Receptor activado por proteasa

PH: Dominio de homología a pleckstrina

**RBD:** Dominio de unión a Rho

RM: Resonancia magnética

ROCK: Proteína quinasa asociada a Rho

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SDF-1a: factor derivado del estroma tipo 1a

S.E.M.: Error estándar de la media

SNC: Sistema nervioso central

TAC: Tomografía axial computerizada

TAD: Tensión arterial diastólica

TAS: Tensión arterial sistólica

**TLR:** Receptor tipo toll

**TNF**: Factor de necrosis tumoral

**TUNEL**: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labelling

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. HEMORRAGIA INTRAPARENQUIMATOSA	3
1.1. Clasificación de las hemorragias intracerebrales	3
1.1.1. Hemorragias intraparenquimatosas primarias. Clasificación, fisiopatología y característica principales	ıs 4
1.2. Pronóstico e impacto sociosanitario	8
1.3. Presentación clínica y manejo	11
2. BASES MOLECULARES DE LAS HEMORRAGIAS INTRAPARENQUIMATOSAS	15
2.1. Edema perilesional	15
2.2. Barrera hematoencefálica	17
2.3. Cascada de la coagulación	19
2.4. Hemólisis	20
2.5. Neuroinflamación	21
2.6. Muerte celular	22
2.6.1. Necrosis	23
2.6.2. Apoptosis	24
2.6.3. Piroptosis	25
2.6.4. Autofagia	26
2.6.5. Ferroptosis	27
3. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS QUINASAS ROCK	29
3.1. Activación y función de ROCK2 en el SNC	31
3.1.1. Daño axonal y supervivencia neuronal	34
3.1.2. Citoesqueleto y sinapsis	35
3.1.3. Sistema vascular	36
3.1.4. Isquemia cerebral	38
3.2. Inhibición de ROCK	38
4. POLIMORFISMOS DE INTERÉS EN EL GEN Rock2	40
4.1. rs978906. Un polimorfismo que modula los niveles de ROCK2	41
4.2. Thr431Asn. Un polimorfismo que afecta a la actividad de ROCK2	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	47
MATERIAL Y MÉTODOS	49
1. ESTUDIO CLÍNICO	51
1.1. Población de pacientes	51
1.2. Variables clínicas	52
1.3. Medida de los niveles séricos de BDNF, VEGF, Ang-1 y SDF-1 $lpha$	54
1.4. Determinación de células progenitoras en sangre periférica	54
1.5. Genotipado del polimorfismo rs978906 del gen Rock2	54
1.6. Genotipado del polimorfismo Thr431Asn del gen Rock2	56
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL	57

2.1. Modelo experimental de hemorragia intracerebral in vivo
2.2. Determinación del volumen de lesión58
2.3. Análisis de los niveles y actividad de ROCK2 59
2.3.1. Obtención de muestras
2.3.2. Determinación de la concentración de proteínas60
2.3.3. Electroforesis de proteínas en SDS-Page60
2.3.4. Detección de proteínas por Western-Blot61
3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO
RESULTADOS Y DISCUSIÓN
1. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS rs978906 Y Thr431Asn DE <i>Rock2</i> EN LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL
1.1. Análisis descriptivo general de la cohorte de pacientes con hemorragia intraparenquimatosa 66
1.2. Análisis del polimorfismo rs978906 de Rock2 en la hemorragia intraparenquimatosa
1.2.1. El polimorfismo rs978906 de Rock2 condiciona el pronóstico funciona de los pacientes con hemorragia intraparenquimatosa
1.2.2. El polimorfismo rs978906 de Rock2 condiciona el volumen de lesión tras la hemorragia 70
1.3. Análisis del polimorfismo Thr431Asn de Rock2 en la hemorragia intraparenquimatosa75
1.3.1. El polimorfismo <i>Thr431Asn</i> de <i>Rock2</i> condiciona el pronóstico funciona de los pacientes con hemorragia intraparenquimatosa
1.3.2. El polimorfismo Thr431Asn de Rock2 condiciona el volumen de lesión tras la hemorragia . 77
1.4. Un posible haplotipo de <i>Rock2</i> relacionado con el pronóstico funcional en hemorragia intraparenquimatosa
2. FUNCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs978906 Y Thr431Asn de <i>ROCK</i> 2 EN LA REPARACIÓN CEREBRAL TRAS LA HEMORRAGIA
2.1. Análisis de los niveles de células CD34+ en pacientes de hemorragia intraparenquimatosa 83
2.2. Análisis de los factores de crecimiento y citoquinas (VEGF, Ang-1, BDNF y SDF-1α) en la hemorragia intraparenquimatosa
3. ACTIVIDAD DE ROCK2 TRAS LA HEMORRAGIA INTRAPARENQUIMATOSA
3.1. Análisis de los niveles de ROCK2 tras la hemorragia intraparenquimatosa
3.2. La actividad de ROCK2 varía tras la hemorragia intraparenquimatosa
CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFIA

## **1. HEMORRAGIA INTRAPARENQUIMATOSA**

#### 1.1. Clasificación de las hemorragias intracerebrales

La hemorragia intraparenquimatosa (HIP) es un tipo de hemorragia intracerebral (HIC). En esta categoría también podemos encontrar la hemorragia subaracnoidea (HSA), la hemorragia intraventricular, el hematoma subdural, y el hematoma epidural (Caceres *et al.*, 2012), dependiendo de qué tipo de vaso sea el responsable de la extravasación de la sangre. Esto condicionará la localización de la hemorragia, hacia el parénquima cerebral o bien hacia los espacios meníngeos o ventriculares circundantes (Figura 1).



*Figura 1. Esquema-dibujo de las diferentes HIC (No se incluyen las HIP). A. Hemorragia subaracnoidea. B. Hemorragia intraventricular. C. Hematoma epidural. D. Hematoma subdural.* 

La HIP, a su vez, puede dividirse en primaria o secundaria, según su etiología. La causa de la HIP primaria es la ruptura de la pared arterial o arteriolar dañada, sobre todo a causa de hipertensión arterial (HTA) o angiopatía amiloide cerebral (AAC). En el caso de la HIP secundaria, ésta puede deberse a coagulopatías, trombosis venosa cerebral, enfermedad de moyamoya, vasculitis, tumores, ictus

isquémicos con transformación hemorrágica o a la ruptura de aneurismas micóticos o malformaciones vasculares, como en el caso de malformaciones arterio-venosas, fístulas arterio-venosas o cavernomas (Gross *et al.*, 2019).



Figura 2. Representación esquemática de las HIP primarias, atendiendo a su morfología y localización típicas. A. Hemorragia hipertensiva. B. Hemorragia por AAC.

# 1.1.1. Hemorragias intraparenquimatosas primarias. Clasificación, fisiopatología y características principales.

La HTA es el principal factor de riesgo modificable para el desarrollo de HIP (O'Donell *et al.*, 2010), constituyendo la HIP hipertensiva el 60-70% de los casos (Thabet *et al.*, 2017). El mecanismo fisiopatológico parece deberse a la desestructuración de la pared de las arteriolas perforantes secundariamente a lipohialinosis (proliferación fibroblástica con depósito de macrófagos y sustitución de tejido muscular liso por colágeno), lo que origina los denominados aneurismas de Charcot-Bouchard (Ziai *et al.*, 2018) que, finalmente por su fragilidad, se rompen dando lugar a la hemorragia.

Este tipo de hemorragias se localizan, por tanto, a nivel de las estructuras irrigadas principalmente por dichas arteriolas: ganglios de la base, tálamo, tronco del encéfalo y las zonas más profundas del cerebelo (Gross *et al.*, 2019). La arteriopatía de las perforantes, además, se ve potenciada por otros factores de riesgo conocidos, como el sexo masculino, el uso de anticoagulantes o antiagregantes, el hábito tabáquico, el consumo de alcohol, consumo de drogas de abuso (heroína, cocaína, anfetaminas y efedrina) (An *et al.*, 2017) y, en general, todos aquellos factores ampliamente reconocidos de riesgo vascular (Tabla 1). Aunque dada la contradicción existente entre los estudios (You *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013) no queda claro si presentar cifras bajas de colesterol de baja densidad (LDL) y de triglicéridos es un factor de riesgo para HIP o no.

Factores de riesgo modificables	HTA
	Fumador activo
	Consumo de alcohol excesivo
	Anticoagulación
	Antiagregación
	Consumo de drogas simpáticomiméticas (cocaína, heroína,
	anfetaminas, fenilpropanolamina y adrenalina)
	Edad avanzada
	Sexo masculino
Factores de riesgo no	Etnia asiática
modificables	AAC
	Microsangrados cerebrales
	Enfermedad renal crónica

#### Tabla 1. Factores de riesgo para presentar una HIP

(Modificado de An et al., 2017).

Por otra parte, la AAC es también una causa relevante de HIP (Tabla 2). En este caso, el depósito de  $\beta$ -amiloide en la pared de capilares, arteriolas, y vasos de mediano y pequeño calibre en corteza, leptomeninges y cerebelo (Rosand *et al.*, 2000) es el responsable del debilitamiento y aumento de riesgo de ruptura arterial

(Figura 3). A pesar de no existir una herramienta diagnóstica confirmatoria, se puede realizar un diagnóstico probable, siguiendo los criterios de Boston modificados, en aquellos pacientes mayores de 55 años, sin otra causa identificable de hemorragia, con múltiples focos de sangrado restringidos a regiones lobares, corticales o córtico-subcorticales, o con un solo foco de sangrado con siderosis superficial cortical añadida (Greenberg *et al.*, 2018). Por otra parte, la presencia de HSA y uno de los siguientes factores: APOEE4, proyecciones en forma de dedo (elongaciones que nacen del hematoma, con mayor longitud que anchura), supone valores predictivos positivos del 96% para AAC, mientras que la ausencia de los tres factores supone valores predictivos negativos del 100% (Rodrigues *et al.*, 2018).



*Figura 3. Representación esquemática del espectro de las manifestaciones hemorrágicas e isquémicas de la AAC esporádica* (Modificada de Charidimou *et al.*, 2017).

## Tabla 2. Comparación entre las características de la HIP por AAC y por

arteriopatía hipertensiva (Modificado de Charidimou et al., 2017).

Características	AAC	Microangiopatía no-amiloide esporádica (arteriopatía hipertensiva)	
Patología de pequeño vaso	Depósito de β-amiloide y vasculopatía asociada en vasos corticales y leptomeníngeos	Amplio rango de posibilidades, por ejemplo, arterioloesclerosis, necrosis fibrinoide, daño mural, etc.	
Factores de riesgo	Edad, APOEe4 y e2	Edad, HTA, diabetes, hábito tabáquico	
HIP	Lobar (cortico-subcortical), posiblemente cerebelosa. Se asocia con un riesgo de recurrencia del 7-12% al año.	Profunda: ganglios de la base, tálamo, puente, cerebelo; y en algunas ocasiones lobar.	
lctus isquémico	No se asocia con infartos lacunares. Posible rol en cuanto a decisiones de manejo (fármacos antiagregantes, trombolisis intravenosa, etc.)	Infartos lacunares	
Otros síndromes clínicos	Episodios transitorios neurológicos focales (' <i>amyloid</i> <i>spells'</i> ), deterioro cognitivo y demencia.	Deterioro cognitivo vascular y demencia.	
RM (Resonancia magnética)	HIP lobares, siderosis cortical, espacios de Virchow-Robin en centros semiovales, leucoaraiosis de predominio posterior.	HIP profundas, con o sin presencia lobar, espacios de Virchow-Robin en ganglios basales, leucoaraiosis sin una localización en especial, infartos lacunares en ganglios de la base o en sustancia blanca profunda.	
Diagnóstico	Criterios de Boston, basados en la presencia de múltiples HIP estrictamente lobares, macrosangrados y siderosis cortical.	No existen criterios. El diagnóstico se realiza al no cumplir los criterios de Boston para la AAC, y según los marcadores en RM de enfermedad de pequeño vaso.	
Implicaciones terapéuticas	El objetivo principal es la prevención de una nueva HIP, por medio del manejo de la tensión arterial, y evitando antiagregantes a no ser que exista una indicación clara. Rehabilitación cognitiva en casos de deterioro cognitivo o demencia.	Control de los factores de riesgo vascular. Rehabilitación cognitiva en caso de deterioro cognitivo vascular o demencia. El uso de antiagregantes es menos preocupante que en el caso de AAC.	

Sea cual sea la causa de la hemorragia, en las primeras horas tras su aparición la lesión cerebral primaria ocurre principalmente como consecuencia de la

compresión y destrucción del tejido circundante a causa del rápido acúmulo de sangre y la formación del hematoma (Aronowski *et al.*, 2011). Posteriormente, el hematoma podría aumentar la presión intracraneal, hasta el punto de producir una herniación cerebral (Zheng *et al.*, 2016).

La agregación familiar en el caso de la HIP apoya la hipótesis de que exista una importante contribución genética que condicione el riesgo de hemorragia. Woo *et al* demostraron que tener un familiar de primer grado con HIP aumentaba el riesgo de presentar HIP, hasta 6 veces más respecto a no tenerlo (Woo *et al.*, 2002). De hecho, se estima que existe un componente hereditario en el 44% de los casos (Devan *et al.*, 2013). Además, se asume que las variantes genéticas podrían tener una influencia significativa respecto al pronóstico funcional de las HIP (Rodríguez *et al.*, 2017). Mediante estudios GWAS (estudios de asociación de genoma completo), se ha identificado que las variantes de APOE rs7412 y rs429358, la variante de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina) rs7311, y la variante del gen del colágeno tipo IV alfa 2 (COL4A2) rs9588151 también podrían condicionarel pronóstico funcional de los pacientes con HIP (Hostettler *et al.*, 2019).

#### 1.2. Pronóstico e impacto sociosanitario

La HIP primaria, también denominada ictus hemorrágico, es el tipo de ictus más grave (Ann *et al.*, 2017). Con una incidencia de 24,6 casos por 100,000 habitantes y año (Andrews *et al.*, 2012) constituye el 10-15% de todos los ictus en la población occidental (Hostettler *et al.*, 2019), porcentaje algo mayor en población asiática (Hong *et al.*, 2013; Toyoda *et al.*, 2013), pero con una mortalidad y tasa de discapacidad secundaria desproporcionadamente altas con respecto a los ictus isquémicos.

Se trata también del tipo de ictus para el que se disponen menos medios terapéuticos en el momento actual (Cordonier *et al.*, 2018), lo que condiciona la

ausencia de mejora de las perspectivas pronósticas en las últimas décadas (Roger *et al.*, 2011). Cierto es que se ha constatado una mejor evolución en aquellos pacientes que pueden beneficiarse del ingreso en unidades de ictus multidisciplinares o en unidades de medicina intensiva especializadas en pacientes neurocríticos (Langhorne *et al.*, 2013), probablemente a causa de una vigilancia más estrecha, pronta al tratamiento de las eventuales complicaciones.

Como acabamos de mencionar, la HIP provoca un gran impacto de discapacidad en los afectados, así como una gran mortalidad (Wang *et al.*, 2016), falleciendo un tercio de los afectados en el primer mes tras el evento, y el 50% al año del evento (Poon *et al.*, 2014; Babu *et al.*, 2012). Todo ello también supone un importante efecto social y económico, resultando en una significativa pérdida de años de vida productiva (Cordonier *et al.*, 2018).

En el momento agudo, los principales factores de mal pronóstico que se han identificado son el tamaño del hematoma, la expansión del hematoma, la edad, el bajo nivel de conciencia, la extensión intraventricular de la hemorragia, y la localización infratentorial (Broderick *et al.*, 1993).

Existe un *score (Tabla 3)* que tiene en cuenta estos factores, desarrollado para valorar el pronóstico de la HIP según la mortalidad a los 30 días dependiendo de las puntuaciones.

*Tabla 3. Determinación del Score de HIP* (Modificado de Hemphill *et al.*, 2001).

Componente	Valor	Puntos
Escala de coma de Glasgow	3-4	2
	5-12	1
	13-15	0
Volumen de HIP (cc)	≥ 30	1
según el método ABC/2	< 30	0
Hemorragia	Sí	1
intraventricular	No	2
Edad (años)	≥ 80	1
	< 80	0
SCORE TOTAL		0-6

Como se observa en la Figura 4, en el estudio que dio lugar al *score*, ningún paciente con *score* 0 falleció, y todos con *score* 5 lo hicieron. Ningún paciente de la cohorte presentó un *score* 6 (puntuación máxima posible), aunque se asume que la mortalidad para esta puntuación también sea del 100%, como en el caso del *score* 5 (Hemphill *et al.*, 2001).



Figura 4. Score para HIP y mortalidad a los 30 días. Se puede observar cómo la mortalidad aumenta según aumenta la puntuación del Score. (Modificado de Hemphill et al., 2001).

Por último, a nivel pronóstico, cabe mencionar la escala de Rankin modificada (mRs), ampliamente utilizada a nivel clínico como referencia del estado funcional del paciente, así como de la evolución del mismo tras el evento (al alta, a los 3

meses, al año, etc.) (Sreekrishnan *et al.*, 2017). La mRS es una escala del 0 al 6, donde 0 no representa síntomas ni discapacidad y 6 representa fallecimiento (Tabla 4).

#### 1.3. Presentación clínica y manejo

Los ictus hemorrágicos son difíciles de diferenciar de los ictus isquémicos agudos en el momento agudo. Sin embargo, ciertos aspectos clínicos pueden sugerir el diagnóstico de HIP, como son la presencia de síntomas y signos neurológicos rápidamente progresivos (en minutos u horas), así como síntomas sugerentes de aumento de la presión intracraneal (cefalea, náuseas y vómitos, taquicardia o bradicardia, e HTA), crisis epilépticas por irritación del parénquima cortical cerebral, o una disminución del nivel de conciencia (asociado a la compresión, directa o secundariamente a hipertensión intracraneal, de tálamo y tronco del encéfalo) en franca desproporción respecto a los síntomas focales neurológicos. Además, puede existir rigidez de nuca, que sugeriría la presencia de meningitis química en el caso de que existiera un componente de hemorragia intraventricular por extravasación subsecuente (Gross *et al.*, 2019).

La presencia de cefalea es más frecuente en el caso de grandes hematomas, probablemente debido a la tracción sobre las meninges, por la hipertensión intracraneal o por la presencia de sangre en líquido cefalorraquídeo. Por el contrario, los hematomas de pequeño tamaño rara vez se correlacionan con la presencia de cefalea (An *et al.,* 2017). La presencia de estupor o coma sugiere una HIP de gran tamaño con afectación del sistema reticular ascendente (Steiner *et al.,* 2006).

Es importante tener en cuenta que el tamaño del hematoma es dinámico las primeras horas tras el evento, creciendo dicho volumen en un tercio de los pacientes durante las 3-6 primeras horas tras la aparición de los síntomas (Davis *et al.*, 2006). En este contexto, existe un marcador denominado *spot sign*, que

predice la expansión del hematoma, así como un peor pronóstico. Este signo es visualizable mediante angio-TAC (angiografía por tomografía axial computerizada) cerebral (Figura 5). Se define como la extravasación de contraste en el seno del hematoma (Demchuck *et al.*, 2012). Existen también otros signos que predicen la expansión del hematoma, como el *blend sign*, en el cual aparece un área hipointensa bien delimitada en el margen de un área más hiperintensa, como si existiera un pliegue en el hematoma (Li *et al.*, 2015), o el signo del agujero negro, que aparece como un área encapsulada hipointensa en el seno de una zona mayor hiperintensa (Li *et al.*, 2016). La presencia de estos signos puede implicar un sangrado en diferentes tiempos.



*Figura 5. Diferentes casos de HIP con spot sign en el angio-TAC.* Spot sign marcado con punta de flecha blanca en cada caso. (Modificado de Browers et al., 2012).

Aunque el mecanismo exacto de la expansión del hematoma está poco claro, podría atribuirse al sangrado o re-sangrado a partir de la ruptura inicial de los vasos sanguíneos, así como por un nuevo posible foco de sangrado en la periferia de la lesión, secundariamente a la isquemia provocada por el primer hematoma, pobre flujo venoso o coagulopatía local (secundaria a la liberación de productos de degradación de la fibrina o plasmina) (Mayer, 2003).

Otro aspecto importante para la evolución clínica del proceso, aunque algo más tardío que el anterior, es la aparición del edema perilesional, resolviéndose tras varias semanas desde la aparición de la hemorragia (Wu *et al.,* 2017).

La historia médica debería incluir la hora de comienzo de los síntomas, la presencia de progresión clínica del cuadro, los factores de riesgo del paciente para HIP, así como los antecedentes recientes neuroquirúrgicos o de traumatismo craneoencefálicos. Realizar una aproximación localizadora, a partir de los hallazgos clínicos a pie de cama es importante, con el objetivo de detectar, de una manera precoz, aquellas HIP donde sería más probable el requerimiento de evacuación neuroquirúrgica del hematoma, como es el caso de la HIP de localización cerebelosa (Thabet *et al.*, 2017).

El manejo habitual de los pacientes con hemorragias intracerebrales exige el control hemodinámico. En este sentido, y a pesar del actual debate generado al respecto, las guías de práctica clínica (Steiner *et al.*, 2014; Hemphill *et al.*, 2015) recomiendan un control estricto de la tensión arterial sistólica menor de 140 mmHg (Chamebergo-Michilot *et al.*, 2021; Cusack *et al.*, 2018). Y si bien uno de los ensayos clínicos (ATACH 2) mostró un aumento de los eventos renales (Qureshi *et al.*, 2016), no se especificaba el tipo de evento, no pudiéndose valorar si existía o no una relevancia clínica. Se postula que la tendencia al alza de la tensión arterial podría estar en relación con el aumento de la presión intracraneal, contribuyendo a la generación del edema perilesional; así como con una mayor

propensión al sangrado, propiciando la expansión del hematoma (Andrews *et al.*, 2012).

Además, será preciso revertir el efecto anticoagulante de los fármacos cuando sea posible. Vitamina K, en caso de uso de Warfarina y acenocumarol (Frontera *et al.*, 2016), con el inconveniente de su lento mecanismo de acción que normalizaría los valores de INR sobre las 24 horas tras su administración (Hung *et al.*; 2000); idarucizumab en caso de uso de dabigatrán (Veltkamp *et al.*, 2017) y, aunque no existen estudios específicos al respecto, también parece adecuado el uso de protamina en caso de uso de heparina no fraccionada (Frontera *et al.*, 2016). Sin existir evidencia totalmente concluyente, también se puede administrar concentrado del complejo de protrombina y factores de coagulación II, VII, IX y X (Veltkamp *et al.*, 2017) ante el uso tanto de anticoagulantes de acción directa como inhibidores de la vitamina K.

Por otra parte, como ya se ha mencionado anteriormente, existe la posibilidad de realizar una intervención quirúrgica. La craniectomía para drenar el hematoma en situaciones críticas para el paciente supondría una medida que podría salvarle la vida. Sin embargo, los ensayos STICH (Mendelow *et al.*, 2005) y STICH II (Mendelow *et al.*, 2013) no han mostrado un beneficio clínico de la evacuación quirúrgica sistemática de forma temprana del hematoma intraparenquimatoso en pacientes con hemorragia espontánea supratentorial, al compararse con el mejor manejo médico. El rol de la craniectomía abierta, en este sentido, sigue siendo, no obstante, un tema de debate. Los beneficios teóricos de la intervención se relacionarían con la prevención de la herniación cerebral, el control de la hipertensión intracraneal, y también por evitarse, o al menos reducirse, el impacto neurotóxico de la sangre extravasada en torno al tejido sano limítrofe (de Oliverira *et al.*, 2020).

## 2. BASES MOLECULARES DE LAS HEMORRAGIAS INTRAPARENQUIMATOSAS

El daño fisiopatológico que acontece tras un ictus hemorrágico se desencadena por la lisis de los eritrocitos, la liberación de hemoglobina, grupos hemo y hierro, y la activación de la cascada de la coagulación, lo que altera de manera irreversible los componentes de la unidad neurovascular, provocando la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) y edema cerebral (Keep *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2016). Tanto el edema, como el ambiente inflamatorio secundario a la liberación de productos sanguíneos, afectará a la supervivencia celular en el área perihematoma.

Durante la HIP, la muerte celular programada (apoptosis, autofagia, necroptosis, piroptosis y ferroptosis) ocurre de un modo activo y está regulada por genes cuya diferente expresión o activación podría determinar, entre otros factores, un pronóstico diferencial entre pacientes de ictus (Ouyang *et al.*, 2012; Nagata, 2015; Rodríguez *et al.*, 2017).

#### 2.1. Edema perilesional

Las causas que explican la formación del edema perilesional son multifactoriales, incluyendo la alteración de la BHE por medio de transcitosis o por la desestructuración de las uniones estrechas (Jiang et al., 2017), la liberación de factores vasogénicos, ciertos neurotransmisores, la disfunción mitocondrial, la despolarización de la membrana (Graham et al., 2000; Lusardi et al., 2004; Qureshi et al., 2003), la lisis de glóbulos rojos, el reclutamiento de leucocitos, y la liberación al plasma de proteínas, trombina, hemoglobina, hierro, metaloproteinasas de la matriz (MMP) o interleuquinas, así como otros mediadores inflamatorios (Ziai et al., 2013). La presencia de grupos hemo, el hierro y la trombina en el parénguima cerebral desencadenan cascadas tóxicas e inflamatorias, así como un daño cerebral secundario (Madangarli et al., 2019).

El proceso de formación del edema podría dividirse en tres fases (Ziai *et al.*, 2013) (Figura 6):

1. Fase temprana (1 hora tras el evento inicial). La retracción del hematoma daría lugar a un edema vasogénico al inducir la entrada de suero en el espacio perihematoma.

2. Fase intermedia (máxima amplitud a día 1-2 tras el evento inicial). La cascada inflamatoria y la activación de la trombina darían lugar a un edema cerebral citotóxico.

3. Fase tardía (a partir del día 3). La lisis eritrocitaria y la lesión originada por la toxicidad de la hemoglobina contribuirían a la formación de edema.

En realidad, no se trata de compartimentos estancos, sino que los procesos interaccionan entre sí, de modo que el estrés oxidativo inducido por el edema vasogénico y la liberación de sustancias citotóxicas pueden ser responsables de la inducción de un edema citotóxico (Wang *et al.,* 2014).

En cuanto al edema intrahematoma, es causado principalmente por la tensión del hematoma, la cual está relacionada con la formación de un tejido de granulación capsular durante la absorción del hematoma. Este tejido puede limitar la absorción del hematoma licuado y de las sustancias citotóxicas. De este modo, la presión oncótica dentro del hematoma aumenta y la presencia subsiguiente de agua y plasma dentro del hematoma aumenta aún más la presión intrahematoma, formándose un círculo vicioso. Además, este tejido de granulación es rico en capilares, lo que permite la extravasación de sangre hacia el hematoma, aumentando su volumen (Chen *et al.*, 2014).



*Figura 6. Mecanismo de formación del edema vasogénico perihematoma.* (*Modificado de Zheng et al., 2015*).

Por todo ello, el edema cerebral se asociará significativamente con el aumento del tamaño de la HIP (Xi *et al.*, 2006). El efecto masa que provoca la hemorragia contribuirá a la formación del hematoma perilesional (Hoff *et al.*, 2003), aunque éste también puede provocar por sí mismo un importante efecto masa (Qureshi *et al.*, 2003).

#### 2.2. Barrera hematoencefálica

Existen diversos procesos que pueden afectar a la BHE y, en consecuencia, aumentar su permeabilidad y la infiltración de leucocitos al parénquima cerebral. Esto sucede mediante la alteración de las *tight junctions* o uniones estrechas y/o la transcitosis a través del endotelio cerebral. A su vez, los fenómenos inflamatorios también podrían alterar la función de la BHE a través de MMP-9 (Xi et al., 2006; Moxon-Emre et al., 2011).

Recientemente, se ha descrito que la ruptura de la BHE puede ser causa, además de una consecuencia, del daño por isquemia/reperfusión en el parénquima cerebral (Shi et al., 2016). Este proceso estaría mediado por la polimerización persistente de la actina y el desensamblaje de las proteínas de unión en las células endoteliales. Tras una situación de estrés, como puede ser la isquemia, la liberación de radicales libres o el aumento de citoquinas, la actina que normalmente está presente en las células como un monómero globular (G-actina) o como un polímero filamentoso (F-actina), se polimeriza en fibras de tensión lineales a lo largo de la célula endotelial. La polimerización de esta proteína va acompañada de la contracción de la actomiosina y del aumento de la tensión del citoesqueleto, lo que da lugar a una morfología celular contraída, a un deterioro del sellado de las uniones y, finalmente, a la apertura de la BHE (Keep *et al.*, 2018).

Ambos tipos de ictus, isquémico y hemorrágico, pueden provocar una alteración en la BHE. Sin embargo, este hecho ha sido poco estudiado hasta el momento en HIP (Jiang *et al.*, 2017). En modelos animales de HIP se ha visto que la hemoglobina, así como los productos de degradación, pueden inducir la disfunción de la BHE (Yang et al., 2013). Estos cambios en la permeabilidad de la BHE suelen ser evidentes a partir de las 24 horas tras la HIP y se correlacionan con una aparición más tardía del edema perihematoma a día 3 (Rodríguez-Yáñez *et al.*, 2009). Además de producir radicales libres, la liberación de hierro tras la HIP afecta a la expresión de aquoporinas. En concreto, en modelos animales, se produce una regulación al alza de aquoporina-4, alcanzándose un valor máximo entre los 3 y 7 días tras el evento (Qing *et al.*, 2009). Este factor también contribuirá de manera importante a la apertura de la BHE y la formación de edema perihematoma.

#### 2.3. Cascada de la coagulación

La cascada de coagulación, y en concreto la trombina, va a participar en el daño ocasionado por la hemorragia cerebral. Así, la liberación de trombina es responsable de la infiltración de células inflamatorias en el parénquima cerebral, de la proliferación de células mesenquimales, de la formación de edema cerebral y de gliosis (Xi *et al.,* 2003). La trombina se une a los receptores activados por proteasa (PAR-1) y activa la microglía del sistema nervioso central (SNC). Se libera óxido nítrico, factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, interleuquina-12, interleuquina-6, y se activa la cascada del complemento (Babu *et al.,* 2012). Como resultado, se produce un estado proinflamatorio que contribuye a la apoptosis y necrosis del tejido. Además, este estado de neuroinflamación, podría inducir a su vez la disrupción de la BHE, afectar al flujo sanguíneo cerebral y producir isquemia cerebral (Yang *et al.,* 2017).

Es sabido que la trombina aumenta la permeabilidad endotelial en los vasos sanguíneos a nivel sistémico. La trombina ejerce su efecto en el citoesqueleto celular y en los desmosomas por medio de PAR-1. En este sentido, tanto la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK), como el Ca<sup>2+</sup>, juegan un papel fundamental (Vandenbroucke *et al.*, 2008). A nivel cerebral, las células endoteliales y la activación de PAR-1 aumentarán la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular; y la trombina activará a ROCK, disminuyendo al mismo tiempo los niveles de la expresión de ZO-1 y ocludina, proteínas que forman parte de la *zonula occludens* (Luissint *et al.*, 2012; González-Mariscal *et al.*, 2007)

Además de la trombina, la liberación de fibrinógeno tras la HIP también induce una respuesta neuroinflamatoria (Grammas *et al.*, 2014; Hua *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2015), dando lugar a la activación de la microglía y la producción de una gran variedad de mediadores inflamatorios, como ya se ha comentado.

#### 2.4. Hemólisis

La lisis de los hematíes, que ocurre en las primeras 24 horas tras la HIP, induce la liberación de hemoglobina y grupos hemo que serán captados por la microglía y las neuronas (Ziai *et al.*, 2013). Los grupos hemo pueden ser degradados en biliverdina, monóxido de carbono y hierro. La biliverdina se convierte en bilirrubina y, junto con el hierro ferroso, contribuye al aumento del estrés oxidativo, el edema, la infiltración de neutrófilos y la muerte neuronal (Ziai *et al.*, 2013). El influjo de los grupos hemo en las neuronas tras el daño endotelial, también da lugar a la liberación de hierro y a la perpetuación del insulto neuronal (Keep *et* al., 2012; Qureshi *et al.*, 2009; Qureshi *et al.*, 2001).

Tanto los grupos hemo como el hierro son causa importante de la formación del edema cerebral tras las primeras 24 horas, ya que aumentan la permeabilidad de la BHE (Bhasin *et al.*, 2002). Como resultado tiene lugar la lisis celular y una mayor disrupción de la BHE (Shi *et al.*, 2012). El depósito de hierro intracerebral incrementa la expresión de aquiporina-4, lo que contribuye a la mayor permeabilidad de la BHE (Qing *et al.*, 2009), como se ha mencionado en el apartado anterior.

Los grupos hemo pueden promover la activación de la microglía por medio de los receptores tipo toll (TLR)-4, y estos a su vez inducir la activación del factor nuclear kappa-B (NF-kB), incrementándose finalmente la expresión de citoquinas y de lesión inflamatoria en el seno de la HIP (Lin *et al.*, 2012).

El hierro cerebral se deposita en la región perihematoma durante el primer día tras la hemorragia, permaneciendo niveles altos hasta al menos dos semanas después del evento (Zheng *et al.*, 2016).

#### 2.5. Neuroinflamación

La respuesta inflamatoria tiene lugar dentro y alrededor del hematoma, mediante la infiltración de neutrófilos y macrófagos, y la activación de la microglía (Gong *et al.*, 2000). Ambos procesos liberan compuestos citotóxicos que median en la lesión secundaria (Figura 7).

En un primer momento, los linfocitos T CD4+ son la principal causa de la infiltración leucocitaria, pero en aproximadamente 12 horas tras el inicio de la hemorragia, los macrófagos y las células dendríticas comprenden la mayor parte de los leucocitos infiltrantes (Hammond *et al.*, 2012).

Los polimorfonucleares serían los primeros leucocitos en infiltrar el SNC tras 4-5 h de la hemorragia (Nguyen *et al.*, 2007). Los polimorfonucleares podrían ser una causa directa de neurotoxicidad, al liberar metaloproteasas de la matriz, especies reactivas de oxígeno (ROS), y TNF-alfa, así como otras citoquinas.

Los leucocitos dejan de estar presentes a los dos días tras la lesión hemorrágica, pero pueden causar daños adicionales, al estimular a la microglía y los macrófagos (Ziai *et al.*, 2013). La activación de la microglía, a su vez, también podría estar mediada por el CD36 de los eritrocitos (Zhao *et al.*, 2007), la trombina (van Rossum *et al.*, 2004) y la vía hemo de los TLR-4 (Lin *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2015).

La microglía activada aparece en el tejido lesionado y en la zona perilesión tan solo una hora tras el debut de la hemorragia (Wang *et al.*, 2007). El objetivo será realizar una función de limpieza en el hematoma, pero su activación excesiva dará lugar a la liberación de numerosos factores tóxicos, que incluyen interleuquina-1β, proteasas, especies reactivas de oxígeno, prostaglandinas y otras enzimas como ciclooxigenasa-II y hemo oxigenasa, que contribuyen a la generación de la lesión secundaria (van Rossum *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2013). Por otra parte, la

activación de TLR-4, que se expresa en la microglía de 6 horas a 7 días tras la aparición de la HIP (Teng *et al.*, 2009), puede mediar la activación de estas células y la autofagia microglial (Yang *et al.*, 2015). También induce la disociación de NF-kB, activando la transcripción de genes relacionados con la inflamación (Zheng *et al.*, 2016).



*Figura 7. Mecanismos de la lesión cerebral primaria y secundaria tras una HIP* (Modificado de Mracsko et al., 2012).

Es importante, no obstante, tener en cuenta la simultaneidad de todos los procesos citados anteriormente de manera individualizada, potenciándose unos a otros, y produciéndose así la perpetuación del daño (Figura 7).

#### 2.6. Muerte celular

Son muchos los factores que desencadenan las vías fisiopatológicas post-HIP que dan lugar a la muerte cerebral programada (Figura 8) en las regiones perihematoma, así como en regiones cerebrales más alejadas del mismo. La pérdida neuronal será responsable de un porcentaje significativo de mortalidad y morbilidad tras una HIP (Bobinger et al., 2018).


Figura 8. Presentación esquemática de las vías más importantes que dan lugar a la muerte celular programada. ROS: Especies reactivas de oxígeno. NLRP3: NLR (receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótido) dominio contenedor de pirina 3. (Modificado de Bobinger et al., 2018).

# 2.6.1. Necrosis

La necrosis suele producirse de manera no espontanea, como resultado de un traumatismo o un sangrado (Wang *et al.*, 2014). La muerte celular por necrosis se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana celular y la liberación incontrolada de componentes celulares al espacio extracelular. Esta liberación inicia una respuesta inflamatoria secundaria para eliminar las células muertas y sus productos por fagocitosis. La ocurrencia de muerte celular tras las HIP está bien documentada, demostrándose en varios estudios la presencia de células necróticas en modelos animales de HIC (Qureshi *et al.*, 2013), de predominio en el córtex ipsilateral al evento, pero también presentes en el contralateral (Qureshi *et al.*, 2001).

Se entiende que uno de los factores más relevantes como causa de la necrosis tras una HIP es la presión mecánica ejercida sobre el tejido sano (Nakashima *et al.*, 1999). De hecho, al realizarse la evacuación del hematoma, tanto en modelos animales como en estudios retrospectivos de pacientes, se objetiva una menor cantidad de células necróticas a mayor precocidad de la evacuación (Qureshi *et al.*, 2013).

#### 2.6.2. Apoptosis

Las características más distintivas de la apoptosis incluyen la contracción celular y el abombamiento de la membrana, sin cambios en los orgánulos. En las células apoptóticas la cromatina se condensa, para la posterior formación núcleos picnóticos con fragmentos de ADN (ácido desoxirribonucleico) anclado. El contenido celular se empaqueta en los llamados cuerpos apoptóticos, que serán rápidamente fagocitados por las células vecinas, macrófagos y células parenquimales principalmente (Bobinger *et al.,* 2018).

Existen dos vías fundamentales que dan lugar a la apoptosis:

1. Extrínseca: esta vía requerirá de receptores de superficie celular. Al unirse con sus ligandos, los receptores activarían la caspasa-8, desencadenándose toda la cascada (Sayers *et al.*, 2011).

2. Intríseca: esta otra vía se iniciará por medio de la permeabilización de la capa externa de la membrana mitocondrial y Bax, un miembro clave de la familia de las células B linfoma 2 (Bcl-2). Bax promoverá la apoptosis al transferirse del citosol a la cara externa de la membrana de la mitocondria. El aumento de la proporción Bax/Bcl-2 facilitará la apoptosis (Godoy *et al.*, 2014).

La caspasa-3 es un mediador clave en la apoptosis neuronal (Rodríguez *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2018) y puede ser activado por cualquiera de las dos vías.

Curiosamente, los mismos estímulos (glutamato, trombina, especies reactivas de oxígeno) responsables de la inducción de necrosis también se consideran inductores de apoptosis (Castillo *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Bao *et al.*, 2016). Por ello, es posible que, tras un estímulo inicial, se dé una mezcla de células necróticas y apoptoicas en el parénquima cerebral tras la HIP (Felberg *et al.*, 2002).

#### 2.6.3. Piroptosis

La piroptosis es otro tipo de muerte celular programada. Se inicia por medio de los receptores con dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NLRs). Los NLRs reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y sus funciones son similares a la de los TLRs, otro grupo de receptores también capaz de reconocer PAMPs. Sin embargo, la principal diferencia entre los NLRs y los TLRs es su localización citosólica o nuclear, respectivamente (Kopitar-Jerala, 2015).

Al unirse con el ligando, NLR inicia un ensamblaje de un complejo multiproteico basado en NLR, el inflamasoma, el cual se considera como una estructura de respuesta celular a la infección o al daño celular (Schroder *et al.*, 2010).

A diferencia de la apoptosis, la piroptosis no parece ser inmunológicamente silente, sino más bien altamente inflamatoria. Tiene un papel en la formación del poro y en la tumefacción celular. La piroptosis se caracteriza además por la pérdida rápida de la integridad de membrana, resultando en la lisis celular, así como en la liberación de numerosos elementos proinflamatorios de la célula, lo que produce una mayor inflamación (Fink *et al.*, 2006).

El inflamasoma mejor caracterizado es el NLRP3, formado por la proteína NLRP3, la proteína adaptadora ASC y una procaspasa-1. El NLRP3 se expresa en primer lugar en la microglía, y es probablemente responsable de su activación (Liang *et* 

*al.*, 2015; Pan *et al.*, 2014). La formación del inflamasoma da lugar al reclutamiento y activación de la caspasa-1. La activación de la caspasa-1, por su parte, inicia el anclaje y activación de la interleuquina-1 beta e interleuquina-18 (Bobinger et al., 2018). Se sabe que el inflamasoma participa en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas, ateroesclerosis, isquemia, y lesiones cerebrales por reperfusión tras la isquemia (Johann *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016; Minutoli *et al.*, 2016; Fann *et al.*, 2014).

Se ha investigado el mecanismo que da lugar a la formación de NLRP3 y a la consiguiente activación de caspasa-1. En esta línea se ha postulado que el receptor de P2X7, activado por la HIP, daría lugar a la producción de peroxinitrito, el cual iniciaría la formación del inflamasoma NLRP3 (Feng *et al.*, 2015). El receptor de P2X7, ampliamente conocido por su actividad citotóxica, es un canal mediado por ATP (adenosín trifosfato) que pertenece a la familia de los receptores ionotrópicos P2X. La evidencia actual sugiere que el receptor de P2X podría jugar un rol importante en diversas patologías del SNC, pues la deleción genética y el bloqueo del receptor P2X7 da lugar a resultados de neuroprotección en varios trastornos neurológicos, incluyendo la HIC y la hemorragia subaracnoidea (Zhao *et al,* 2018).

Otro estímulo que parece también inducir la formación del inflamasoma es la lisis eritrocitaria (Yang *et al.*, 2015). Así, la hemina, un derivado del grupo hemo de la hemoglobina, posee un rol importante en el desarrollo del daño cerebral inducido tras una HIP por múltiples causas que ya se han mencionado, y también debido a su capacidad para inducir la formación de NLRP3 (Lin *et al.*, 2012; Mohan *et al.*, 2013; Weng *et al.*, 2015).

### 2.6.4. Autofagia

La autofagia es un sistema intracelular responsable de la degradación y reciclaje de la mayoría de los componentes celulares. Durante este proceso, las células

secuestran y degradan parte de su propio citoplasma, incluyendo los orgánulos. La degradación de las proteínas celulares y el recambio de los orgánulos disfuncionales forma las vacuolas autofágicas (Amenta *et al.*, 1981; Glaumann *et al.*, 1981).

Esta forma de muerte celular es especialmente importante en células postmitóticas como las neuronas, que no se dividen tras su diferenciación. Así, la autofagia recicla los orgánulos dañados contribuyendo al mantenimiento de la integridad celular y controlando la liberación de ROS, protegiendo a las células del estrés oxidativo. Varias son las señalizaciones que inducen a la autofagia: estrés oxidativo, inflamación, acumulación de hierro libre; todos ellos, factores importantes de la fisiopatología post-HIP (Bobinger et al., 2018).

La autofagia se considera una vía de muerte celular independiente de las caspasas. En este caso, la inducción de la autofagia se produce mediante la catepsina D (Kanthasamy *et al.*, 2006; Todde *et al.*, 2009). En modelos de HIP se ha demostrado que este biomarcador aumenta (He *et al.*, 2008) como consecuencia del aumento de hierro ferroso en el cerebro de animales (Wu *et al.*, 2003), así como tras la infusión de trombina (Hu *et al*, 2011).

Hasta el momento no se ha definido si la autofagia sirve como mecanismo protector, ya que su inhibición fomenta la muerte celular por otras vías (Hu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015), o si, por el contrario, contribuye al proceso de muerte neuronal después del daño cerebral. No obstante, la autofagia y la apoptosis a menudo ocurren en las mismas células, si bien la autofagia casi siempre precede a la apoptosis (Maiuri *et al.*, 2007).

#### 2.6.5. Ferroptosis

La ferroptosis es otra forma de muerte celular programada causada por la peroxidación lipídica, que depende de la producción excesiva de ROS y de la

acumulación de hierro intracelular. Su mecanismo fisiológico no se ha determinado hasta el momento. Sin embargo, se ha visto su implicación en diferentes enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, así como en procesos de carcinogénesis o en ictus, isquémico o hemorrágico. También participa en el daño por isquemia-reperfusión, (Stockwell *et al.*, 2017).

Después de la HIC, el hierro liberado en la sangre puede producir un aumento de ROS, lo que conduce al estrés oxidativo en las células neuronales y a la lesión cerebral secundaria (Bai et al. 2020). La inhibición farmacológica de la ferroptosis es beneficiosa en modelos animales de HIC, lo que revela que los inhibidores de la ferroptosis podrían utilizarse como aproximación para el tratamiento de la HIC (Bartnikas et al., 2020)

Cuando se produce la ferroptosis, los cambios morfológicos de las mitocondrias son más evidentes y afectan al potencial de membrana (Song y Long, 2020). Esto está mediado y regulado por la peroxidación lipídica, los sistemas antioxidantes y el metabolismo del hierro. La ferroptosis resulta esencialmente de un desequilibrio entre la oxidación y los sistemas antioxidantes, siendo especialmente sensible a la biosíntesis de glutatión (GSH), fosfolípidos, NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y coenzima Q10 (Stockwell *et al.*, 2017).

# **3. CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS QUINASAS ROCK**

Las proteínas quinasas asociadas a Rho (ROCK) son un tipo de serina-treonina quinasas, dianas de las GTPasas Rho. Están implicadas en diversas actividades celulares, como la organización del citoesqueleto de actina, la adhesión y la motilidad celular, la proliferación y la apoptosis, la remodelación de la matriz extracelular y la contracción de las células musculares lisas (Hartmann *et al.*, 2015).

En mamíferos se han identificado dos homólogos, ROCK1 y ROCK2, los cuales comparten un 90% de la secuencia de aminoácidos en sus dominios quinasa, presentando también una estructura similar (Lai *et al.*, 2018) (Figura 9). Ambos tienen un dominio quinasa localizado en el extremo N-terminal, seguido de una región enrollada *coiled-coil* de unión a Rho (RBD). En el extremo C-terminal presentan un dominio de homología a pleckstrina (PH) que contiene un subdominio rico en cisteína (C1) (Figura 9). Este dominio PH-C1 juega un papel autoinhibitorio, ya que secuestra el dominio quinasa y reduce su actividad (Wen et al. 2008) (Figura 10)

Durante mucho tiempo se ha considerado que el papel de ROCK1 y ROCK2 era similar. Sin embargo, actualmente se sabe que no siempre tienen las mismas funciones. Además, dependiendo de su localización subcelular, de su activación y de otros factores ambientales, la señalización de ROCK puede afectar de manera diferencial a la célula.

La vía de señalización de ROCK está muy involucrada en múltiples mecanismos de daño cerebral. Aunque ROCK se expresa de manera ubicua en todos los tejidos, el subtipo ROCK2 se expresa mucho más abundantemente en el SNC, y aumenta aún más con la edad (Lu *et al.*, 2020). ROCK2 se distribuye predominantemente en las dendritas y en el pericarion de las neuronas del hipocampo, lóbulo frontal, y cerebelo, áreas manifiestamente elocuentes del

cerebro (González-Forero *et al.*, 2012). En cambio, ROCK1 se expresa de manera ubicua excepto en cerebro y músculo, donde su expresión es notablemente menor (Nakagawa *et al.*, 1996). En cerebro se observa inmunorreactividad de ROCK1 en la glía, mientras que ROCK2 se expresa mayoritariamente en neuronas. Estos resultados indican que las dos isoformas de ROCK se distribuyen de manera diferencial para cumplir funciones específicas (lizuka *et al.*, 2012).



*Figura 9. Estructura de ROCK1 y ROCK2 y modos de regulación*. ROCK1 *y* ROCK2 constan de un dominio ubicado en un terminal N y un dominio ubicado en un terminal C. El dominio PH contiene un dominio C1 rico en cisteína. La región entre el dominio de quinasa ROCK y el dominio PH forman una hélice superenrollada, en la que se ubica el dominio RBD (por sus siglas en inglés). Ambos comparten una alta homología y una identidad general del 64% en su secuencia de aminoácidos. La fosforilación de ROCK2 en Thr967, Ser1099, Ser1133 o Ser1374 aumenta el estado de activación, mientras que la fosforilación de Tyr722 disminuye la capacidad de ROCK2 para unirse a RhoA. (Modificado de Hartmann et al., 2015).

Además de estas diferentes localizaciones a nivel tisular, también existen diferencias en cuanto a la localización subcelular, probablemente debidas a la preferencia de unión de los dominios PH-C1 de ROCK1 y ROCK2 a los lípidos de membrana. Se ha observado una mayor afinidad del dominio PH-C1 de ROCK2

por el fosfatidilinositol(3, 4, 5)-trifosfato y el fosfatidilinositol(4, 5)-bifosfato (Yoneda *et al.*, 2005), lo que contribuye a una localización de ROCK2 a este nivel en el citosol y en el núcleo, en asociación con el centrosoma, y colocalización con los filamentos de actina y vimentina, así como en el disco intercalado y en el disco-Z de las células musculares estriadas (Leung *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 1996; Sin *et al.*, 1998; Katoh *et al.*, 2001; Kawabata *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006). ROCK1, sin embargo, ROCK1 tiene una distribución eminentemente citosólica. Se localiza en los filamentos de actina, en las membranas plasmáticas y en las vesículas cercanas de las membranas plasmáticas (lizuka *et al.*, 2012).

# 3.1 Activación y función de ROCK2 en el SNC

La activación de las quinasas ROCK depende de las pequeñas GTPasas de la familia Rho (Shimokawa et al., 2007). Las Rho GTPasas son una familia de proteínas clave en la transmisión de señales extracelulares hacia efectores intracelulares, tanto citoplasmáticos como nucleares (Figura 10).



*Figura 10. Activación de ROCK dependiente de Rho GTPasas.* Rho actúa como un interruptor molecular, pasando de un estado activo unido a GTP a un estado inactivo unido a GDP. El intercambio entre los estados activo e inactivo está regulado por varias proteínas: el factor de intercambio de guanina (GEF), el inhibidor de disociación de guanina (GDI) y la proteína activadora de GTPasa (GAP) (Modificado de Shimokawa et al., 2007).

En su estado nativo, ROCK se auto-inhibe por el dominio PH-C1 localizado en la región C-terminal (Wen et al., 2008). Sin embargo, cuando RhoA v/o RhoC se activan para unirse al dominio RBD (dominio de unión a Rho), o cuando la región auto-inhibidora se ancla y se elimina por la caspasa-3 o por Granzima-B, se produce la activación de ROCK (Sladojevic et al., 2017) (Figura 11). Al igual que otros miembros de la familia. ROCK1 y ROCK2 contienen una secuencia hidrofóbica en el extremo C-terminal que regula la activación de estas proteínas. El estado de fosforilación o desfosforilación de los residuos adecuados va sea por otras quinasas (Lowery et al., 2007) o mediante autofosforilación (Chuang et al., 2012: Chuang et al., 2013), determinará la activación o desactivación, respectivamente, de ROCK1 y ROCK2. Así, se demostró que la guinasa tipo Polo-1 (Plk-1) fosforila a ROCK2 en Thr-967, Ser-1099, Ser-1133, o Ser-1374, actuando junto con RhoA como activadores de ROCK2 (Lowery et al., 2007). Por el contrario, la fosforilación de Tyr-722 disminuye la capacidad de ROCK2 para unirse a RhoA (Lee et al., 2010), mientras que la desfosforilación aumenta la unión (Lee y Chang, 2008). Adicionalmente, se han descrito varios sitios de autofosforilación en ambas proteínas. Se ha sugerido que la autofosforilación de ROCK1 en Ser1333 y de ROCK2 en Ser1366 reflejan el estado de activación de estas quinasas (Chuang et al., 2012, 2013). Sin embargo, hasta el momento la activación de ROCK se monitoriza de forma indirecta a través de los cambios en la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) o en la subunidad reguladora de la miosina fosfatasa (MYPT1), también conocida como MBS o subunidad de unión a la miosina.



*Figura 11. Diferentes modos de activación de ROCK*. En el estado inactivado, el carboxi-terminal de ROCK actúa como una región auto-inhibidora. La unión de Rho-GTP al domino de unión a Rho (RBD), frena esta regulación negativa, y por lo tanto activa la quinasa. Las proteínas Rho también pueden activarse de un modo independiente de Rho, por eliminación de la región carboxi terminal de ROCK1 y ROCK2 mediante la unión con caspasa 3 o granzima B, respectivamente. Kinase domain: dominio quinasa. (Modificado de Julian et al., 2014).

ROCK2 interviene en numerosos procesos en cerebro, muchos de los cuales tienen lugar en células endoteliales, músculo liso vascular, neuronas y glía entre otros (Sladojevic *et al.*, 2017). En neuronas, una de las funciones específicas de la isoforma ROCK2 está relacionada con la estructura y plasticidad dendrítica (Bobo-Jiménez et al., 2017; Greathouse *et al.*, 2018). La vía RhoA/ROCK2 inhibe el crecimiento del cono axonal y modula la dinámica de la actina (Muller *et al.*, 2005), de modo que ROCK2 tiene un papel fundamental en la señalización inhibitoria del crecimiento axonal, así como en la supervivencia celular (Tan *et al.*, 2011). Este y otros procesos se relacionan con la fisiopatología de la lesión isquémica cerebral, por ello ROCK2 se considera como una posible diana farmacoterapéutica en el

contexto de ictus isquémico (Tönges *et al*, 2011; Sladojevic *et al.*, 2017), hemorragia subaracnoidea (Fujii *et al.*, 2012), daño medular (Wang *et al.*, 2018), traumatismo craneoencefálico grave (Mulherkar *et al.*, 2017), así como de varias afecciones neurodegenerativas (Gentry *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2019; Herskowitz *et al.*, 2013; Herskowitz *et al.* 2011). Hasta la fecha su papel en la hemorragia intraparenquimatosa ha sido muy poco estudiado.

## 3.1.1. Daño axonal y supervivencia neuronal

La activación de la vía Rho/ROCK contribuye en la modulación del desarrollo de los axones. Tras una lesión esta vía se suele activar (Taniguchi et al., 2009) para finalmente dar lugar a la retracción de las neuritas y al colapso del crecimiento del cono axonal (Gu et al. 2013). Recientemente, se ha demostrado que RhoA tiene un papel dual en neuronas y astrocitos después de una lesión en el SNC. En las neuronas, RhoA promueve la compactación de la actina inhibiendo la regeneración de los axones. En los astrocitos, sin embargo, RhoA limita la astrogliosis (Stern et al., 2021). Así, la supresión simultánea de RhoA en neuronas y astrocitos no promueve la regeneración de los axones tras una lesión del SNC, pero la supresión de RhoA específica para las neuronas sí lo hace. Estos resultados destacan la importancia de desarrollar estrategias específicas para cada tipo celular con el fin de promover la regeneración tras un daño en el SNC y sugieren un papel destacado de la ruta Rho/ROCK en este contexto. En neuronas, ROCK2 también altera la morfología de las espinas dendríticas (Swanger et al., 2016), controlando la integridad dendrítica y los procesos de memoria y aprendizaje (Bobo-Jiménez et al., 2017).

La activación de ROCK parece deletérea para la viabilidad celular (Piazzolla *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011). El empleo de animales knockdown para regular a la baja los niveles de ROCK2 permite objetivar los efectos de la inhibición de esta quinasa, como son la atenuación de la degeneración axonal, la promoción del crecimiento neurítico y también la inhibición de la apoptosis. Así, se ha observado

que la regulación a la baja de ROCK2 disminuye la actividad de la caspasa-3 y de la calpaína (Koch *et al.*, 2014).

### 3.1.2. Citoesqueleto y sinapsis

La activación de ROCK da lugar a la fosforilación de varios sustratos, entre los que se encuentra la cadena ligera de miosina (MLC) que es uno de los sustratos principales (Moreno-López *et al.* 2011). Dicha fosforilación se produce de manera directa o indirectamente mediante la fosforilación inhibitoria de la miosina fosfatasa (MLCP), cuya subunidad reguladora es la MYPT1 (Álvarez-Santos *et al.* 2020). Como consecuencia se produce la contracción de la actomiosina y la inhibición/retracción del crecimiento de las neuritas, perturbando la formación y el mantenimiento de las espinas dendríticas (Figura 12). Por medio de estas acciones sobre el citoesqueleto de las neuronas, ROCK puede regular la actividad eléctrica de los circuitos neuronales, así como la liberación de neurotransmisores (Lu *et al.*, 2020).



Figura 12. Representación esquemática de la regulación de la fosforilación de la MLC por ROCK y MLCK. (Modificado de Shimokawa *et al.*, 2007).

Por otra parte, ROCK también modula la interacción de miosina y actina, lo que previene la acción de la sinapsina, permitiéndose así la liberación de las vesículas sinápticas (Nelson *et al.*, 2013). Algunos estudios genéticos sugieren que ROCK1 y ROCK2 tienen funciones diferentes también a nivel del citoesqueleto, mostrando cómo ROCK1 desestabiliza la actina, mientras que ROCK2 la estabilizaría. De este modo, todo ello puede contribuir de manera diferente a la función sináptica (Shi *et al.*, 2013).

Por medio de la modulación de la sinaptogénesis, ROCK participa en los procesos de aprendizaje espacial, y en la consolidación de la memoria, así como en la potenciación de la memoria a largo plazo (Wang *et al.*, 2005).

#### 3.1.3. Sistema vascular

El sustrato mejor caracterizado de ROCK es la subunidad reguladora de la miosina fosfatasa (MYPT1), la cual contrarresta la acción de la miosina quinasa (MLCK) y, por tanto, disminuye la contracción de las células musculares lisas al desfosforilar MLC. Así, ROCK aumenta la fosforilación total de MLC dando lugar a la contracción de la actomiosina (Hartmann *et al.*, 2015). Además, ROCK fosforila la proteína de 17 kD inhibidora de proteína fosfatasa 1 (CPI17) (Koyama *et al.*, 2000), aumentando la potencia inhibidora de CPI17 unas 1.000 veces (Eto *et al.*, 2009). Se cree que la coordinación de la fosforilación de CPI17 por medio de diferentes quinasas es importante para regular la contracción de la célula muscular lisa. De este modo, ROCK podría jugar un papel importante en varias enfermedades de base vascular, por medio de una acción vasoconstrictora, como es en el caso documentado de la asociación entre diabetes mellitus tipo 2 en ratones y la hiperactividad contráctil a nivel de las arterias mesentéricas, causado por un aumento de la actividad de RhoA/ROCK y de la fosforilación de CPI17 (Xie *et al.*, 2006).

A pesar de lo expuesto anteriormente, en modelos murinos con haploinsuficiencia para ROCK1+/- y ROCK2+/-, no se ha detectado la presencia de HTA (Rikitake *et al.*, 2005; Noma *et al.*, 2008) en condiciones fisiológicas. En cambio, mediante el uso de inhibidores sí se ha demostrado la implicación de ROCK ante una lesión vascular. Por ejemplo, tras ligarse la arteria carótida común en ratones, se da un reclutamiento leucocitario, la formación de la neoíntima, y el estrechamiento de la luz del vaso. En ratones con haploinsuficiencia para ROCK2+/- se da este mismo proceso, mientras que en aquellos con hapoinsuficiencia para ROCK1+/-, la formación de la neoíntima es mucho menos prominente, así como el reclutamiento leucocitario y la expresión de moléculas de adhesión proinflamatorias (Schober *et al.*, 2005).

Por todo ello, se hipotetiza que la activación de ROCK1 y, sobre todo, ROCK2, juega un papel importante en la patología vascular, particularmente en relación con HTA, hipertensión pulmonar, ateroesclerosis, angina por vasoespasmo, ictus, isquemia cardiaca y daño por reperfusión (Hartmann *et al.*, 2015) (Figura 13).



*Figura 13. Papel de ROCK1 y ROCK2 en varios procesos patológicos vasculares. Modificado de Hartmann et al., 2015.* 

La rigidez arterial es, de hecho, un importante factor de riesgo para hipertensión arterial (Safar, 2018; Dumor *et al.*, 2018), que, como ya hemos visto anteriormente es en sí un factor de riesgo de gran relevancia para el desarrollo de eventos cerebrovasculares, entre los que destaca la HIP. La rigidez arterial se asocia con alteraciones microvasculares, con el aumento de la resistencia microvascular, un aumento de la leucoaraiosis, y también con atrofia del lóbulo temporal medial (Joly, 2017).

#### 3.1.4. Isquemia cerebral

ROCK modula la proliferación de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos modificando la permeabilidad endotelial, aumentando la MLCK y disminuyendo la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (Chen *et* al., 2013; Weiss *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). Todas estas acciones de ROCK tras la isquemia cerebral dan lugar a alteraciones subsecuentes aún más graves para el aporte sanguíneo.

Tras un ictus isquémico, se produce la activación de numerosos procesos regulados por ROCK en la unidad neurovascular (Sladojevic et al., 2017). Esto se correlaciona con una mayor disfunción cognitiva. Por ello, se postula que los inhibidores de ROCK2 podrían ser una diana terapéutica para la isquemia (Yan *et al.*, 2015). Existen evidencias que soportan el papel beneficioso de la inhibición de ROCK en la neuroprotección aguda, así como la prevención y recuperación de las alteraciones cerebrovasculares al modificar la inflamación, la función plaquetaria y endotelial, la contracción del músculo liso y la regeneración neuronal (Sladojevic et al., 2017).

# 3.2. Inhibición de ROCK

Previsiblemente la inhibición de las dos isoformas de ROCK provocará efectos diferentes en las células. Así, se ha constatado que mientras la inhibición de

ROCK1 desestabiliza el citoesqueleto de actina, la inhibición de ROCK2 lo estabiliza (Shi *et al.*, 2013).

Los inhibidores de ROCK, como el hidroxifasudil, han demostrado cierto beneficio para la prevención de la isquemia cerebral, la neuroprotección aguda o la recuperación a medio-largo plazo tras haber sufrido un ictus isquémico (Rikitake *et al.*, 2005). Con el inhibidor fasudil, también se observó un descenso en el reclutamiento leucocitario, y en la adhesión a las células endoteliales, mejorando la plasticidad cerebral tras la lesión cerebral isquémica, o por reperfusión (Wang *et al.*, 2012). Este fármaco, de hecho, es utilizado en Japón desde el año 1.995 (Saito *et al.*, 2015; Olson *et al.*, 2008) con la indicación de profilaxis del vasoespasmo ante la presencia de una hemorragia subaracnoidea. Sin embargo, su uso no se ha estandarizado mundialmente por el limitado número de ensayos clínicos aleatorizados que existen al respecto hasta la fecha (Daou *et al.*, 2019).

A pesar del aparente beneficio observado con estos inhibidores, ninguno de ellos es especialmente selectivo. Este hecho podría camuflar el verdadero efecto protector de la inhibición de una de las dos isoformas, ROCK1 o ROCK2. Motivo por el cual la industria farmacoterapéutica se encuentra en estos momentos desarrollando otras moléculas que inhiban de manera más selectiva alguna de ellas, lográndose resultados prolíficos. Entre los compuestos desarrollados, destacaremos algunos por el especial interés que puedan presentar en relación con el trabajo que nos ocupa.

El belumosudil (KD025 ó SLx-2119) es un inhibidor selectivo de ROCK2, que ha mostrado una reducción dosis-dependiente del tamaño de la lesión isquémica en ratones, así como una mejoría en el pronóstico. También ha demostrado ser más seguro que los anteriores (Lee *et al.,* 2014). En el momento actual hay estudios y ensayos clínicos en marcha con el objetivo de posicionarse como una probable terapia frente a isquemia cerebral (Lee *et al.,* 2014), hipertensión pulmonar

(Yamamura *et al.*, 2021), fibrosis renal (You *et al.*, 2020), psoriasis (Yiu y Warren, 2016), o enfermedad injerto contra huésped (Jagasia *et al.*, 2021), entre otras.

Otro inhibidor selectivo de ROCK2 es el SR-3677, basado en aminofurazanazabenzimidazoles. Al monitorizar el estado fosforilado de MLC tras la infusión del fármaco, se puede objetivar cómo se produce más del 90% de la inhibición de ROCK2 (Figura 14) (Feng *et al.*, 2008). Recientemente se han demostrado ciertos efectos neuroprotectores usando este inihibidor selectivo de ROCK2, al regularse al alza la vía de la mitofagia mediada por parkina (Moskal *et al.*, 2020).



Figura 14. Western blot que analiza la actividad de ROCK2 en tejido control y tras la perfusión con SR-3677. La banda observada de MLC fosforilada (p-MLC) en el control indicaría una mayor actividad de ROCK2 en comparación con la banda tenue observada en tejido perfundido con el inhibidor SR3677. Emplean la actina como control de carga (Feng et al., 2008)

# 4. POLIMORFISMOS DE INTERÉS EN EL GEN Rock2

La variación genética interindividual puede explicar por qué pacientes con HIP de similar tamaño y localización tienen diferente pronóstico funcional (Xi *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2017; Goméz-Sánchez et al., 2011). Se han descrito polimorfismos de un único nucleótido (SNP) en el DNA cromosómico que median los procesos de muerte y supervivencia neuronal, afectan a la respuesta del paciente a diferentes terapias y, por tanto, estarían implicados en la recuperación funcional tras un ictus (Almeida, 2013; Sánchez-Morán et al., 2020). Asimismo, se sabe que polimorfismos que afectan al entramado vascular influyen en el riesgo de patologías cardio- y cerebrovasculares (Mitchell et al., 2010). En

este contexto, el gen que codifica la proteína ROCK2 presenta numerosas variantes polimórficas que afectan a la expresión y actividad de la proteína y que, de alguna manera, modifican la distensibilidad arterial (Liao *et al.*, 2015). Esto podría ser de interés para las HIP a juzgar por los antecedentes introducidos en esta memoria. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce la posible asociación entre los SNPs de *Rock2* y el pronóstico de pacientes con HIP.

# 4.1. rs978906. Un polimorfismo que modula los niveles de ROCK2

El SNP *rs978906* (*A*>*G*) en la región 3'UTR del gen implica una sustitución de la base adenina presente en la variante ancestral por una guanina. Este cambio afecta a la síntesis proteica de ROCK2 e interfiere en su unión con miR-1183 (Yang *et al.,* 2018). Se ha relacionado con un mayor riesgo de ictus isquémico, así cómo con una mayor rigidez arterial (Yang *et al.,* 2018; Liao *et al.,* 2015).

#### 4.2. Thr431Asn. Un polimorfismo que afecta a la actividad de ROCK2

Los SNP r*s9808232* y *rs2230774*, considerados como dos entidades diferentes, han sido recientemente unificados como un único polimorfismo que denominaremos *Thr431Asn*. La sustitución de una citosina (A**C**T) por una adenina (A**A**T) da lugar a un cambio de aminoácido, de modo que el codón 431 del exón 10 que codifica una treonina (Thr) pasa a codificar una asparagina (Asn) (Figura 15). Estudios clínicos previos han demostrado la asociación entre una mayor rigidez arterial y una mayor actividad de ROCK2 (Liao *et al.*, 2015).



Figura 15. Localización del cambio de aminoácido producido por el polimorfismo rs9808232 (Thr431Asn) en la estructura primaria de ROCK2. El cambio Thr431Asn (flecha en rojo oscuro) sucede al inicio de la región coiled-coil, fundamental para la actividad de ROCK2 (Modificado de Hartmann et al., 2015).

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

# **HIPÓTESIS**

La reorganización cortical que se produce tras un ictus determina la recuperación funcional del paciente, por lo que la plasticidad sináptica es un proceso clave en la reparación del cerebro dañado. Por otro lado, la reparación vascular en el cerebro tras un daño hemorrágico va a determinar el alcance de la lesión y los fenómenos de recuperación que asegurarán un mejor pronóstico en pacientes con hemorragia intraparenquimatosa. La vía de señalización Rho-ROCK2 regula la morfología, elongación y retracción de neuritas, así como la rigidez vascular, lo que le convierte en una vía esencial en el proceso de reparación cerebral tras un ictus.

Por todo ello, pensamos que la implicación de la vía Rho/ROCK2 en la fisiopatología neurovascular podría ser de interés en el ictus hemorrágico. Los polimorfismos funcionales que modulan los niveles y la actividad de la quinasa ROCK2 podrían afectar al daño y la reparación cerebral, convirtiéndose en importantes biomarcadores genéticos del pronóstico funcional de pacientes con ictus hemorrágico. Así, hipotetizamos que la quinasa ROCK2 podría modular la recuperación funcional de los pacientes con hemorragia intraparenquimatosa.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

# **OBJETIVOS**

En vista de los antecedentes descritos en el apartado de introducción y teniendo presente la hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1. Estudiar la función de las variantes polimórficas rs978906 y Thr431Asn de Rock2 en la recuperación funcional de pacientes de ictus hemorrágico.
- 2. Estudiar la función de las variantes polimórficas rs978906 y Thr431Asn de Rock2 en la reparación cerebral de pacientes de ictus hemorrágico.
- 3. Analizar los niveles y activación de ROCK2 en un modelo murino de HIP in vivo.

# MATERIAL Y MÉTODOS

# 1. ESTUDIO CLÍNICO

Se ha realizado un estudio prospectivo observacional en pacientes con HIP primaria ingresados en el Complejo Asistencial Universitario de Santiago de Compostela entre marzo de 2011 y febrero de 2013. Dicho estudio se enmarca en el contexto de colaboración propiciado por la Red de Investigación Cooperativa Neurovascular (INVICTUS), financiada por el Instituto de Salud Carlos III.

# 1.1. Población de pacientes

Los datos de pacientes de la cohorte se recogieron de manera prospectiva. La información incluía datos demográficos, factores de riesgo vascular, datos de presentación clínica, tensión arterial, marcadores inflamatorios, magnitud del daño neurológico (recogido mediante la escala de ictus del National Institute of Health: NIHSS) (Wityk *et al.*, 1994), volumen de la hemorragia, topografía, parámetros de laboratorio y situación funcional al alta y a los 3 meses.

El criterio de inclusión en la muestra fue el de pacientes consecutivos, previamente independientes, que ingresaron en el Servicio de Neurología por una HIC espontánea, no traumática, de menos de 12 horas desde el inicio de los síntomas (o desde el inicio del sueño, en aquellos de presentación al despertar). Así, se excluyeron 4 pacientes con incapacidad funcional previa (escala de Rankin modificado, m-Rankin >2), 3 con enfermedades inflamatorias crónicas, 5 pacientes con enfermedad sistémica grave (hepática y renal), 2 con cáncer y uno con enfermedad infecciosa los 15 días previos a la inclusión. Tres pacientes rehusaron participar. Al final, se incluyeron en la cohorte un total de 78 pacientes. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) y se solicitó consentimiento informado a los pacientes o sus familiares.

#### 1.2. Variables clínicas

Los pacientes fueron ingresados en la Unidad de Ictus del Hospital Universitario de Santiago de Compostela en la fase aguda de la HIC. Su manejo diagnóstico y terapéutico se ajustó a las guías *ad hoc* publicadas por el Grupo de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (Rodríguez-Yáñez et al., 2013).

Los grupos etiológicos principales para las HIP fueron: hipertensivas, por angiopatía amiloide, por anticoagulación e indeterminada. En cuanto a los grupos topográficos se clasificaron en profundas, lobares, cerebelosas, o troncoencefálicas.

La cuantificación del defecto neurológico se realizó mediante la escala NIHSS. El volumen de hemorragia cerebral se determinó mediante estudios de TAC al ingreso y entre 48-72h del mismo, en el caso de la cohorte gallega, donde también se determinó el volumen residual de la lesión a los 3 meses tras la hemorragia. Para la cuantificación se aplicó la fórmula 0,5 x A x B x C (Figura 16), donde A es el diámetro mayor de la hemorragia, B es el diámetro perpendicular a A, y C es el número aproximado de cortes donde se visualiza la hemorragia, multiplicado por el grosor del corte (Kothari *et al.*, 1996). Este método calcula aproximadamente el volumen del elipsoide y se aproxima de manera bastante precisa a los métodos de medición del volumen del hematoma computerizados (Andrews *et al.*, 2012).



Figura 16. Método de estimación del volumen de la HIP. a. Diámetro máximo; b.Ddiámetro perpendicular a "a"; c. Número de cortes (Modificado de Kleinman et al, 2012).

La variable dependiente principal fue la situación funcional de los pacientes a los 3 meses tras la HIP, cuantificada mediante la escala de Rankin modificada (mRankin o mRS, Tabla 4). Se categorizó considerando mal pronóstico aquellos con puntuaciones >2 y buen pronóstico si la puntuación fue  $\leq 2$ .

# Tabla 4. Escala de Rankin modificada (mRS)

# Grado Descripción

- 0 Sin síntomas en absoluto
- 1 Sin discapacidad significativa: a pesar de presentar algunos síntomas, puede llevar a cabo sus actividades diarias
- 2 Discapacidad leve: incapacidad para realizar las actividades previas, pero capaz de cuidar de sí mismo sin asistencia
- 3 Discapacidad moderada: requiere de algo de ayuda, pero capaz de caminar sin asistencia
- 4 Discapacidad moderada-grave: incapaz de caminar sin asistencia e incapaz de cuidar de sus necesidades corporales sin ayuda.
- 5 Discapacidad grave: encamado, incontinente, requiere de continuos cuidados de enfermería
- 6 Muerte

Modificado de Banks et al., 2007.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.3. Medida de los niveles séricos de BDNF, VEGF, Ang-1 y SDF-1a

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes a las 72 ± 24 h tras la HIC. Las muestras recogidas en tubos BD Vacutainer con anticoagulante se centrifugaron a 3000 rpm durante diez minutos e inmediatamente se congelaron a -80°C. Los niveles plasmáticos de VEGF, Ang-1 y SDF-1 $\alpha$  se midieron utilizando kits comerciales de ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), (BDNF, VEGF, Ang-1: R&D Systems, Inc.; SDF-1 $\alpha$ : RayBiotech, Inc. and Abcam) (Sobrino et al., 2011). Las determinaciones se realizaron en un laboratorio independiente en el cual no se conocían los resultados experimentales. Los coeficientes intra- e inter-ensayo fueron <8% para todos los marcadores.

#### 1.4. Determinación de células progenitoras en sangre periférica

Para la cuantificación de células progenitoras CD34+ en sangre periférica se realizó una extracción sanguínea (3 mL) en 1 tubo BD Vacutainer de vidrio con EDTA basal al ingreso y a los 7 días. Se analizó la expresión de marcadores de superficie mediante citometría de flujo (FACSAria, Becton Dickinson). Las muestras fueron procesadas por un técnico desconocedor de datos clínicos o radiológicos.

#### 1.5. Genotipado del polimorfismo rs978906del gen Rock2

El estudio del polimorfismo de base única (SNP) de ROCK2 rs978906 se realizó mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de un fragmento de 192 pares de bases en el extremo 3'UTR y posterior secuenciación. Las muestras de DNA extraído de la sangre de los pacientes se amplificaron en un termociclador automático Mastercycler® epgradients (Eppendorf). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 12 µl que contenían entre 50 y 200 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada oligonucleótido cebador (*rs978906\_Rock2* Fwd y Rev) y una mezcla Master Mix optimizada (DNA AmpliTools Master Mix, BioTools, Madrid, España) que incluye la DNA polimerasa, los desoxinucleótidos

trifosfato (dNTPs), el tampón de reacción con MgCl<sub>2</sub> y otros estabilizantes necesarios para la amplificación del DNA.

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos Sentido (*rs978906\_Rock2* Fwd): 5'-CTGGGCTCCTTTGAAGCAACAGGT-3' Antisentido (*rs978906\_Rock2* Rev): 5'-TGCTGGTGAAACCTCTCTGTTGAAGC-3'

Las condiciones experimentales de PCR empleadas fueron las siguientes: un ciclo de 5 min a 95°C, 35 ciclos compuestos por 30 seg a 95°C, 1 min a 62°C y 1 min a 72°C, y un último ciclo de 10 min a 72°C (Figura 17).



*Figura 17. Esquema de PCR.* La imagen muestra el perfil de la carrera de PCR empleada para identificar el genotipo de Rock2, donde se especifica la temperatura, tiempo y número de ciclos de cada etapa.

Tras la amplificación se purificaron las muestras con reactivo comercial el paquete comercial *USB® PCR Product Pre-Sequencing Kit* (Affymetrix, Ohio, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Esta mezcla de dos enzimas (exonucleasa y fosfatasa) elimina los posibles restos de DNA monocatenario resultado de la PCR, así como los dNTPs remanentes que pudieran interferir con los procesos de secuenciación.

Se preparó una mezcla de 30 ng de DNA de cada muestra junto con 3 pmol de oligonucleótido cebador sentido (*rs978906\_Rock2* Fwd) y por último se enviaron al

servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. Los resultados se analizaron con el programa *Geneious* (BiomattersLimited).

El genotipado se realizó sin conocer la situación clínica de los pacientes.

#### 1.6. Genotipado del polimorfismo Thr431Asn del gen Rock2

Las muestras procedentes de la sangre de los pacientes se amplificaron mediante PCR como en el caso anterior empleando las mismas condiciones experimentales (Figura 17 de esquema de PCR), a excepción de los oligonucleótidos o cebadores que fueron los siguientes:

Sentido (*Thr431Asn\_Rock2* Fwd): 5'-AGTGACTCTCCATCTTGTAGAGAAG-3' Antisentido (*Thr431Asn\_Rock2* Rev): 5'-AGCCATGTAGAAGTCCTCTTTG-3'

El uso del oligonucleótido Thr431Asn\_Rock2 Fwd introdujo un cambio de base en la secuencia que permitió realizar la discriminación alélica mediante estudios de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Estos estudios consisten en el análisis del tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del DNA con endonucleasas de restricción. El producto de la PCR fue digerido con la enzima de restricción Mboll (New England BioLabs) que reconoce el sitio de corte originado en la secuencia por el uso del oligo Thr431Asn\_Rock2 Fwd y la mutación puntual de citosina a adenina. Los fragmentos generados tras la digestión a 37ºC se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3% (Gibco BRL Life Technologies), para identificar tres genotipos (Figura 18). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X (TrisAcetate 0,04 M, EDTA 1,0 mM, pH 8,3) a 120 voltios, durante 30 minutos. Como marcador del peso molecular (M) se utilizó DNA de un plásmido construido especialmente (pUC, fago  $\lambda$  y secuencia del genoma de levadura) previamente digerido con enzimas de restricción, lo que genera una mezcla de fragmentos de DNA de diferente tamaño (1,0 - 0,1 Kb, Biotools). Para monitorizar la migración del DNA en el gel se incluyeron dos colorantes en el tampón de carga: xileno-cianol y azul de bromofenol. Tras la electroforesis, los fragmentos de DNA amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando

Midori Green Advance (5 µg/mL) (Nippon Genetics Europe GmbH), que emite fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un sistema de fotografía digital (Gel Imager system, Bio-Rad) acoplado a un programa informático de tratamiento de imagen. Los genotipos fueron verificados mediante secuenciación siguiendo el mismo protocolo que en el apartado anterior, empleando el oligonucleótido cebador antisentido en este caso. El genotipado se realizó sin conocer la situación clínica de los pacientes.



**Figura 18 Genotipado de Thr431Asn.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los fragmentos amplificados por PCR del codón 431 de Rock2 y digeridos con Mboll. La calle 10 corresponde a paciente homocigoto C/C; las calles 1,2,4,5,7 y 8 a pacientes heterocigotos C/A y las calles 3,6 y 9 a pacientes homocigotos A/A. M: marcador de peso molecular.

# 2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

#### 2.1. Modelo experimental de hemorragia intracerebral in vivo

La HIP experimental se realizó en ratones de 12 semanas, que se alimentaron en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, de acuerdo con la legislación española (RD 53/2013). Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

El protocolo de HIP se realizó mediante inyección de colagenasa bacteriana VII de *Clostridium histolyticum* (Sigma) en los ganglios basales (Clark *et al.*, 1998). Los animales, anestesiados con sevofluorano al 4% para inducción y al 3% para mantenimiento y evaporado en una mezcla de oxígeno-aire (30-70%), se colocaron en un marco estereotáxico (modelo nº 1900, Kopf®) para posicionar al animal utilizando un sistema digital de lectura de coordenadas (Wizard 550 Readouts, Anilam).

Una vez desinfectada el área quirúrgica, se practicó una incisión de 1 cm en el cuero cabelludo (línea media). Se perforó el cráneo con un trépano (modelo nº. 1911, Kopf®) y una broca de 0,75 mm, en las coordenadas: 0,9 mm anterior y +2,0 mm lateral al bregma. Posteriormente se colocó en una bomba de invección una jeringa Hamilton (Hamilton, 5 µL) con colagenasa tipo VII de Clostridium histolyticum (purificada mediante cromatografía, Sigma) disuelta en solución salina (0,2 U/µL). Una vez fijada la posición de origen (con ejes X, Y y Z en 0,0) sobre bregma, la aguja se recolocó en las coordenadas de entrada (+0,9, +2,0), insertando la misma lentamente en el estriado a una profundidad de 3,5 mm bajo la superficie del cráneo, para inyectar un volumen de 0,5 µL de colagenasa a razón de 0,1 µL/min durante 5 minutos. Se dejó la aguja en la misma posición durante 10 minutos adicionales y luego se sacó lentamente a 1 mm/min para prevenir el reflujo de colagenasa y sangre. El agujero fue sellado con cera de hueso (Ethicon) y la incisión fue suturada. Durante el procedimiento, se monitorizó la temperatura rectal (BAT-12 thermometer, Physitemp) y se mantuvo en 37 ± 0,5°C. Después de la cirugía, los animales se ubicaron en un ambiente cálido para su recuperación (Rodríguez et al., 2017).

#### 2.2. Determinación del volumen de lesión

El volumen de la hemorragia y morfología de los somas celulares se determinó en secciones de cerebros de ratón mediante la técnica de Nissl a las 24 horas y 7 días tras la inyección de colagenasa (Rodríguez *et al.*, 2017).

Los cortes de tejido se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se sumergieron en una mezcla 1:1 de etanol absoluto y cloroformo durante 12 horas. Tras dos lavados en xileno, las secciones se hidrataron mediante pases secuenciales por
una batería de soluciones con concentración decreciente de alcohol (2X etanol absoluto - 96% - 90% - 80% - 70% - 60% -50%) y finalmente H<sub>2</sub>O destilada. A continuación, las secciones se tiñeron con una solución de Cresil Violeta (acetato para-cresilo) al 0,1% (p/v) y ácido acético glacial al 0,3% (v/v) en H<sub>2</sub>O destilada, durante 5-10 min. Tras un lavado rápido en H<sub>2</sub>O destilada, los portaobjetos se pasaron por una batería de alcoholes de concentración creciente para conseguir la deshidratación. Las preparaciones se montaron con Entellan y cubreobjetos. Los portaobjetos fueron escaneados para la cuantificación.

Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (ImageJ 1.48v; Java 1.6.0\_65 [64-bit]).

### 2.3. Análisis de los niveles y actividad de ROCK2

Los niveles de ROCK2 y sus dianas MBS y P-MBS se determinaron por western blot (Bobo-Jiménez *et al.*, 2017).

### 2.3.1. Obtención de muestras

Los animales se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane®) en una cámara conectada a un vaporizador que permite suministrar una mezcla de oxígeno y protóxido de nitrógeno. Rigiéndonos por la directiva del Consejo de Comunidades Europeas respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE), procedimos a la dislocación cervical de los animales una vez estuvieron completamente dormidos. La extracción del encéfalo se realizó sobre una placa con tampón fosfato salino en frío (Delgado-Esteban et al., 2013). Seguidamente, los tejidos se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA (dodecilsulfato sódico 1%, EDTA 10 mM, Triton Tx-100 1% v/v, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; pH 7,0), suplementado con inhibidores de fosfatasas (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 50 mM) y proteasas (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 µM, aprotinina 50 µg/ml, leupeptina 50 µg/ml, pepstatina 50 µg/ml, anti-papaína 50 µg/ml, amastatina 50 µg/ml, bestatina 50 µg/ml, y el inhibidor de tripsina soybean 10 µg/ml) en un homogeneizador vinilo-vidrio (Rodríguez et al., 2018). Las muestras se mantuvieron en hielo durante al menos 30 minutos y se hirvieron durante 5 minutos. Después de repetir este procedimiento y someterlas a ultrasonidos con

### MATERIAL Y MÉTODOS

una frecuencia de 50-60 Hz durante 10 minutos, se centrifugaron a 13.000 rpm, 4°C durante 30 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se recogieron en tubos Eppendorf® y se conservaron a -80°C hasta su uso.

### 2.3.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de los extractos proteicos se midió mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA; Pierce<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific). Este método colorimétrico se basa en la reducción del Cu<sup>2+</sup> (azul) a Cu<sup>+</sup> en presencia de proteínas y en medio alcalino. El catión Cu<sup>+</sup> generado reacciona con el BCA originando un producto de color morado que absorbe de manera lineal a 562 nm. La absorbancia se midió espectrofotométricamente en el lector de placas Multiskan Ascent (Thermo Fischer). Se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar para el cálculo de la recta patrón. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.3.3. Electroforesis de proteínas en SDS-Page

Los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE: electroforesis de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico) para poder estudiar su composición.

Se utilizaron geles discontinuos que presentan (i) en la parte superior un gel concentrador de la banda o "stacking" con un porcentaje constante de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad Laboratories) al 3% en Tris-HCl 1 M pH 6,8 con SDS 10%; persulfato amónico (PSA) 10%; TEMED (*N*,*N*,*N*,*N*'-tetrametilendiamina 0,1%) y (ii) en la parte inferior un gel separador o "running" en el que tiene lugar la separación de los componentes y que presenta distintos porcentajes de acrilamida:bisacrilamida:bisacrilamida 29:1 al 8, 10, 12 ó 15% en Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 con SDS 10%, PSA 10% y TEMED 0,08%). El extracto proteico, de 20 a 50 µg, se resuspendió en tampón de carga (β-mercaptoetanol 4% (v/v), SDS 8% (p/v), azul de bromofenol 0,02% (p/v), glicerol 4% (v/v) y Tris-base 250 mM) en

un volumen correspondiente a la cuarta parte del volumen final. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 100°C, y se centrifugaron a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Para identificar los pesos moleculares de las proteínas en estudio se utilizó un marcador de peso molecular (*Page Ruler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder*, ThermoScientific) que se cargó en el gel junto a las muestras.

Las proteínas se separaron utilizando un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3<sup>®</sup>, Bio-Rad) y tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v); pH 8,3). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección mediante la técnica de Western Blot.

### 2.3.4. Detección de proteínas por Western blot

Las proteínas previamente separadas en geles SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond<sup>®</sup>, Amersham Biosciences) utilizando el sistema Mini-Transblot (BioRad) y tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v); pH 8,3). Con el objetivo de evitar las uniones inespecíficas de anticuerpos, se bloquearon las membranas durante 1 hora con leche desnatada (Sveltesse, Nestle) al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0,1% (v/v); pH 7,5) a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las membranas a 4°C durante toda la noche en una solución de BSA o leche al 2% (p/v) en TTBS que contiene el anticuerpo primario deseado (Tabla 5). Como control de carga se utilizó anti-GAPDH (gliceraldheido 3-fosfato deshidrogenasa) para extractos totales, proteína ribosomal S6 para la fracción citosólica, VDAC para la mitocondrial y Lámina B para la fracción nuclear. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TTBS para retirar el exceso de anticuerpo primario y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la peroxidasa de rábano, en TTBS con leche al 2% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en TTBS se realizó un último lavado en TBS (TTBS sin Tween-20), para evitar que el Tween interfiera con algunos reveladores. Por último, según la proteína a detectar, se incubaron las

### MATERIAL Y MÉTODOS

membranas con los reactivos de quimioluminiscencia *Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Scientific), *Western Blottin Luminol Reagent* (Santa Cruz Biotechnology) o *Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Finalmente, las membranas se expusieron a una película de auto-radiografía (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm) para detectar la señal.

Se realizaron triplicados biológicamente independientes de cada experimento. Las cuantificaciones se llevaron a cabo con el software ImageJ (ImageJ 1.48v; Java 1.6.0\_65 [64-bit]), normalizando cada condición con su control de carga. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de cantidad de proteína respecto a la condición control de cada experimento.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en los estudios de expresión proteica por transferencia tipo western.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia	Casa comercial
Ac. primarios				
ROCK1	Mouse	1:200	sc-265628	StaCruz
ROCK2	Rabbit	1:500	Sc-5561	StaCruz
MYPT-1 (MBS)	Rabbit	1:2000	PRB-457C	BioLegend
P-MYPT-1 (P-MBS)	Rabbit	1:500	MBS000692	MyBioSource
GAPDH	Mouse	1:40000	4300	Ambion
Ac. secundarios				
Anti-mouse	Cabra	1:10000	170-6516	BioRad
Anti-rabbit	Cabra	1:10000	sc-2030	StaCruz

### 3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En lo relativo a los resultados experimentales, todos los valores se expresaron como media ± S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significación se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de la menor diferencia significativa de rango múltiple

(para comparaciones múltiples) o el test de la t de Student (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de p<0,05 se consideró estadísticamente significativo.

En cuanto a los resultados clínicos se planteó primero un análisis descriptivo mediante porcentajes para las variables categóricas y medias (con desviación estándar) o medianas (cuartiles) para las cuantitativas dependiendo de su distribución normal o no. Se compararon las diferencias de las variables en función del pronóstico a los 3 meses (utilizada como variable de agrupación). Las proporciones se compararon usando test de Chi cuadrado y los test de Student o de Mann-Whitney se utilizaron para comparar variables entre grupos. También se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) en caso de examinar las diferencias en las medias de tres o más grupos. El coeficiente de Pearson o el análisis de Spearman se usaron para las correlaciones bivariantes según si seguía una distribución normal o no.

Dada la importancia de evaluar que la muestra no estaba sesgada por una distribución estratificada de las variantes polimórficas debidas a un apareamiento no aleatorio, se exploró la frecuencia alélica de las muestras mediante un *Chi* cuadrado con las frecuencias alélicas esperadas por el principio de Hardy Weinberg.

Para estudiar la relación entre el polimorfismo *rs978906 y Thr431Asn del gen Rock2* y el pronóstico funcional se analizó si la variante polimórfica dicotomizada se mantenía como variable predictora en un modelo multivariante de regresión logística binaria. Con la variable buen o mal pronóstico a 3 meses como variable dependiente, se introdujeron como covariables aquellas que en los análisis univariantes hubiesen mostrado diferencias significativas (p<0,05) junto a otras con significación clínica si se juzgaba pertinente. La introducción de las covariables se realizó mediante un procedimiento hacia delante utilizando el estadístico Wald, para explorar la significación de los coeficientes individuales en el modelo. La posibilidad de colinealidad se analizó para las variables cuantitativas estableciendo la eventual correlación (coeficiente de Pearson). En caso de colinealidad se retuvo en el modelo aquella variable clínicamente más relevante.

### MATERIAL Y MÉTODOS

La calibración del modelo (bondad del ajuste) se analizó mediante los estadísticos R2 de Cox y Snell y de Nagelkerke, así como con la prueba de Hosmer Lemeshow. El modelo permitió el cálculo de la magnitud de la asociación mediante los correspondientes OR con intervalos de confianza al 95%. En los análisis destinados al estudio de los objetivos secundarios en los que la variable dependiente era cuantitativa (volumen de la lesión tras HIP y volumen del edema) se realizaron análisis de regresión lineal múltiple.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS® Statistics 22.0 (SPSS Ibérica, IBM Company).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS rs978906 Y Thr431Asn DE Rock2 EN LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

Para estudiar la posible influencia de los polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn* de *Rock2* en el pronóstico funcional de los pacientes tras una HIP se realizó un estudio prospectivo en una cohorte hospitalaria, de 78 pacientes con hemorragia intracerebral ingresados en la Unidad de Ictus del Hospital Universitario de Santiago de Compostela.

# 1.1. Análisis descriptivo general de la cohorte de pacientes con hemorragia intraparenquimatosa

La edad de los pacientes estudiados fue 70,4  $\pm$  11,1 años, expresada como media  $\pm$  SD. La distribución por sexos fue de 54 varones (69,2%) y 24 mujeres (30,8%).

En cuanto a los factores de riesgo, expuestos en la Tabla 6, el 53,8% de los pacientes presentaba antecedentes de HTA; el 20,5% padecían diabetes, el 12,8% tenía hábito tabáquico, un 21,7% tenía antecedentes de alcoholismo y un 14,1% fibrilación auricular.

Factor de riesgo	N (78)	%
НТА	42	53,8
DM	16	20,5
Tabaquismo	10	12,8
Abuso de alcohol	17	21,7
Fibrilación Auricular	11	14,1

### Tabla 6. Distribución de factores de riesgo

En 48 de los pacientes (61,5%), la localización de la HIC fue hemisférica profunda y en 30 (38,5%) lobular. En la Tabla 7 se especifica la distribución de la HIC según

la etiología. Así, en 36 pacientes (46,1%) la causa de la HIC fue hipertensiva, seguida de las atribuidas a anticoagulantes en 26 pacientes (33,3%), en 13 (16,6%) el origen fue indeterminado y en 3 pacientes (3,8%) la causa se atribuyó a AAC.

Etiología	N (78)	%
HTA	36	46,1
AAC	3	3,8
Anticoagulantes	26	33,3

Tabla 7. Distribución de las HIP según la etiología

El grado de afectación neurológica al ingreso, expresado como la mediana de la puntuación de la escala NIHSS, fue 10 con un rango [2,16]. En los datos de neuroimagen, se observó que el volumen basal del hematoma en TC (medido como se indica en la Figura 16: *Volumen del hematoma = 0,5 x A x B x C*) (*Broderick et al., 1993*), fue de 28,8 ± 27,9 mL. En 23 de los pacientes de la cohorte, lo que representa un 29,5%, la HIC se extendió a los ventrículos cerebrales. El volumen residual de la HIC a los 3 meses fue de 11,7 ± 17,7 mL.

En la Tabla 8 se muestra la distribución de las variables polimórficas de Rock2, los SNPs *rs978906* y *Thr431Asn*.

rs978906 (Rock2)	N (77)	%
A/A	24	31,2
A/G	41	53,3
G/G	12	15,6
Thr431Asn (Rock2)	N (78)	%
C/C	22	28,2
C/A	40	51,3
A/A	16	20,5

Tabla 8. Distribución de los polimorfismos del gen Rock2

En ambos casos la distribución de frecuencias génicas se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg (p>0,1).

La cuantificación del estado funcional a los 3 y 12 meses tras la HIP, se realizó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m o mRS) (Tabla 4) (Banks & Marotta, 2007). En la cohorte, 42 pacientes (53,8%) presentaba mal pronóstico funcional (Rankin-m>2) a los 3 meses de sufrir la HIP, mientras que 36 pacientes (46,2%) se encontraban en la situación definida como buen pronóstico funcional (Rankin-m≤2). La distribución de los distintos estados funcionales de los pacientes con HIC se resume en la Tabla 9.

Rankin-m	N (78)	%
0	10	12.8
1	17	21.8
2	9	11.5
3	12	15.9
4	9	11.5
5	3	3.8
6	18	23.1

Tabla 9. Distribución de los distintos estados funcionales

# 1.2. Análisis del polimorfismo rs978906 de Rock2 en la hemorragia intraparenquimatosa

El polimorfismo *rs978906* en el extremo 3'-UTR del gen que codifica la proteína ROCK2 consiste en la sustitución de una adenina (A) por una guanina (G). Dicho cambio condiciona la síntesis proteica, ya que genera una variante de la proteína que tiene más afinidad por el microRNA miR-1183 (Liao et al., 2015). Estas moléculas de RNA no codificante de 20-24 nucleótidos participan en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional y afectan tanto a la estabilidad como a la traducción de los RNA mensajeros. Por tanto, el polimorfismo *rs978906* 

afectará a los niveles de ROCK2, que serán mayores en la variante ancestral *A/A* y menores en aquellos pacientes con genotipo *G/G* (Liao et al., 2015).

## 1.2.1. El polimorfismo rs978906 de Rock2 condiciona el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragia intraparenquimatosa

Los niveles de ROCK2 se asocian con rigidez arterial (Liao et al., 2015), muerte celular y daño axonal (Gu et al., 2013). Por tanto, es previsible que tengan un papel destacado en la fisiopatología de la HIP.

Tras realizar el estudio estadístico con la cohorte del Hospital Universitario de Santiago de Compostela, observamos que el genotipo *G/G* del polimorfismo *rs978906* se asocia a buen pronóstico de los pacientes, de manera estadísticamente significativa, desde el alta (p=0,002). Esta asociación se mantiene a los 3 (p<0,0001) y 12 meses (p=0,001) tras la HIP (Figura 19).



*Figura 19. Asociación entre el polimorfismo rs978906 de Rock2 y el pronóstico funcional (A) al alta; (B) a los tres meses; (C) al año.* El estado funcional de los pacientes tras la HIC se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada (mRS). Los valores se expresan como mediana [rango intercuartílico]. \*p< 0,005 respecto a los pacientes *A/A*.

Al agrupar a los pacientes en buen y mal pronóstico a los 3 meses y comparar la distribución de las variantes alélicas de *rs978906*, se observó que un 75% de los pacientes *A/A* tenían mal pronóstico, mientras que el 83,3% de los *G/G* tenían una situación funcional asociada a buen pronóstico (mRS≤2). Estos resultados

sugieren que el polimorfismo *rs978906* podría ser un marcador de pronóstico funcional en pacientes con HIP (p=0,04) (Tabla10).

rs978906	Bueno	Malo
	N=36	N=41
A/A	25,0%	75,0%
A/G	48,8%	51,2%
G/G	83,3%	16,7%

### Tabla 10. Pronóstico a los 3 meses

De manera más gráfica se observa en la Figura 20 cómo se distribuye el pronóstico funcional de los pacientes en función del genotipo *A/A, A/G* o *G/G*.



*Figura 20. Distribución de los genotipos según el pronóstico funcional tras la hemorragia*. Los valores se expresan como porcentaje (%). \*p< 0,005 respecto a los pacientes *A*/*A*.

### 1.2.2. El polimorfismo rs978906 de Rock2 condiciona el volumen de lesión tras la hemorragia

Como ya se ha comentado anteriormente, el pronóstico funcional de los pacientes con HIP suele estar vinculado a la localización y al volumen de la lesión, así como a la extravasación a ventrículos (Poon *et al.*, 2014; Hemphill JC 3rd *et al.*, 2011). Por ello, variables como el volumen de lesión inicial y el residual a los 3 meses se incluyeron como variables secundarias del estudio. También se determinó el volumen de edema a las 48-72 horas (Figura 21).

Los resultados obtenidos demuestran una correlación entre el genotipo G/G y un menor volumen de hemorragia. Una tendencia que se mantiene a las 48-72 horas y a los 3 meses del evento, aunque no llega a ser estadísticamente significativa en estos tiempos (Figura 21). Observamos cómo los individuos heterocigotos (A/G) muestran unos resultados intermedios, mientras que el volumen de lesión de los individuos A/A es prácticamente el doble en todos los casos.

En su conjunto, los datos sugieren un efecto protector de la variante alélica *G*, que podría estar relacionado con factores vasculares o inflamatorios que protejan frente a la expansión de la hemorragia o la formación del edema perihematoma (Zheng et al., 2016). Para corroborarlo será pertinente realizar estudios adicionales que ayuden a determinar los posibles mecanismos moleculares subyacentes.



Figura 21. Asociación entre el polimorfismo rs978906 de Rock2 y el volumen de lesión (A) basal; (B) a las 48-72h; (C) a los 3 meses. El volumen (cc, centímetros cúbicos) se determinó mediante la fórmula 0,5 x A x B x C. Los valores se expresan como medias  $\pm$  SD. \*p< 0,05 respecto a los pacientes A/A.

Tampoco se puede obviar la posible relación de esta variante alélica con un mejor control de la tensión arterial en la fase aguda (momento hiper-agudo), teniendo en cuenta que dicho control se ha relacionado a nivel clínico y experimental con un menor edema perilesional (Xi *et al.*, 2014), así como con un menor volumen de la

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

HIP (Rodríguez-Luna et al., 2018; Bohman et al., 2020). La relación entre ROCK2 y la tensión arterial es uno de los aspectos de ROCK2 mejor estudiados (Seasholtz et al., 2006), especialmente en el contexto del polimorfismo rs978906 (Pandey et al., 2016), conectando con la regulación de la rigidez vascular, la función endotelial y la musculatura lisa vascular (De Silva et al., 2016). Por tanto, podemos hipotetizar que el polimorfismo rs978906 de Rock2, mediante la regulación de estos procesos vasculares, condiciona la reparación vascular y, con ello, la recuperación funcional de los pacientes de HIP. En este contexto, resultados anteriores del laboratorio han demostrado que una reparación vascular eficiente y rápida tras un daño cerebral promueve un mejor pronóstico funcional tras la HIP (Rodríguez et al., 2017). Es más, el hecho de que la asociación entre el polimorfismo y el pronóstico se observe ya al alta de los pacientes, podría estar relacionado, además, con procesos de muerte endotelial. Así, una mayor muerte de células endoteliales implica un mayor daño vascular y, con ello, una peor reparación cerebral y recuperación funcional tras el ictus. El mayor volumen de lesión basal observado en los pacientes con genotipo A/A sugiere que estos pacientes podrían sufrir un mayor daño inicial, probablemente como resultado de una mayor rigidez vascular y la consiguiente HTA.

Mediante el análisis de las variables segregadas según buen (mRS≤2) o mal pronóstico (mRS>2) se observaron los factores que influyen en el pronóstico funcional de los pacientes con HIP. Los valores se expresan como medias ± SD o porcentajes, excepto el valor de la escala NIHSS que se expresa como mediana [rango intercuartílico], y siendo las variables evaluadas: edad, sexo, antecedentes (de hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo, enolismo, fibrilación auricular), situación neurológica al ingreso, parámetros de laboratorio, tensión arterial al ingreso, variables de neuroimagen (volumen basal del hematoma, edema perihematoma, localización de la hemorragia, extravasación ventricular), clasificación etiológica de la HIC y variables relacionadas con las células progenitoras CD34+ (número al ingreso y al día 7 tras la HIC, así como el incremento en la primera semana); resultando estadísticamente significativas para

mal pronóstico la variable edad (p=0,017), antecedente previo de HTA (p=0,013), temperatura máxima en las primeras 24 horas (p=0,001), NIHSS basal (p<0,0001), volumen del hematoma basal (p<0,0001) y extravasación ventricular (p<0,0001).

En el caso de las células progenitoras CD34+, no se observaron diferencias en el número de células entre los pacientes con buen y mal pronóstico al ingreso (p=0,013). Sin embargo, los niveles de estas células CD34+ al 7º día tras la HIC fueron significativamente superiores (p<0,0001) en aquellos pacientes con buen pronóstico funcional incremento de células progenitoras en la primera semana (Tabla 11). Estos resultados corroboran el valor pronóstico de las células CD34+ circulantes en la predicción del estado funcional de pacientes tras una HIC (Sobrino et al., 2011; Rodríguez et al., 2017). Así, mayores niveles de células CD34+ favorecen el pronóstico de los pacientes (Sobrino et al., 2011; Rodríguez et al., 2017). Se observaron también resultados interesantes con los factores de crecimiento, factor de crecimiento vaso-endotelial (VEGF) (p=0,013), angiopoyetina 1 (Ang-1) (p<0,003), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (p<0,0001) y factor 1 $\alpha$  derivado del estroma (SDF-1 $\alpha$ ) (p<0,0001). Por su relevancia en la memoria dedicaremos un apartado a estos aspectos.

En la Tabla 11 también se observa que el genotipo G/G de *rs978906* (*Rock2*) se asocia con buen pronóstico funcional presentando una asociación estadística altamente significativa (p<0,0001), lo que sugiere una función como biomarcador de buen pronóstico de ictus hemorrágico.

	Buen pronóstico N = 36	Mal pronóstico N = 42	p-valor
Edad, años	67,0 ± 11,4	72,7 ± 10,0	0,017
Hombres, %	69,4	69,0	0,583
Antecedente hipertensión arterial, %	69,4	40,5	0,013
Antecedente diabetes, %	27,8	14,3	0,168
Antecedente tabaco, %	13,9	11,9	0,528
Antecedente alcohol, %	27,8	16,7	0,279
Antecedente fibrilación auricular, %	11,1	16,7	0,356
Tiempo de latencia, h	$5,4 \pm 3,6$	$4,6 \pm 3,8$	0,059
Temperatura al ingreso, ºC	$36,5 \pm 0,5$	$36,2 \pm 0,7$	0,117
Temperatura máxima en las primeras 24 h, ºC	$36,7 \pm 0,5$	$37,1 \pm 0,6$	0,001
Tensión arterial sistólica al ingreso, mm Hg	163,7 ± 29,4	164,7 ± 30,1	0,877
Tensión arterial diastólica al ingreso, mm Hg	87,6 ± 20,5	87,6 ± 16,7	0,988
Glucemia basal, mg/dL	129,3 ± 34,1	134,3 ± 33,9	0,147
Leucocitos basales, x 10 <sup>3</sup> /mL	$9,0 \pm 1,8$	9,1 ± 3,3	0,364
Plaquetas basales, x 10 <sup>3</sup> /mL	237,2 ± 57,0	232,7 ± 56,6	0,849
NIHSS basal	5 [2, 10]	14 [9, 16]	<0,0001
Volumen hematoma basal, mL	13,6 ± 11,2	41,9 ± 31,3	<0,0001
Crecimiento del volumen en la 1ª semana, mL	$21,7 \pm 37,2$	$36,4 \pm 32,9$	0,069
Volumen edema 48-72 h, mL	$35,3 \pm 14,2$	$42,0 \pm 30,0$	0,069
Localización de la hemorragia, %			0,564
Lobar	38,9	38,1	
Profunda	61,1	61,9	
Extravasación ventricular, %	5,6	50,0	<0,0001
Diagnóstico, %			0,142
Hipertensiva	58,3	35,7	
Amiloidea	5,6	2,4	
Antiagregantes/Anticoagulantes	22,2	42,9	
Indeterminada	13,9	19.0	
CD34 <sup>+</sup> al ingreso, células/250000 eventos	222,9 ± 102,9	202,0 ± 75,3	0,333
CD34 <sup>+</sup> al 7º día, células/250000 eventos	457,6 ± 97,4	255,9 ± 87,6	<0,0001
Incremento CPs en la primera semana, %	$51,\!6\pm17,\!7$	$18,\!2\pm25,\!2$	<0,0001
VEGF, pg/mL	$602,1 \pm 306,\! 6$	$\textbf{422,9} \pm \textbf{221,4}$	0,013
Ang-1, ng/mL	$\textbf{67,6} \pm \textbf{26,7}$	$49,1\pm21,8$	0,003
BDNF, ng/mL	$\textbf{77,7} \pm \textbf{21,7}$	$\textbf{57,9} \pm \textbf{17,9}$	<0,0001
SDF-1a, pg/mL	$\textbf{3189,0} \pm \textbf{894,5}$	$\textbf{2083,3} \pm \textbf{736,4}$	<0,0001
Polimorfismo rs978906 (Rock2)			0,004
A/A	25,0	75,0	
A/G	48,8	51,2	
G/G	83,3	16,7	
Polimorfismo rs978906 (Rock2) cat.			<0,0001
A/A + A/G	40,0	60,0	
G/G	83,3	16,7	

Tabla 11. Análisis multivariado (Polimorfismo Rock2-rs978906)

El modelo de regresión logística confirmó el valor predictor del polimorfismo *rs978906* en el pronóstico funcional (Tabla 12).

	OD	IC 95%	Р
Edad	1,06	0,97-1,15	0,219
Antecedente de HTA	3,36	0,59-19,17	0,172
Temperatura máxima en el primer día	2,81	0,56-14,29	0,211
NIHSS basal	1,43	1,15-1,81	0,002
Volumen HIP basal	1,02	0,97-1,08	0,387
Extravasación ventricular	50,34	3,19-794,80	0,005
Polimorfismo rs978906 G/G	0,21	0,09-0,97	<0,0001

### Tabla 12. Modelo de regresión logística

Podemos decir, por tanto, que los niveles de ROCK2, condicionados por el polimorfismo *rs978906* afectan a la recuperación funcional de pacientes de ictus hemorrágico. Los individuos con genotipo *G/G*, que modula a la baja los niveles de ROCK2 (Llao et al., 2015), suelen presentar mejor pronóstico que aquellos que portan la variante *A*. Además, presentan un menor volumen de la hemorragia, sobre todo al inicio del proceso. Podría, por tanto, deducirse un efecto deletéreo de ROCK2 ante eventos hemorrágicos, lo cual sugiere que la inhibición de esta quinasa podría resultar altamente beneficiosa. Así, ROCK2 podría ser una diana terapéutica de interés en HIP para el desarrollo de fármacos que inhiban selectivamente esta proteína.

# 1.3. Análisis del polimorfismo Thr431Asn de Rock2 en la hemorragia intraparenquimatosa

El polimorfismo *Thr431Asn* consiste en una mutación puntual de citosina (C) por adenina (A) que genera un cambio de aminoácido. En la variante ancestral la

posición 431 está ocupada por una treonina (Thr), mientras que en la mutada la ocupa una asparagina (Asn). La sustitución de este aminoácido tiene lugar en el dominio *coiled-coil* de la proteína ROCK2, que se asocia con la dimerización de ROCK y la unión con Rho (Figura 15) (Seasholtz *et al.*, 2006). Así, dicha mutación puntual determina la actividad de la proteína, que será mayor o menor dependiendo de si se trata de la variante *C* o *A*, respectivamente (Liao et al., 2015). Dado que el polimorfismo *Thr431Asn* de *Rock2* regula la actividad de la quinasa, podría estar afectando a la función vascular, por lo que realizamos un estudio de asociación entre este polimorfismo y el estado funcional de los pacientes tras la HIP.

## 1.3.1. El polimorfismo Thr431Asn de Rock2 condiciona el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragia intraparenquimatosa

En esta cohorte, se objetiva de manera estadísticamente significativa, la asociación entre el genotipo A/A y buen pronóstico (Figura 22). Este hecho es evidente al alta y se mantiene a los tres meses y al año desde el evento (p<0,0001).



*Figura 22. Asociación entre el polimorfismo Thr431Asn de Rock2 y el pronóstico funcional (A) al alta; (B) a los tres meses; (C) al año.* El estado funcional de los pacientes tras la HIC se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada (mRS). Los valores se expresan como mediana [rango intercuartílico]. \*p< 0,005 respecto a los pacientes *C/C*.

Al realizar la Chi-cuadrado agrupando el pronóstico a los 3 meses, en buen y mal pronóstico, también se obtiene significación estadística, siendo la variante alélica *A/A* de buen pronóstico, con p<0,0001 (Tabla 13).

Thr431Asn (Rock2)	Bueno	Malo
	N=36	N=42
C/C	9,1%	90,9%
C/A	45,0%	55,0%
A/A	75,0%	25,0%

### Tabla 13. Pronóstico a los 3 meses

Por tanto, estamos ante un escenario similar a lo observado con el polimorfismo *rs978906*. Así, el polimorfismo *Thr431Asn* podría ser un marcador de pronóstico funcional en pacientes con HIP. En concreto la variante minoritaria *A* se asociaría con una mejor puntuación de mRS. Todo ello pone de manifiesto la importancia de los niveles y actividad de ROCK2 en la fisipatología de la HIP.

## 1.3.2. El polimorfismo Thr431Asn de Rock2 condiciona el volumen de lesión tras la hemorragia

Los resultados obtenidos en el estudio del volumen de lesión indican que, al igual que sucedía con el polimorfismo *rs978906*, el genotipo *C/C* se asocia a un mayor volumen de lesión, mientras que los pacientes *A/A* presentan menos volumen desde el inicio (p<0,0001), y también en las sucesivas mediciones, a las 48-72 horas (p<0,0001) y a los tres meses (p=0,029) (Figura 23). Para este polimorfismo, el heterocigoto *C/A* presenta unos valores intermedios, si bien se aproxima más a los valores observados con el homocigoto *A/A* de buen pronóstico.

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



Figura 23. Asociación entre el polimorfismo Thr431Asn de Rock2 y el volumen de lesión (A) basal; (B) a las 48-72h; (C) a los 3 meses. El volumen (cc, centímetros cúbicos) se determinó mediante la fórmula 0,5 x A x B x C. Los valores se expresan como medias  $\pm$  SD. \*p< 0,05 respecto a los pacientes C/C.

En la Tabla 14 se recogen los datos de polirmorfismo *Thr431Asn* para el análisis multivariado, en línea con la información mostrada en la Tabla 11. Se observa cómo la variante *A/A* presenta un mejor pronóstico funcional frente a la *C/C*, que se asocia de manera estadísticamente significativa con mal pronóstico funcional (p<0,0001).

	Buen pronóstico N = 36	Mal pronóstico N = 42	p-valor
Polimorfismo Thr431Asn (Rock2)			<0,0001
C/C	9,1	90,9	
C/A	45,0	55,0	
A/A	75,0	25,0	
Polimorfismo Thr431Asn (Rock2) cat.			0,010
C/C + C/A	38,7	61,3	
A/A	75,0	25,0	

Tabla 14. Análisis multivariado (Polimorfismo Rock2-rs978906)

Deducimos, por tanto, que la disminución en los niveles de ROCK2, en el caso del polimorfismo *rs978906*, así como de la actividad de la proteína ROCK2, en el caso del polimorfismo *Thr431Asn*, se relacionan con un menor volumen de hemorragia, ya desde los momentos inmediatos al evento, así como un mejor pronóstico

funcional de los pacientes, tanto al alta, como a los 3 meses y al año. El motivo podría situarse en el posible efecto deletéreo de ROCK2 tras su activación en la HIP. Dicho efecto podría darse por múltiples vías, ocasionando un mayor volumen y edema con una mayor disrupción de la BHE (Fu *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2018; Kong *et al.*, 2018), un peor control de la tensión arterial en los momentos inmediatos a la aparición de la lesión, o incluso un menor grado de plasticidad neuronal en términos de crecimiento dendrítico y axonal (Yan *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2009). Todos estos procesos quizá estén interrelacionados y ocurran simultáneamente favoreciendo los datos expuestos anteriormente.

Como ya hemos mencionado, el hecho de observar una asociación de los polimorfismos de Rock2 que condicionan su actividad y niveles, y el volumen de lesión desde los primeros momentos tras la HIP sugieren que ROCK2 podría tener una importante función en los procesos de daño cerebral que se producen inmediatamente tras la hemorragia. Como ya hemos demostrado en trabajos anteriores, la recuperación funcional de los pacientes depende del balance entre el daño y la reparación cerebrales tras el ictus (Gómez-Sánchez et al, 2011; Rodríguez et al., 2017; Rodríguez et al., 2018). Este trabajo abre nuevas vías de investigación destinadas a descifrar la función de ROCK2 en dicho equilibrio.

### 1.4. Un posible haplotipo de Rock2 relacionado con el pronóstico funcional en hemorragia intraparenquimatosa

Se ha descrito que ambos polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn* están en desequilibrio de ligamiento (Liao et al., 2015), algo que hemos comprobado también en nuestra cohorte. Durante el desarrollo de este trabajo observamos que ambas mutaciones en los polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn* se heredaban conjuntamente. Es decir, los pacientes *G/G* (*rs978906*) siempre son *A/A* (*Thr431Asn*). Por ello, nos planteamos analizar si podía haber un genotipo dominante o bien un haplotipo de Rock2 que pudiera estar relacionado con el

pronóstico funcional en hemorragia intraparenquimatosa. Por tanto, estudiamos si el buen pronóstico de la variante *G* (polimorfismo *rs978906*) se podría deber, al menos en parte, a su asociación con la variante *A* (polimorfismo *rs978906*), aunque también sería factible un efecto aditivo de ambos.

Para estudiar este fenómeno, se realizaron tres modelos estadísticos de regresión logística, tomando como variable dependiente el mal pronóstico a los 3 meses. Se incluyeron aquellas variables más potentes, que son el NIHSS al ingreso y el volumen de la hemorragia al ingreso. En las variables categóricas múltiples, el alelo ancestral es el utilizado como referencia de mal pronóstico.

En el primer modelo (Tabla 15), estudiamos el polimorfismo *rs978906*. Como ya hemos visto previamente, podemos constatar cómo a mayor volumen y mayor NIHSS, se sigue un peor pronóstico. Así mismo, la variante *A* se correlaciona con mal pronóstico, y la G/G con buen pronóstico, un efecto protector. Sin embargo, no se alcanza significación estadística en el caso del heterocigoto A/G.

Variable dependiente	OR	IC 95%	Р
NIHSS ingreso	1,222	1,076-1,388	0,002
Volumen al ingreso	1,050	1.010-1,093	0,015
Polimorfismo rs978906 (Rock2)			
A/A	Ref		0,004
A/G	0,281	0,062-1,278	0,100
G/G	0,102	0,012-0,852	0,035

En el segundo modelo (Tabla 16), estudiamos el polimorfismo *Thr431Asn*. Los resultados obtenidos van en línea con lo observado en el caso anterior. Las variables NIHSS y volumen de la hemorragia al ingreso se correlacionan con mal pronóstico, al igual que el genotipo *C/C*. Mientras que el genotipo *A/A*, y también en este caso el heterocigoto *C/A*, estarían asociados a buen pronóstico.

### Tabla 16. Modelo 2. Polimorfismo Thr431Asn (Rock2)

Variable dependiente	OR	IC 95%	Р
NIHSS ingreso	1,222	1,076-1,388	0,002
Volumen al ingreso	1,050	1,010-1,093	0,015
Polimorfismo Thr431Asn (Rock2)			
C/C	Ref		0,022
C/A	0,129	0,018-0,909	0,040
A/A	0,039	0,004-0,393	0,006

El tercer modelo (Tabla 17), se incluyen ambos polimorfismos. Podemos observar cómo el polimorfismo *rs978906* tiene un mayor efecto protector y presenta una significación estadística potente que anula la del polimorfismo *Thr431Asn*, en relación con el pronóstico funcional a los 3 meses. Por tanto, nuestros resultados demuestran que el efecto protector del polimorfismo *Thr431Asn* podría deberse a su asociación con el *rs978906*.

### Tabla 17. Modelo 3. Polimorfismos rs978906 y Thr431 (Rock2)

Variable dependiente	OR	IC 95%	Р
	U.N.		•
NIHSS ingreso	1,244	1,080-1,433	0,002
	4.040	0.000 4.000	0.057
volumen al ingreso	1,048	0,998-1,099	0,057
Polimorfismo rs978906 (Rock2)	19,567	8,911-420,146	0,016
Polimorfismo Thr431Asn (Rock2)	2,883	0,409-20,308	0,288

### 2. FUNCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS rs978906 Y Thr431Asn de Rock2 EN LA REPARACIÓN CEREBRAL TRAS LA HEMORRAGIA

La recuperación funcional tras un ictus depende del balance entre el daño cerebral y la activación de las vías compensatorias de reparación (Tovar et al., 2016). La neovascularización juega un papel fundamental en los procesos de reparación cerebral, ya que estimula el flujo sanguíneo y favorece el aporte de nutrientes de la zona dañada (Quaegebeur et al., 2011; Potente et al., 2011). Recientemente, mediante estudios clínicos y empleando modelos animales, se ha visto que existe una correlación entre estos fenómenos y el buen pronóstico funcional tras un ictus hemorrágico (Rodríguez et al., 2017). Además, la formación de nuevos vasos es determinante en la recuperación funcional a largo plazo, ya que estimula otros mecanismos regeneración endógena de como son la neurogénesis, sinaptogénesis y plasticidad sináptica, todos ellos involucrados en la regeneración endógena y en la recuperación tardía del cerebro (Ergul et al., 2012).

Los niveles plasmáticos de factores angiogénicos, entre los que se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la angiopoyetina-1 (Ang-1), son determinantes para la movilización de células progenitoras desde la médula ósea en respuesta a la hipoxia tras un accidente cerebrovascular (Asahara et al.,1999; Hattori et al., 2001; Rodríguez et al., 2017). El VEGF y la quimiocina SDF-1α promueven la migración e incorporación de los progenitores endoteliales a los tejidos lesionados, favoreciendo su diferenciación y activando las células endoteliales maduras (Bogoslovsky et al., 2011; Potente et al., 2011), lo que contribuye en gran medida a la neovascularización tras la hemorragia (Rodríguez et al., 2017). Por otra parte, el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) es la neurotrofina más abundante en cerebro adulto y participa en numerosos mecanismos de neurorrehabilitación y la neuroplasticidad tras el ictus (Liu et al., 2020), promoviendo el crecimiento de las neuritas y presumiblemente la neurogénesis.

En la cohorte analizada observamos que después de la hemorragia se produce un aumento de los niveles de VEGF, Ang-1 y SDF-1 $\alpha$ . Además, observamos mayores niveles de BDNF en aquellos pacientes con buen pronóstico (Tabla 11). Otro dato importante será la cantidad de células CD34+ movilizadas tras la lesión, que también aumenta en este grupo de pacientes con mejor estado funcional. Para estudiar la posible asociación de los polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn* de ROCK2 con estas variables se realizaron los estudios que se describen en los apartados posteriores.

# 2.1. Análisis de los niveles de células CD34+ en pacientes de hemorragia intraparenquimatosa

El número de células progenitoras CD34+ determinados al día 7 tras la HIP se asocia, de forma independiente, con buen pronóstico funcional y un menor volumen de lesión residual a los 3 meses (Sobrino et al. 2011; Rodríguez et al., 2017). Esto es algo que se cumple en la cohorte estudiada, donde observamos la relación entre los niveles circulantes de CD34+ y el pronóstico funcional de los pacientes de HIP (Tabla 11). Hemos estudiado la posible influencia de los polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn* sobre los niveles de células CD34+.

Como se muestra en las Figuras 24 y 25, los pacientes con genotipo *G/G* de *rs978906* y *A/A* de *Thr431Asn*, que se asocian con buen pronóstico funcional a los 3 meses de la HIP, presentaron niveles elevados de células CD34+ a los 7 días de la HIC. Por el contario, los pacientes que portan la variante ancestral, *A* y *C* según el polimorfismo, presentaban menos células CD34+ circulantes. Estas diferencias no son estadísticamente significativas, pero podrían ser funcionales ya que se muestra una tendencia en consonancia con el peor pronóstico observado en estos pacientes. Esta mayor movilización de células CD34+ podría resultar en una

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

mayor neovascularización tras la HIP (Sobrino et al., 2011; Rodríguez et al., 2017), promoviendo así la reparación vascular y un mejor pronóstico de los pacientes.



Figura 24. Influencia del polimorfismo rs978906 en el número de células CD34+ circulantes. A. Número de células CD34+ al ingreso; B. Número de células CD34+ al día 7 del evento. Los resultados se expresan como medias ± SD.



Figura 25. Influencia del polimorfismo Thr431Asn en el número de células CD34+ circulantes. A. Número de células CD34+ al ingreso; B. Número de células CD34+ al día 7 del evento. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SD.

### 2.2. Análisis de los factores de crecimiento y citoquinas (VEGF, Ang-1, BDNF y SDF-1α) en la hemorragia intraparenquimatosa

Los efectos neurotróficos de factores de crecimiento, como VEGF, se han descrito en múltiples ocasiones. No solo en relación con procesos vasculares, sino también en el contexto de isquemia neuronal, ya que promueve la supervivencia de estas células en cultivo (Greenberg *et al.*, 2013). El factor BDNF también ha sido protagonista de múltiples estudios en esta línea (Chen et al., 2013). Resulta interesante, por tanto, medir la relación entre las variantes polimórficas de buen pronóstico y la concentración de estos factores en plasma a las 72 horas de la lesión. Así, se determinaron distintos factores de crecimiento y citoquinas (VEGF, Ang-1, BDNF y SDF-1α), tanto para el polimorfismo *rs978906* (Figura 26) como para el *Thr431Asn* (Figura 27).



Figura 26. Influencia del polimorfismo rs978906 en los niveles séricos de diferentes factores de crecimiento. A. VEGF. B. Ang-1; C. BDNF; D. SDF-1. \*\*p< 0,0001 respecto a los pacientes C/C

En ambos casos se observa una relación clara entre los niveles de estas citoquinas en los pacientes G/G y A/A con buen pronóstico. Esto podría estar

vinculado con un menor daño inicial y un mayor efecto de reparación y plasticidad neuronal motivado por la menor abundancia y actividad de ROCK2 y, quizás, no tanto por la asociación con procesos íntimamente relacionados con la movilización de progenitores endoteliales CD34+, como son la re-endotelización, angiogénesis y vasculogénesis (Pías-Peleteiro *et al.*, 2017). Esta interpretación debería ser corroborada en un futuro próximo mediante la realización de experimentos en cultivos de neuronas, inhibiendo ROCK2, y valorando si existe o no un alargamiento dendrítico secundario.



Figura 27. Influencia del polimorfismo Thr431Asn en los niveles séricos de diferentes factores de crecimiento. A. VEGF. B. Ang-1; C. BDNF; D. SDF-1. \*\*p< 0,0001 \*p<0,05 respecto a los pacientes C/C

Resultados previos del laboratorio demuestran que la producción de estos factores de crecimiento depende, en gran medida, de la muerte celular que se produce tras la lesión. De modo que una mayor supervivencia celular estaría vinculada a una mayor producción de citoquinas y, por tanto, a una mejor recuperación del daño

hemorrágico (Rodríguez et al., 2017). La asociación observada entre las variantes polimórficas de ROCK2 y el pronóstico funcional desde el momento del alta de los pacientes, podría estar relacionado también con procesos de muerte endotelial. Así, una mayor rigidez arterial, y la consiguiente HTA vinculada a las variantes ancestrales de ROCK2, podrían explicar un mayor daño endotelial relacionado con un mayor volumen de lesión y una menor producción de VEGF y Ang-1, y, con ello, una peor reparación cerebral y recuperación funcional tras el ictus.

En la presente memoria, por tanto, constatamos el importante papel de ROCK2 ya desde el inicio de la lesión (Figuras 19 y 21, Figuras 22 y 23). Nuestros resultados indican también que la quinasa ROCK2, de alguna manera, debe actuar en la reparación tras la HIP, puesto que su asociación con el volumen de lesión se mantiene en el tiempo (Figuras 21C y 23C). ROCK2 tendría un papel en el balance entre daño/reparación (Figuras 24-27), que es el que finalmente condiciona la recuperación funcional de los pacientes (Gómez-Sánchez et al., 2011, Rodríguez et al., 2017). Por tanto, hemos identificado polimorfismos en el gen Rock2 que, a través de la modulación de estas vías de daño y reparación cerebral estarían condicionando el pronóstico de pacientes de HIP. Además, posicionamos a ROCK2 como una importante diana terapéutica a tener en cuenta para posibles intervenciones futuras en el contexto de la HIP.

### 3. ACTIVIDAD DE ROCK2 TRAS LA HEMORRAGIA INTRAPARENQUIMATOSA

De los estudios clínicos se infiere que existe una fuerte asociación de los polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn*, que afectan a la expresión y actividad de ROCK2 respectivamente, con el pronóstico funcional de pacientes con HIP. Así mismo, queda patente la relación con el volumen de lesión en el momento del daño. Para conocer cuál es la dinámica de ROCK2 y si, efectivamente, se están produciendo cambios en la actividad de la proteína empleamos modelos animales. Esto permitirá mejorar la comprensión de los procesos fisiopatológicos implicados en la hemorragia cerebral (Senn et al., 2014)

### 3.1. Análisis de los niveles de ROCK2 tras la hemorragia intraparenquimatosa

Teniendo presente que el tamaño y la localización de la lesión son factores críticos tanto en humanos como en roedores (Broderick et al., 1993; MacLellan et al., 2008), se empleó un modelo experimental de hemorragia intraparenquimatosa en ratones, que genera un sangrado en una localización concreta y de forma controlada (Figura 28). Mediante inyección de colagenasa en los ganglios basales se logra un sangrado continuo durante las primeras horas y una expansión gradual del hematoma que perfila una lesión similar a la observada en humanos (MacLellan et al., 2008).



*Figura 28. Imagen representativa del sangrado tras la inyección de colagenasa.* Sección de cerebro de dos animales, uno Sham, donde se realiza todo el procedimiento sin inyectar la enzima y uno donde sí se ha producido la lesión (HIP) 24 horas antes.

El animal inyectado muestra una lesión hemorrágica que es evidente a las 24 horas, momento en el cual se alcanza el máximo volumen de sangrado y a partir del cual se evidencia la reabsorción del hematoma, prácticamente inapreciable a los 7 días de la inyección (Rodríguez *et al.*, 2017). De manera que tenemos la posibilidad de estudiar lo que sucede en el momento agudo y una vez se activan los fenómenos de reparación cerebral (Figura 29).

Se estima que el cerebro humano tiene un volumen de 1.300 cm<sup>3</sup>. Volumen que puede variar y determinar el pronóstico funcional de pacientes tras un ictus (Schirmer et al., 2020). Hemos visto en el estudio clínico que el volumen de lesión también es un factor determinante en el estado de los pacientes (Tabla 11) y su evolución tras la HIP. Mediante un cálculo sencillo se puede estimar que los pacientes con buen y mal pronóstico reclutados en la cohorte de HIP tendrían una afectación en torno al 1% y 3% del cerebro, respectivamente.

Cabe mencionar que el modelo empleado para estudiar la HIP in vivo es altamente reproducible y permite obviar la variabilidad del volumen de lesión observada en humanos y la influencia que esta ejerce en el pronóstico. Además, el control de la dosis de enzima permite modular el alcance de la lesión, de manera que podemos intentar equiparar la lesión a la media observada en humanos. En la Figura 29 se observan los valores obtenidos con los animales sometidos a estudio.



Figura 29. Volumen de lesión tras la HIP experimental. (A) Sección de cerebro indicando el área lesionada a las 24 horas y 7 días tras la HIP experimental; (B) Volumen de lesión ( $mm^3$ ) observado tras aplicar la fórmula 0,5 x A x B x C y (C) corregido por edema para representar el porcentaje de hemisferio afectado. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4 animales por grupo) \*p<0,05 respecto a la condición 24 horas.

Trabajos anteriores del grupo han demostrado que el volumen de lesión tras la hemorragia intracerebral se asocia con los mecanismos de muerte celular por apoptosis (Gómez-Sánchez et al., 2011; Rodríguez et al., 2017; Rodríguez et al., 2018). Esto está íntimamente ligado a la neovascularización y recuperación funcional (Rodríguez et al., 2017). Lo que hasta el momento se desconoce, es el papel de las quinasas ROCK en la fisiopatología de la hemorragia y su implicación en los fenómenos de daño/reparación cerebral. En concreto, nos interesa ROCK2, no sólo por su papel en el pronóstico funcional de pacientes con HIP, como hemos visto en el estudio clínico, sino por su implicación en los procesos de integridad dendrítica (Bobo-Jiménez et al., 2017). Además, ROCK2 es la isoforma más abundante en el SNC (Lu *et al.*, 2020), una observación que también hemos

realizado en nuestros animales mediante estudios de western blot con muestras de tejido cerebral de ratón (Figura 30).



*Figura 30. Expresión diferencial de isoformas ROCK en cerebro de ratón.* (*A*) Blot representativo del análisis de expresión de las proteínas ROCK1 y ROCK2 en hemisferio cerebral derecho (HDcho) e izquierdo (HIzqdo) de animales Sham, sin daño hemorrágico. Se utilizó GAPDH como control de carga.

Para analizar si los niveles de ROCK2 varían en cerebro después de la HIP, utilizamos ratones sometidos al modelo experimental. Tras cuantificar los resultados obtenidos, no observamos diferencias significativas entre ambos hemisferios, contralateral e ipsilateral, y tampoco pudimos evidenciar una acumulación de ROCK2 en el tiempo (Figura 31). Cabe mencionar que todos los animales estudiados presentaban un volumen de lesión similar, tanto a las 24 horas como a los 7 días (Figura 31). Sería interesante analizar en un futuro si los niveles de la proteína se correlacionan con el tamaño inicial de la lesión o bien si la modulación de los niveles de ROCK2 mediante inhibidores selectivos o experimentos de silenciamiento (*knockdown*) en neuronas protege frente al daño hemorrágico.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



*Figura 31. Expresión de ROCK2 tras la HIP.* (A) Blot representativo del análisis de expresión de ROCK2 en hemisferio contralateral (Contra) e ipsilateral (Ipsi) de animales tras las HIP. Se utilizó GAPDH como control de carga. La abundancia de ROCK2 se cuantificó en cada animal respecto al valor obtenido en el hemisferio contralateral. Se representan los valores obtenidos en 7 experimentos (con muestras procedentes de n=3 animales por grupo), así como los valores medios  $\pm$  SEM de cada condición.

### 3.2. La actividad de ROCK2 varía tras la hemorragia intraparenquimatosa

La activación de ROCK2 es deletérea para las células y contribuye a la retracción de las neuritas y al colapso axonal después de una lesión (Koch et al., 2014; Stern et al., 2021). Por otro lado, las quinasas ROCK son potenciales dianas de terapias vinculadas con ictus por su papel regulador de la contractilidad, la motilidad y la proliferación celular en células fundamentales para la fisiopatología de la isquemia cerebral (Rikitake et al., 2005; Shi et al., 2016b; Sladojevic et al., 2017). Sin embargo, todavía se desconoce el papel específico de ROCK2 y su intervención en fenómenos de daño tras la HIP.

Una de las dianas más conocidas de ROCK2 es la cadena ligera de la miosina (MLC) (Moreno-López *et al.* 2011), que se fosforila de manera directa o

indirectamente mediante la fosforilación inhibitoria de la miosina fosfatasa (MLCP). En concreto, ROCK2 fosforila la subunidad reguladora de esta enzima, conocida como MYPT-1 o MBS, porque es la subunidad de unión a miosina. Así, analizando la cantidad de MBS fosforilada (P-MBS) se puede inferir la actividad de la quinasa ROCK2 en cerebro (Bobo-Jiménez et al., 2017).

En la literatura se encuentran trabajos que simplemente correlacionan los niveles de P-MBS con la actividad de ROCK2. No obstante, nosotros consideramos que los niveles de MBS no fosforilado son importantes para determinar el cociente entre ambas proteínas y afinar aún más en la cuantificación (Bobo-Jiménez et al., 2017). Por este motivo, se realizaron experimentos de western blot para determinar tanto MBS (Figura 32) como P-MBS (Figura 33) en tejido.



**Figura 32. Expresión de MBS después de la HIP.** (A) Blot representativo del análisis de expresión de MBS en hemisferio contralateral (Contra) e ipsilateral (Ipsi) de animales tras las HIP. Se muestran dos exposiciones, baja (low) y alta (high). GAPDH se utiliza como control de carga. (B) La abundancia de MBS se cuantificó en cada animal respecto al valor obtenido en el hemisferio contralateral. Se representan los valores obtenidos en 7 experimentos (con muestras procedentes de n=3 animales por grupo), así como los valores medios ± SEM de cada condición.

Observamos un ligero descenso de MBS a las 24 horas, pero no es significativo. Tampoco a los 7 días tras la HIP vemos diferencias en los niveles de esta proteína (Figura 33). Sin embargo, a este tiempo sí se observa una disminución en la fosforilación, de modo que los niveles de P-MBS son inferiores en el hemisferio ipsilateral que en el contralateral (Figura 33).



**Figura 33. Expresión de P-MBS tras la HIP.** (A) Blot representativo del análisis de expresión de P-MBS en hemisferio contralateral (Contra) e ipsilateral (Ipsi) de animales tras las HIP. Se muestran dos exposiciones, baja (low) y alta (high). GAPDH se utiliza como control de carga. (B) La abundancia de P-MBS se cuantificó en cada animal respecto al valor obtenido en el hemisferio contralateral. Se representan los valores obtenidos en 7 experimentos (con muestras procedentes de n=3 animales por grupo), así como los valores medios ± SEM de cada condición.

Cuando calculamos el ratio entre la forma fosforilada (P-MBS) y la no fosforilada (MBS) los resultados no varían, si bien las diferencias se hacen más evidentes. La Figura 34 muestra un ligero aumento de la actividad de *ROCK2* a las 24 horas tras la HIP y un descenso significativo a los 7 días.


Figura 34. Actividad de ROCK2 tras la HIP. La actividad de ROCK2 se cuantificó en cada animal respecto al valor obtenido en el hemisferio contralateral. Se representan los valores obtenidos en 7 experimentos (con muestras procedentes de n=3 animales por grupo), así como los valores medios  $\pm$  SEM de cada condición. Se utilizó GAPDH como control de carga. \* p<0,05 respecto al hemisferio contralateral.

Resulta difícil sacar conclusiones sobre el papel de ROCK2 en el momento agudo. La dispersión de los datos observada podría deberse a variaciones interindividuales más sutiles en los procesos inflamatorios y a la heterogeneidad de células movilizadas tras el daño hemorrágico (Mracsko et al., 2014; Li et al., 2020). ROCK2 se expresa principalmente en neuronas, aunque su expresión también es evidente en otras células presentes en el SNC después del daño, como son las células endoteliales, las células musculares lisas vasculares, y la glía, aunque en menor medida (Lu et al. 2020). ROCK2 también se expresa en plaquetas y leucocitos que participan activamente en la fisiopatología de la enfermedad (Hammond *et al.*, 2012; Ziai et al., 2013). Por tanto, para analizar el papel de la proteína a nivel neuronal sería conveniente realizar estudios de marcaje específico, modulación de ROCK selectivamente en estas células o bien un análisis preliminar *in vitro* para cuantificar tanto nivel como actividad de la quinasa.

Por otro lado, la disminución en la actividad de ROCK2 observada a los 7 días tras el daño podría justificarse como una medida compensatoria del organismo para favorecer los fenómenos de reparación cerebral, algo inexplorado hasta el momento. La inhibición selectiva de ROCK2 será fundamental para descifrar el papel de esta quinasa en la HIP. Nuestro estudio sugiere que la ventana terapéutica para el uso de los inhibidores de ROCK2 debe ser minuciosamente estudiada. Esto puede dar cuenta de los resultados contradictorios recopilados en la literatura con ensayos que emplean inhibidores como fasudil o su derivado hidroxifasudil en el contexto de la isquemia cerebral o la prevención de vasoespasmo (Saito et al., 2015; Chan et al., 2017; Daou et al., 2019).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el control de la actividad de ROCK2 va a tener un efecto fundamental en el volumen de lesión y los fenómenos de reparación cerebral tras la HIP. Los resultados soportan una participación de ROCK2 en el balance entre el daño/reparación tras la hemorragia. Por un lado, ROCK2 podría afectar a la conformación del entramado vascular y los fenómenos de daño endotelial y muerte neuronal. Todo ello explicaría un mayor volumen de lesión y peor recuperación funcional tras el ictus. Por otro lado, podría estar afectando a los procesos de plasticidad cerebral después de la HIP, lo que condicionaría también la reparación cerebral. Los resultados recogidos en la presente memoria, por tanto, abren nuevas vías de investigación relacionadas con la quinasa ROCK2, que se posiciona como una posible diana terapéutica en HIP.

## CONCLUSIONES

A la vista de los resultados descritos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos concluir:

1. Los polimorfismos del gen Rock2 *rs978906*, que regula los niveles de expresión de la proteína, y *Thr431Asn*, que determina la actividad de la quinasa, condicionan el volumen de hemorragia y el pronóstico funcional de pacientes de HIP. Estos polimorfismos de *Rock2* son responsables, al menos en parte, de la variabilidad interindividual asociada a esta neuropatología.

2. Las variantes polimórficas de ROCK2 que se asocian a un menor volumen de lesión y mejor pronóstico funcional tras la HIP son aquellas relacionadas con menor nivel de expresión de la proteína y menor actividad de la quinasa, lo que posiciona a ROCK2 como una nueva diana molecular implicada en la fisiopatología de la HIP.

3. Los polimorfismos de ROCK2 asociados con un mejor pronóstico funcional están, además, asociados con mayores niveles séricos de factores de crecimiento y citoquinas en los pacientes de HIP. Teniendo en cuenta la función esencial de estos factores en procesos de reparación cerebral, la modulación de los niveles y/o actividad de ROCK2 podría ser esencial en la activación de mecanismos de reparación cerebral tras la hemorragia. La disminución de la actividad de ROCK2 a los 7 días tras la hemorragia experimental apoya la posible importancia de la inactivación de ROCK2 en la reparación cerebral tras la hemorragia.

4. El ligero incremento de la actividad de ROCK2 que observamos inmediatamente tras la hemorragia experimental podría tener importancia fisopatológica y estar implicada en daño celular hemorrágico. De hecho, los pacientes que portan los genotipos *AA rs978906* y *CC Thr431Asn*, con mayores niveles y actividad de ROCK2, respectivamente, presentan mayor volumen de lesión basal, lo que indica mayor daño cerebral tras la HIP.

99

### **CONCLUSIÓN FINAL**

Nuestros resultados demuestran que el pronóstico funcional de los pacientes que han sufrido una HIP está condicionado por los polimorfismos *rs978906* y *Thr431Asn* del gen *Rock2*. Así, las variantes polimórficas que determinan una menor cantidad y actividad de ROCK2 están asociadas con un menor volumen de lesión y mejor pronóstico tras la HIP. Por tanto, hemos identificado nuevos biomarcadores genéticos con valor pronóstico en la HIP. Es más, la modulación de los niveles y/o actividad de ROCK2 podría desempeñar un importante papel en el equilibrio entre mecanismos de daño y reparación cerebrales tras la hemorragia, lo que finalmente condiciona la recuperación funcional de los pacientes. El presente trabajo abre nuevas vías de investigación sobre la función de ROCK2 en la HIP y posiciona a la quinasa como una posible diana molecular a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas terapias en la HIP.

Almeida A Genetic determinants of neuronal vulnerability to apoptosis. Cellular and Molecular Life Sciences. 2013, 70: 71–88.

Álvarez-Santos MD, Álvarez-González M, Estrada-Soto S, Bazán-Perkins B. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. Front Physiol. 2020, 11:701.

Amenta JS, Brocher SC. Mechanisms of protein turnover in cultured cells. Life Sci. 1981, 28(11):1195-208

An SJ, Kim TJ, Yoon BW. Epidemiology, Risk Factors, and Clinical Features of Intracerebral Hemorrhage: An Update. J Stroke. 2017, 19(1):3-10.

Andrews CM, Jauch EC, Hemphill JC 3rd, et al. Emergency neurological life support: intracerebral hemorrhage. Neurocrit Care .2012, 17(suppl 1):S37–S46.

Aronowski J, Zhao X. Molecular pathophysiology of cerebral hemorrhage: secondary brain injury. Stroke. 2011, 42(6):1781-6.

Babu R, Bagley JH, Di C, Friedman AH, Adamson C. Thrombin and hemin as central factors in the mechanisms of intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury and as potential targets for intervention. Neurosurg Focus. 2012, 32:E8.

Bai Q, Liu J, Wang G. Ferroptosis, a Regulated Neuronal Cell Death Type After Intracerebral Hemorrhage. Front Cell Neurosci. 2020, 14:591874.

Banks JL, Marotta CA. Outcomes validity and reliability of the modified Rankin scale: implications for stroke clinical trials: a literature review and synthesis. Stroke. 2007, 38(3):1091-6.

Bao L, Zu J, He Q, Zhao H, Zhou S, *et al.* Thrombin induced apoptosis in neurons through activation of c-jun-n-terminal kinase. Toxicol. Mech. Methods. 2016, 27(1),1-6.

Bartnikas TB, Steinbicker AU, Enns CA. Insights into basic science: what basic science can teach us about iron homeostasis in trauma patients. Curr Opin Anaesthesiol. 2020, 33(2):240-245.

Bhasin RR, Xi G, Hua Y, Keep RF, Hoff JT: Experimental intracerebral hemorrhage: effect of lysed erythrocytes on brain edema and blood-brain barrier permeability. Acta Neurochir Suppl. 2002, 81:249–251.

Bobinger T, Burkardt P, B Huttner H, Manaenko A. Programmed Cell Death after Intracerebral Hemorrhage. Curr Neuropharmacol. 2018, 16(9):1267-1281.

Bobo-Jiménez V, Delgado-Esteban M, Angibaud J, Sánchez-Morán I, de la Fuente, A *et al.* APC/CCdh1-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017, 114(17):4513-4518.

Bohmann FO, Seiler A, Gelhard S, Stolz L, Brill B, *et al.* Blood Pressure Lowering Decreases Intracerebral Hemorrhage Volume and Improves Behavioral Outcomes in Experimental Animals. J Stroke. 2020, 2(3):416-418.

Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. Stroke. 1993, 24(7):987–93.

Brouwers HB, Goldstein JN, Romero JM, Rosand J. Clinical applications of the computed tomography angiography spot sign in acute intracerebral hemorrhage: a review. Stroke. 2012, 43(12):3427-3432.

Caceres JA, Goldstein JN. Intracranial hemorrhage. Emerg Med Clin North Am. 2012, 30(3):771-94.

Castillo J, Dávalos A, Alvarez-Sabín J, Pumar JM, Leira R, *et al.* Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. Neurology, 2002, 58(4), 624-629.

Chambergo-Michilot D, Brañez-Condorena A, Alva-Diaz C, Sequeiros J, Abanto C, *et al.* Evidence-based appraisal of blood pressure reduction in spontaneous intracerebral hemorrhage: A scoping review and overview. Clin Neurol Neurosurg. 2021, 18;202:106497.

Chan S-L y Cipolla MJ. Treatment with low dose fasudil for acute ischemic stroke in chronic hypertension. J Cereb Blood Flow Metab. 2017, 37(9):3262-3270.

Charidimou A, Boulouis G, Gurol ME, Ayata C, Bacskai BJ, *et al.* Emerging concepts in sporadic cerebral amyloid angiopathy. Brain. 2017, 1;140(7):1829-1850.

Chen A, Xiong LJ, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. Biomed Rep. 2013, 1(2):167-176.

Chen S, Zeng L, Hu Z: Progressing haemorrhagic stroke: categories, causes, mechanisms and managements. J Neurol 2014, 261: 2061–2078.

Chen X, Wang H, Yu W, Chen F, Wang G, *et al.* IDH1 Associated with Neuronal Apoptosis in Adult Rats Brain Following Intracerebral Hemorrhage. Cell Mol Neurobiol. 2017, 37(5):831-841.

Chen ZY, Yao WJ. [Role of Rho/ROCK in the migration of vascular smooth muscle cells]. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan. 2013, 44(4): 269–74.

Chuang HH, Liang SW, Chang ZF, Lee HH. Ser1333 phosphorylation indicates ROCKI activation. J Biomed Sci. 2013, 29;20(1):83.

Chuang HH, Yang CH, Tsay YG, Hsu CY, Tseng LM, *et al.* ROCKII Ser1366 phosphorylation reflects the activation status. Biochem J. 2012, 1;443(1):145-51.

Clark W, Gunion-Rinker L, Lessov N, Hazel K. Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice. Stroke. 1998, 29(10):2136-40.

Cordonnier C, Demchuk A, Ziai W, Anderson CS. Intracerebral haemorrhage: current approaches to acute management. Lancet. 2018, 392(10154):1257-1268.

Cusack TJ, Carhuapoma JR, Ziai WC. Update on the Treatment of Spontaneous Intraparenchymal Hemorrhage: Medical and Interventional Management. Curr Treat Options Neurol. 2018, 3;20(1):1.

Daou BJ, Koduri S, Thompson BG, Chaudhary N, Pandey AS. Clinical and experimental aspects of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. CNS Neurosci Ther. 2019, 25(10):1096-1112.

Davis SM, Broderick J, Hennerici M, Brun NC, Diringer MN, *et al.* Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. Neurology. 2006, 66(8):1175–81.

De Oliveira Manoel AL. Surgery for spontaneous intracerebral hemorrhage. Crit Care. 2020, 7;24(1):45.

De Silva TM, Kinzenbaw DA, Modrick ML, Reinhardt LD, Faraci FM. Heterogeneous Impact of ROCK2 on Carotid and Cerebrovascular Function. Hypertension. 2016, 68(3):809-17.

Demchuk AM, Dowlatshahi D, Rodriguez-Luna D, Molina CA, Blas YS, *et al*; PREDICT/Sunnybrook ICH CTA study group. Prediction of haematoma growth and outcome in patients with intracerebral haemorrhage using the CT-angiography spot sign (PREDICT): a prospective observational study. Lancet Neurol. 2012, 11(4):307-14.

Devan WJ, Falcone GJ, Anderson CD, Jagiella JM, Schmidt H, *et al*; International Stroke Genetics Consortium. Heritability estimates identify a substantial genetic contribution to risk and outcome of intracerebral hemorrhage. Stroke. 2013, 44(6):1578-83.

Dumor K, Shoemaker-Moyle M, Nistala R, Whaley-Connell A. Arterial Stiffness in Hypertension: an Update. Curr Hypertens Rep. 2018, 4;20(8):72.

Eto M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. J Biol Chem. 2009, 284(51):35273-7.

Fann DY, Santro T, Manzanero S, Widiapradja A, Cheng YL, *et al.* Intermittent fasting attenuates inflammasome activity in ischemic stroke. Exp Neurol. 2014, 257:114-9.

Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, Narayana P, *et al.* Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the "black hole" model of hemorrhagic damage. Ann Neurol. 2002, 51(4):517-24.

Feng L, Chen Y, Ding R, Fu Z, Yang S, *et al.* P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and brain injury in a rat model of intracerebral

hemorrhage: involvement of peroxynitrite. J Neuroinflammation. 2015, 17;12:190.

Feng S, Zou L, Wang H, He R, Liu K, *et al.* RhoA/ROCK-2 Pathway Inhibition and Tight Junction Protein Upregulation by Catalpol Suppresses Lipopolysaccaride-Induced Disruption of Blood-Brain Barrier Permeability. Molecules. 2018, 17;23(9):2371.

Feng Y, Yin Y, Weiser A, Griffin E, Cameron MD, *et al.* Discovery of substituted 4-(pyrazol-4-yl)-phenylbenzodioxane-2-carboxamides as potent and highly selective Rho kinase (ROCK-II) inhibitors. J Med Chem. 2008, 13;51(21):6642-5.

Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. Cell Microbiol. 2006, 8(11):1812-25.

Frontera JA, Lewin JJ 3rd, Rabinstein AA, Aisiku IP, Alexandrov AW, *et al.* Guideline for Reversal of Antithrombotics in Intracranial Hemorrhage: A Statement for Healthcare Professionals from the Neurocritical Care Society and Society of Critical Care Medicine. Neurocrit Care. 2016, 24(1):6-46.

Fu Z, Chen Y, Qin F, Yang S, Deng X, *et al.* Increased activity of Rho kinase contributes to hemoglobin-induced early disruption of the blood-brain barrier in vivo after the occurrence of intracerebral hemorrhage. Int J Clin Exp Pathol. 2014, 7(11):7844-53.

Fujii M, Duris K, Altay O, Soejima Y, Sherchan P, *et al.* Inhibition of Rho kinase by hydroxyfasudil attenuates brain edema after subarachnoid hemorrhage in rats. Neurochem Int. 2012, 60(3):327–33.

Gentry EG, Henderson BW, Arrant AE, Gearing M, Feng Y, *et al.* Rho Kinase Inhibition as a Therapeutic for Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. J Neurosci. 2016, 36(4):1316–23.

Glaumann H, Ericsson JL, Marzella L. Mechanisms of intralysosomal degradation with special reference to autophagocytosis and heterophagocytosis of cell organelles. Int Rev Cytol. 1981, 73:149-82.

Gomez-Sanchez JC, Delgado-Esteban M, Rodriguez-Hernandez I, Sobrino T, Perez de la Ossa N, *et al.* The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. J Exp Med. 2011, 14;208(3):429-37.

Gong C, Hoff JT, Keep RF. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. Brain Res. 2000, 14;871(1):57-65.

González-Forero D, Montero F, García-Morales V, Domínguez G, Gómez-Pérez L, *et al.* Endogenous Rho-kinase signaling maintains synaptic strength by stabilizing the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles. J Neurosci. 2012, 32(1): 68–84.

González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochim Biophys Acta. 2008, 1778(3):729-56.

Graham DI, McIntosh TK, Maxwell WL, Nicoll JA. Recent advances in neurotrauma. J Neuropathol Exp Neurol 2000, 59:641-651.

Grammas P, Martinez JM. Targeting thrombin: an inflammatory neurotoxin in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 2014, 42(Suppl 4):S537–S544.

Greathouse KM, Boros BD, Deslauriers JF, Henderson BW, Curtis KA, *et al.* Distinct and complementary functions of rho kinase isoforms ROCK1 and ROCK2 in prefrontal cortex structural plasticity. Brain Struct Funct. 2018, 223(9):4227-4241.

Greenberg DA, Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. Cell Mol Life Sci. 2013, 70(10):1753-61.

Greenberg SM, Charidimou A. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: evolution of the Boston criteria. Stroke. 2018, 49(2):491-497.

Gross BA, Jankowitz BT, Friedlander RM. Cerebral Intraparenchymal Hemorrhage: A Review. JAMA. 2019, 2;321(13):1295-1303.

Gu H, Yu SP, Gutekunst CA, Gross RE, Wei L. Inhibition of the Rho signaling pathway improves neurite outgrowth and neuronal differentiation of mouse neural stem cells. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2013, 5(1):11–20.

Hammond MD, Ai Y, Sansing LH. Gr1+ Macrophages and Dendritic Cells Dominate the Inflammatory Infiltrate 12 Hours After Experimental Intracerebral Hemorrhage. Transl Stroke Res. 2012, 3(1):s125-s131.

Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. Front Pharmacol. 2015, 20;6:276.

Hasan Z, Palani K, Rahman M, Zhang S, Syk I, *et al.* Rho-kinase signaling regulates pulmonary infiltration of neutrophils in abdominal sepsis via attenuation of CXC chemokine formation and Mac-1 expression on neutrophils. Shock. 2012, 37(3):282–8.

He Y, Wan S, Hua Y, Keep RF, Xi G. Autophagy after experimental intracerebral hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab. 2008, 28(5):897-905.

Hemphill JC 3rd, Bonovich DC, Besmertis L, Manley GT, Johnston SC. The ICH score: a simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage. Stroke. 2001, 32(4):891-7.

Hemphill JC 3rd, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, *et al*; American Heart Association Stroke Council; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2015, 46(7):2032-60.

Henderson BW, Gentry EG, Rush T, Troncoso JC, Thambisetty M, *et al.* Rhoassociated protein kinase 1 (ROCK1) is increased in Alzheimer's disease and ROCK1 depletion reduces amyloid- $\beta$  levels in brain. J Neurochem. 2016, 138(4):525–31. Henderson BW, Greathouse KM, Ramdas R, Walker CK, Rao TC, *et al.* Pharmacologic inhibition of LIMK1 provides dendritic spine resilience against  $\beta$ amyloid. Sci Signal. 2019, 12(587):12.

Herskowitz JH, Feng Y, Mattheyses AL, Hales CM, Higginbotham LA, *et al.* Pharmacologic inhibition of ROCK2 suppresses amyloid-β production in an Alzheimer's disease mouse model. J Neurosci. 2013, 33(49):19086–98.

Herskowitz JH, Seyfried NT, Gearing M, Kahn RA, Peng J, *et al.* Rho kinase II phosphorylation of the lipoprotein receptor LR11/SORLA alters amyloid-beta production. J Biol Chem. 2011, 286(8): 6117–27.

Hoff JT, Xi G. Brain edema from intracerebral hemorrhage. Acta Neurochir Suppl. 2003, 86:11-5.

Hong KS, Bang OY, Kang DW, Yu KH, Bae HJ, *et al.* Stroke statistics in Korea: part I. Epidemiology and risk factors: a report from the korean stroke society and clinical research center for stroke. J Stroke. 2013, 15:2-20.

Hostettler IC, Seiffge DJ, Werring DJ. Intracerebral hemorrhage: an update on diagnosis and treatment. Expert Rev Neurother. 2019, 19(7):679-694.

Hu S, Xi G, Jin H, He Y, Keep RF, *et al.* Thrombin-induced autophagy: a potential role in intracerebral hemorrhage. Brain Res. 2011, 1424:60-6.

Hua Y, Keep RF, Hoff JT, *et al.* Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron. Stroke 2007, 38:759–762.

Hua Y, Wu J, Keep RF, Nakamura T, Hoff JT, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases in the brain after intracerebral hemorrhage and thrombin stimulation. Neurosurgery. 2006, 58(3):542-50; discussion 542-50.

Hung A, Singh S, Tait RC. A prospective randomized study to determine the optimal dose of intravenous vitamin K in reversal of over-warfarinization. Br J Haematol. 2000, 109:537–9

lizuka M, Kimura K, Wang S, Kato K, Amano M, *et al.* Distinct distribution and localization of Rho-kinase in mouse epithelial, muscle and neural tissues. Cell Struct Funct. 2012, 37(2):155-75.

Jagasia M, Lazaryan A, Bachier CR, Salhotra A, Weisdorf DJ, *et al.* ROCK2 Inhibition With Belumosudil (KD025) for the Treatment of Chronic Graft-Versus-Host Disease. J Clin Oncol. 2021, 39(17):1888-1898.

Jiang X, Andjelkovic AV, Zhu L, Yang T, Bennett MVL, *et al.* Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. Prog Neurobiol. 2018, 163-164:144-171.

Johann S, Heitzer M, Kanagaratnam M, Goswami A, Rizo T, *et al.* NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients. Glia. 2015, 63(12):2260-73.

Joly L. Arterial stiffness and cognitive function. Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil. 2017, 15(1):83-88.

Kanthasamy A, Anantharam V, Ali SF, Kanthasamy AG. Methamphetamine induces autophagy and apoptosis in a mesencephalic dopaminergic neuronal culture model: role of cathepsin-D in methamphetamine-induced apoptotic cell death. Ann N Y Acad Sci. 2006, 1074:234-44.

Katoh K, Kano Y, Amano M, Onishi H, Kaibuchi K, *et al.* Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. J Cell Biol. 2001, 153(3):569-84.

Kawabata S, Usukura J, Morone N, Ito M, Iwamatsu A, *et al.* Interaction of Rhokinase with myosin II at stress fibres. Genes Cells. 2004, 9(7):653-60.

Keep RF, Andjelkovic AV, Xiang J, Stamatovic SM, Antonetti DA, *et al.* Brain endothelial cell junctions after cerebral hemorrhage: Changes, mechanisms and therapeutic targets. J Cereb Blood Flow Metab. 2018, 8(8):1255-1275.

Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: mechanisms of injury and therapeutic targets. Lancet Neurol 2012, 11:720-731.

Kleinman JT, Hillis AE, Jordan LC. ABC/2: estimating intracerebral haemorrhage volume and total brain volume, and predicting outcome in children. Dev Med Child Neurol. 2011, 53(3):281-284.

Koch JC, Tönges L, Barski E, Michel U, Bähr M, *et al.* ROCK2 is a major regulator of axonal degeneration, neuronal death and axonal regeneration in the CNS. Cell Death Dis. 2014, 5(5):e1225.

Kong D, Xie B, Li Y, Xu Y. PEA prevented early BBB disruption after cerebral ischaemic/reperfusion (I/R) injury through regulation of ROCK/MLC signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2021, 20,566:164-169.

Kopitar-Jerala N. Innate Immune Response in Brain, NF-Kappa B Signaling and Cystatins. Front Mol Neurosci. 2015, 8:73.

Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, *et al.* The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. Stroke. 1996, 27(8):1304-5.

Koyama M, Ito M, Feng J, Seko T, Shiraki K, *et al.* Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase, by Rhokinase. FEBS Lett. 2000, 475(3):197-200.

Kwon MS, Woo SK, Kurland DB, Yoon SH, Palmer AF, *et al.* Methemoglobin is an endogenous toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage. Int J Mol Sci. 2015, 16(3):5028-46.

Lai AY, McLaurin J. Rho-associated protein kinases as therapeutic targets for both vascular and parenchymal pathologies in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2018, 44(5):659–68.

Langhorne P, Fearon P, Ronning OM, Kaste M, Palomaki H, et al. Stroke unit care benefits patients with intracerebral hemorrhage: systematic review and meta-analysis. Stroke. 2013, 44(11):3044–9.

Lee HH, Chang ZF. Regulation of RhoA-dependent ROCKII activation by Shp2. J Cell Biol. 2008, 181(6):999-1012.

Lee HH, Tien SC, Jou TS, Chang YC, Jhong JG, *et al.* Src-dependent phosphorylation of ROCK participates in regulation of focal adhesion dynamics. J Cell Sci. 2010, 123(Pt 19):3368-77.

Lee JH, Zheng Y, von Bornstadt D, Wei Y, Balcioglu A, *et al.* Selective ROCK2 Inhibition In Focal Cerebral Ischemia. Ann Clin Transl Neurol. 2014, 1(1):2–14.

Lei C, Wu B, Liu M, Tan G, Zeng Q. Pathogenesis and Subtype of Intracerebral Hemorrhage (ICH) and ICH Score Determines Prognosis. Curr Neurovasc Res. 2016, 13(3):244-8.

Lei C, Wu B, Liu M, Zhang S, Yuan R. Cerebral Amyloid Angiopathy-related Intracerebral Hemorrhage Score For Predicting Outcome. Curr Neurovasc Res. 2016, 13(2):156-62.

Leung T, Manser E, Tan L, Lim L. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. J Biol Chem. 1995, 270(49):29051-4.

Li Q, Zhang G, Huang YJ, Dong MX, Lv FJ, *et al.* Blend Sign on Computed Tomography: Novel and Reliable Predictor for Early Hematoma Growth in Patients With Intracerebral Hemorrhage. Stroke. 2015, 46(8):2119-23.

Li Q, Zhang G, Xiong X, Wang XC, Yang WS, *et al.* Black Hole Sign: Novel Imaging Marker That Predicts Hematoma Growth in Patients With Intracerebral Hemorrhage. Stroke. 2016, 47(7):1777-81.

Li X, Tong J, Liu J, Wang Y. Down-regulation of ROCK2 alleviates ethanolinduced cerebral nerve injury partly by the suppression of the NF-κB signaling pathway. Bioengineered. 2020, 11(1):779-790.

Liang Y, Jing X, Zeng Z, Bi W, Chen Y, *et al.* Rifampicin attenuates rotenoneinduced inflammation via suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia. Brain Res. 2015, 1622:43-50.

Liao YC, Liu PY, Lin HF, Lin WY, Liao JK, *et al.* Two functional polymorphisms of ROCK2 enhance arterial stiffening through inhibiting its activity and expression. J Mol Cell Cardiol. 2015, 79:180-6.

Lin S, Yin Q, Zhong Q, Lv FL, Zhou Y, *et al.* Heme activates TLR4-mediated inflammatory injury via MyD88/TRIF signaling pathway in intracerebral hemorrhage. J Neuroinflammation. 2012, 9:46.

Lin Y, Luo LL, Sun J, Gao W, Tian Y, *et al.* Relationship of Circulating CXCR4+ EPC with Prognosis of Mild Traumatic Brain Injury Patients. Aging Dis. 2017, 8(1):115-127.

Lowery DM, Clauser KR, Hjerrild M, Lim D, Alexander J, *et al.* Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. EMBO J. 2007, 26(9):2262-73.

Lu W, Wen J, Chen Z. Distinct Roles of ROCK1 and ROCK2 on the Cerebral Ischemia Injury and Subsequently Neurodegenerative Changes. Pharmacology. 2020, 105(1-2):3-8.

Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. Fluids Barriers CNS. 2012, 9(1):23.

Luo H, Wei L, Lu L, Kang L, Cao Y, *et al.* Transfusion of Resting Platelets Reduces Brain Hemorrhage After Intracerebral Hemorrhage and tPA-Induced Hemorrhage After Cerebral Ischemia. Front Neurosci. 2019, 13:338.

Lusardi TA, Wolf JA, Putt ME, Smith DH, Meaney DF. Effect of acute calcium influx after mechanical stretch injury in vitro on the viability of hippocampal neurons. J Neurotrauma 2004,21:61-72.

Ma R, Xie Q, Li H, Guo X, Wang J, *et al.* I-Borneol Exerted the Neuroprotective Effect by Promoting Angiogenesis Coupled With Neurogenesis via Ang1-VEGF-BDNF Pathway. Front Pharmacol. 2021, 12:641894.

Ma Z, Kanai M, Kawamura K, Kaibuchi K, Ye K, *et al.* Interaction between ROCK II and nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. Mol Cell Biol. 2006, 26(23):9016-34.

MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, Buist R, *et al.* Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. J Cereb Blood Flow Metab. 2008, 28(3):516-25.

Madangarli N, Bonsack F, Dasari R, Sukumari-Ramesh S. Intracerebral Hemorrhage: Blood Components and Neurotoxicity. Brain Sci. 2019, 9(11):316.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007, 8(9):741-52.

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, *et al.* Rhoassociated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. EMBO J. 1996, 15(9):2208-16.

Mayer SA. Ultra-early hemostatic therapy for intracerebral hemorrhage. Stroke. 2003, 34(1):224-9.

Mendelow AD, Gregson BA, Fernandes HM, Murray GD, Teasdale GM, *et al*, STICH investigators. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial. Lancet. 2005, 365(9457):387-97.

Mendelow AD, Gregson BA, Rowan EN, Murray GD, Gholkar A, *et al*; STICH II Investigators. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral haematomas (STICH II): a randomised trial. Lancet. 2013, 382(9890):397-408.

Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, *et al.* ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. Oxid Med Cell Longev. 2016, 2016:2183026.

Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, *et al.* Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. Circulation. 2010, 121(4):505-11.

Mohan S, Glushakov AV, Decurnou A, Narumiya S, Doré S. Contribution of PGE2 EP1 receptor in hemin-induced neurotoxicity. Front Mol Neurosci. 2013, 6:31.

Moreno-López B, Sunico CR, González-Forero D. NO orchestrates the loss of synaptic boutons from adult "sick" motoneurons: modeling a molecular mechanism. Mol Neurobiol. 2011, 43(1): 41–66.

Moskal N, Riccio V, Bashkurov M, Taddese R, Datti A, *et al.* ROCK inhibitors upregulate the neuroprotective Parkin-mediated mitophagy pathway. Nat Commun. 2020, 11(1):88.

Moxon-Emre I, Schlichter LC. Neutrophil depletion reduces blood-brain barrier breakdown, axon injury, and inflammation after intracerebral hemorrhage. J Neuropathol Exp Neurol. 2011, 70(3):218-35.

Mracsko E, Veltkamp R. Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage. Front Cell Neurosci. 2014, 20(8):388.

Mulherkar S, Firozi K, Huang W, Uddin MD, Grill RJ, et al. RhoA-ROCK Inhibition Reverses Synaptic Remodeling and Motor and Cognitive Deficits Caused by Traumatic Brain Injury. Sci Rep. 2017, 7(1):10689.

Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. Nat Rev Drug Discov. 2005, 4(5): 387–98.

Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. Annu Rev Immunol. 2005, 23:853-75.

Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, *et al.* ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. FEBS Lett. 1996, 392(2):189-93.

Nakashima K., Yamashita K, Uesugi S, Ito H. Temporal and spatial profile of apoptotic cell death in transient intracerebral mass lesion of the rat. J. Neurotrauma. 1999, 16(2),143-151.

Nelson JC, Stavoe AK, Colón-Ramos DA. The actin cytoskeleton in presynaptic assembly. Cell Adhes Migr. 2013, 7(4):379–87.

Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ: Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNFalpha. J Neurochem 2007, 102:900–912.

Noma K, Rikitake Y, Oyama N, Yan G, Alcaide P, *et al.* ROCK1 mediates leukocyte recruitment and neointima formation following vascular injury. J Clin Invest. 2008, 118(5):1632-44.

O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, *et al.* INTERSTROKE investigators. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. Lancet. 2010, 376(9735):112-23.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, *et al.* Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif. 2012, 45(6):487-98.

Pan Y, Chen XY, Zhang QY, Kong LD. Microglial NLRP3 inflammasome activation mediates IL-1 $\beta$ -related inflammation in prefrontal cortex of depressive rats. Brain Behav Immun. 2014, 41:90-100.

Pandey P, Mohammad G, Singh Y, Pasha MA. Polymorphisms and haplotype of ROCK2 associate with high altitude essential hypertension in native high altitude Ladakhi Indian population: a preliminary study. Clin Exp Hypertens. 2016, 38(2):238-44.

Piazzolla D, Meissl K, Kucerova L, Rubiolo C, Baccarini M. Raf-1 sets the threshold of Fas sensitivity by modulating Rok-alpha signaling. J Cell Biol. 2005, 171(6): 1013–22.

Pías-Peleteiro J, Campos F, Perez-Mato M, Lopez-Arias E, Rodriguez-Yanez M, *et al.* Endothelial Progenitor Cells as a Therapeutic Approach for Intracerebral Hemorrhage. Curr Pharm Des. 2017, 23(15):2238-2251.

Pías-Peleteiro J, Campos F, Castillo J, Sobrino T. Endothelial progenitor cells as a therapeutic option in intracerebral hemorrhage. Neural Regen Res. 2017, 12(4):558-561.

Poon MT, Fonville AF, Al-Shahi Salman R. Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014, 85(6):660-7.

Qing WG, Dong YQ, Ping TQ, Lai LG, Fang LD, *et al.* Brain edema after intracerebral hemorrhage in rats: the role of iron overload and aquaporin 4. J Neurosurg 2009, 110:462–468.

Quintana-Cabrera R, Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, Escobar J, Sastre J, *et al.* γ-Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. Nat Commun. 2012, 3:718.

Qureshi AI, Ali Z, Suri MF, Shuaib A, Baker G, *et al.* Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. Crit Care Med 2003, 31:1482-1489.

Qureshi AI, Ling GS, Khan J, Suri MF, Miskolczi L, *et al.* Quantitative analysis of injured, necrotic, and apoptotic cells in a new experimental model of intracerebral hemorrhage. Crit. Care Med. 2001, 29(1),152-157.

Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage. Lancet 2009, 373:1632-1644.

Qureshi AI, Palesch YY, Barsan WG, Hanley DF, Hsu CY, *et al*; ATACH-2 Trial Investigators and the Neurological Emergency Treatment Trials Network. Intensive Blood-Pressure Lowering in Patients with Acute Cerebral Hemorrhage. N Engl J Med. 2016, 375(11):1033-43.

Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, Kim SH, Ali Z, *et al.* Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. Neurosurgery. 2003, 52(5),1041-1047.

Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, *et al.* Spontaneous intracerebral hemorrhage. N Engl J Med 2001, 344:1450-1460.

Rankinen T, Church T, Rice T, Markward N, Blair SN, *et al.* A major haplotype block at the rho-associated kinase 2 locus is associated with a lower risk of hypertension in a recessive manner: the HYPGENE study. Hypertens Res. 2008, 31(8):1651-1657.

Ricker E, Chinenov Y, Pannellini T, Flores-Castro D, Ye C, *et al.* Serinethreonine kinase ROCK2 regulates germinal center B cell positioning and cholesterol biosynthesis. J Clin Invest. 2020, 130(7):3654-3670.

Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, Seto M, Yano K, *et al.* Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. Stroke. 2005, 36(10): 2251–7.

Rodrigues MA, Samarasekera N, Lerpiniere C, Humphreys C, McCarron MO, White PM, Nicoll JAR, Sudlow CLM, Cordonnier C, Wardlaw JM, Smith C, Al-Shahi Salman R. The Edinburgh CT and genetic diagnostic criteria for lobar intracerebral haemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy: model development and diagnostic test accuracy study. Lancet Neurol. 2018, 17(3):232-240.

Rodríguez C, Ramos-Araque ME, Domínguez-Martínez M, Sobrino T, Sánchez-Morán I, *et al.* Single-Nucleotide Polymorphism 309T>G in the MDM2 Promoter Determines Functional Outcome After Stroke. Stroke. 2018, 49(10):2437-2444.

Rodríguez C, Sobrino T, Agulla J, Bobo-Jiménez V, Ramos-Araque ME, *et al.* Neovascularization and functional recovery after intracerebral hemorrhage is conditioned by the Tp53 Arg72Pro single-nucleotide polymorphism. Cell Death Differ. 2017, 24(1):144-154.

Rodriguez-Luna D, Rodriguez-Villatoro N, Juega JM, Boned S, Muchada M, *et al.* Prehospital Systolic Blood Pressure Is Related to Intracerebral Hemorrhage Volume on Admission. Stroke. 2018;49(1):204-206.

Rodríguez-Yáñez M, Dávalos A, Castillo J. Natural history of perihematomal brain edema. En: Carhuapoma JR, Mayer SA, Hanley DF. Intracerebral Hemorrhage. Cambridge: Cambridge University Press. 2009, p.229–37.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, *et al.* American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2011, 123(4):e18-e209.

Rosand J, Hylek EM, O'Donnell HC, Greenberg SM. Warfarin-associated hemorrhage and cerebral amyloid angiopathy: a genetic and pathologic study. Neurology 2000, 55:947-951.

Ryu JK, Petersen MA, Murray SG, Baeten KM, Meyer-Franke A, *et al.* Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. Nat Commun. 2015, 6:8164.

Safar ME. Arterial stiffness as a risk factor for clinical hypertension. Nat Rev Cardiol. 2018, 15(2):97-105.

Saito A, Inoue M, Kon H, Imaruoka S, Basaki K, *et al.* Effectiveness of intraarterial administration of fasudil hydrochloride for preventing symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Acta Neurochir Suppl. 2015, 120:297-301.

Sayers, T.J. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60(8),1173-1180.

Schirmer MD, Donahue KL, Nardin MJ, Dalca AV, Giese AK, *et al.* MRI-GENIE and GISCOME Investigators and the International Stroke Genetics Consortium. Brain Volume: An Important Determinant of Functional Outcome After Acute Ischemic Stroke. Mayo Clin Proc. 2020, 95(5):955-965

Schober A, Weber C. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. Antioxid Redox Signal. 2005, 7(9-10):1249-57.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. Cell. 2010, 140(6),821-832.

Seasholtz TM, Wessel J, Rao F, Rana BK, Khandrika S, *et al.* Rho kinase polymorphism influences blood pressure and systemic vascular resistance in human twins: role of heredity. Hypertension. 2006, 47(5):937-47.

Sharanek A, Burban A, Burbank M, Le Guevel R, Li R, *et al.* Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. Sci Rep. 2016, 6:24709.

Shi BZ, Meng XF, Yang JX, Hao XW, Cui T, *et al.* Effect of erythrocytes on brain water content and haem oxygenase-1 expression in rats with traumatic intracerebral haemorrhage. Acta Neurochir (Wien). 2012, 154:1081–1086; discussion 1086.

Shi J, Wu X, Surma M, Vemula S, Zhang L, *et al.* Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. Cell Death Dis. 2013, 4(2):e483.

Shi Y, Leak RK, Keep RF, Chen J. Translational Stroke Research on Blood-Brain Barrier Damage: Challenges, Perspectives, and Goals. Transl Stroke Res. 2016, 7(2):89-92.

Shi Y, Zhang L, Pu H, Mao L, Hu X, *et al.* Rapid endothelial cytoskeletal reorganization enables early blood-brain barrier disruption and long-term ischaemic reperfusion brain injury. Nat Commun. 2016, 7:10523.

Shimokawa H, Rashid M. Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. Trends Pharmacol Sci. 2007, 28(6):296-302.

Sin WC, Chen XQ, Leung T, Lim L. RhoA-binding kinase alpha translocation is facilitated by the collapse of the vimentin intermediate filament network. Mol Cell Biol. 1998, 18(11):6325-39.

Sladojevic N, Yu B, Liao JK. ROCK as a therapeutic target for ischemic stroke. Expert Rev Neurother. 2017, 17(12):1167–77.

Sloop GD, Roa JC, Delgado AG, Balart JT, Hines MO 3rd, *et al.* Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. A potential cause of false-positive staining. Arch Pathol Lab Med. 1999, 123(6):529-32.

Sobrino T, Arias S, Pérez-Mato M, Agulla J, Brea D, *et al.* Cd34+ progenitor cells likely are involved in the good functional recovery after intracerebral hemorrhage in humans. J Neurosci Res. 2011, 89(7):979-85.

Song X, Long D. Nrf2 and Ferroptosis: A New Research Direction for Neurodegenerative Diseases. Front Neurosci. 2020, 14:267.

Sreekrishnan A, Leasure AC, Shi FD, Hwang DY, Schindler JL, *et al.* Functional Improvement Among Intracerebral Hemorrhage (ICH) Survivors up to 12 Months Post-injury. Neurocrit Care. 2017, 27(3):326-333.

Steiner T, Al-Shahi Salman R, Beer R, Christensen H, Cordonnier C, *et al.* European Stroke Organisation. European Stroke Organisation (ESO) guidelines

for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. Int J Stroke. 2014, 9(7):840-55.

Steiner T, Kaste M, Forsting M, Mendelow D, Kwiecinski H, *et al.* Recommendations for the management of intracranial haemorrhage - part I: spontaneous intracerebral haemorrhage. The European Stroke Initiative Writing Committee and the Writing Committee for the EUSI Executive Committee. Cerebrovasc Dis 2006, 22:294-316.

Stern S, Hilton BJ, Burnside ER, Dupraz S, Handley EE, *et al.* RhoA drives actin compaction to restrict axon regeneration and astrocyte reactivity after CNS injury. Neuron. 2021, S0896-6273(21)00611-5.

Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. Cell. 2017, 171(2):273-285.

Swanger SA, Mattheyses AL, Gentry EG, Herskowitz JH. ROCK1 and ROCK2 inhibition alters dendritic spine morphology in hippocampal neurons. Cell Logist. 2016, 5(4):e1133266.

Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, Shen X. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. Int J Ophthalmol. 2011, 4(6):652–7.

Tanaka T, Nishimura D, Wu RC, Amano M, Iso T, *et al.* Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. J Biol Chem. 2006, 281(22):15320-9.

Taniguchi Y, Amazaki M, Furuyama T, Yamaguchi W, Takahara M, *et al.* Sema4D deficiency results in an increase in the number of oligodendrocytes in healthy and injured mouse brains. J Neurosci Res. 2009, 87(13):2833–41.

Taylor RA, Chang CF, Goods BA, Hammond MD, Mac Grory B, *et al.* TGF-β1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. J Clin Invest. 2017, 127(1):280-292.

Taylor RA, Sansing LH. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. Clin Dev Immunol. 2013, 2013:746068.

Teng W, Wang L, Xue W, Guan C. Activation of TLR4-mediated NFkappaB signaling in hemorrhagic brain in rats. Mediators Inflamm 2009, 2009:473276.

Thabet AM, Kottapally M, Hemphill JC. Management of intracerebral hemorrhage. En: Wijdicks EFM, Kramer AH, editores. Handbook of Clinical Neurology, Vol. 140 (3rd series). Elsevier. 2017. p. 177-194.

Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: principles and significance in health and disease. Biochim Biophys Acta. 2009, 1792(1):3-13.

Tong Y, Ding ZH, Zhan FX, Cai L, Yin X, *et al.* The NLRP3 inflammasome and stroke. Int J Clin Exp Med. 2015, 8(4):4787-94.

Tönges L, Koch JC, Bähr M, Lingor P. ROCKing Regeneration: Rho Kinase Inhibition as Molecular Target for Neurorestoration. Front Mol Neurosci. 2011, 4:39.

Toyoda K. Epidemiology and registry studies of stroke in Japan. J Stroke 2013, 15:21-26.

Van Rossum D, Hanisch UK. Microglia. Metab Brain Dis. 2004, 19:393–411.

Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. Ann N Y Acad Sci. 2008 Mar, 1123:134-45.

Veltkamp R, Purrucker J. Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. Curr Neurol Neurosci Rep. 2017, 17(10):80.

Wang G. The Pathogenesis of Edema and Secondary Insults after ICH. En: Chaudhary V. Intracerebral Hemorrhage. IntechOpen. 2014. p. 25-40.

Wang HG, Lu FM, Jin I, Udo H, Kandel ER, *et al.* Presynaptic and postsynaptic roles of NO, cGK, and RhoA in long-lasting potentiation and aggregation of synaptic proteins. Neuron. 2005, 45(3):389–403.

Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 2016, 388(10053):1459–544.

Wang J, Dore S. Inflammation after intracerebral hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab 2007, 27:894–908.

Wang J, Li H, Yao Y, Ren Y, Lin J, *et al.* β-Elemene Enhances GAP-43 Expression and Neurite Outgrowth by Inhibiting RhoA Kinase Activation in Rats with Spinal Cord Injury. Neuroscience. 2018, 383:12–21.

Wang K, Liu B, Ma J. Research progress in traumatic brain penumbra. Chin Med J (Engl). 2014, 127(10):1964-8.

Wang QM, Stalker TJ, Gong Y, Rikitake Y, Scalia R, *et al.* Inhibition of Rhokinase attenuates endothelial-leukocyte interaction during ischemia-reperfusion injury. Vasc Med. 2012, 17(6):379–85.

Wang X, Dong Y, Qi X, Huang C, Hou L. Cholesterol levels and risk of hemorrhagic stroke: a systematic review and meta-analysis. Stroke. 2013, 44(7):1833-9.

Weiss S, Frischknecht K, Greutert H, Payeli S, Steffel J, *et al.* Different migration of vascular smooth muscle cells from human coronary artery bypass vessels. Role of Rho/ROCK pathway. J Vasc Res. 2007, 44(2):149–56.

Wen W, Liu W, Yan J, Zhang M. Structure basis and unconventional lipid membrane binding properties of the PH-C1 tandem of rho kinases. J Biol Chem. 2008, 283(38):26263-73.

Weng X, Tan Y, Chu X, Wu XF, Liu R, *et al.* N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 (NMDAR1) aggravates secondary inflammatory damage induced by hemin-NLRP3 pathway after intracerebral hemorrhage. Chin J Traumatol. 2015, 18(5):254-8.

Wityk RJ, Pessin MS, Kaplan RF, Caplan LR. Serial assessment of acute stroke using the NIH Stroke Scale. Stroke. 1994, 25(2):362-5.

Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, Khoury JC, Szaflarski JP, *et al.* Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. Stroke. 2002, 33(5):1190-5.

Wu J, Hua Y, Keep RF, Nakamura T, Hoff JT, *et al.* Iron and iron-handling proteins in the brain after intracerebral hemorrhage. Stroke. 2003, 34(12):2964-9.

Wu J, Li J, Hu H, Liu P, Fang Y, *et al.* Rhokinase inhibitor, fasudil, prevents neuronal apoptosis via the Akt activation and PTEN inactivation in the ischemic penumbra of rat brain. Cell Mol Neurobiol. 2012, 32(7):1187–97.

Wu TY, Sharma G, Strbian D, Putaala J, Desmond PM, et al. Natural history of perihematomal edema and impact on outcome after intracerebral hemorrhage. Stroke. 2017, 48(4):873–9.

Xi G, Hua Y, Keep RF. Blood pressure lowering and acute perihematomal brain edema after intracerebral hemorrhage. Stroke. 2014, 45(5):1241-1242.

Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. Lancet Neurol. 2006, 5:53–63.

Xi G, Reiser G, Keep RF. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? J Neurochem. 2003, 84:3-9.

Xie Z, Su W, Liu S, Zhao G, Esser K, *et al.* Smooth-muscle BMAL1 participates in blood pressure circadian rhythm regulation. J Clin Invest. 2015, 125(1):324-36.

Yamamura A, Nayeem MJ, Sato M. The Rho kinase 2 (ROCK2)-specific inhibitor KD025 ameliorates the development of pulmonary arterial hypertension. Biochem Biophys Res Commun. 2021, 534:795-801.

Yan J, Pan Y, Zheng X, Zhu C, Zhang Y, *et al.* Comparative Study of ROCK1 and ROCK2 in Hippocampal Spine Formation and Synaptic Function. Neurosci Bull. 2019, 35(4):649-660.

Yan YY, Wang XM, Jiang Y, Chen H, He JT, et al. The role of Rho/Rho-kinase pathway and the neuroprotective effects of fasudil in chronic cerebral ischemia. Neural Regen Res. 2015, 10(9):1441–9.

Yang S, Chen Y, Deng X, Jiang W, Li B, *et al.* Hemoglobin-induced nitric oxide synthase overexpression and nitric oxide production contribute to blood-brain barrier disruption in the rat. J Mol Neurosci. 2013, 51(2):352-63.

Yang S, Zhao Y, Tian Y, Chen Y, Zhao X, *et al.* Common variants of ROCKs and the risk of hypertension, and stroke: Two case-control studies and a follow-up study in Chinese Han population. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2018, 1864(3):778-783.

Yang Y, Chen S, Zhang J. The updated role of oxidative stress in subarachnoid hemorrhage. Curr Drug Deliv 2017, 14:832–842.

Yang Z, Liu B, Zhong L, Shen H, Lin C, *et al.* Toll-like receptor-4-mediated autophagy contributes to microglial activation and inflammatory injury in mouse models of intracerebral haemorrhage. Neuropathol Appl Neurobiol. 2015, 41:e95–e106.

Yang Z, Zhong L, Xian R, Yuan B. MicroRNA-223 regulates inflammation an brain injury via feedback to NLRP3 inflammasome after intracerebral hemorrhage. Mol Immunol. 2015, 65(2):267-76.

Yiu ZZ, Warren RB. Novel Oral Therapies for Psoriasis and Psoriatic Arthritis. Am J Clin Dermatol. 2016, 17(3):191-200.

Yoneda A, Multhaupt HA, Couchman JR. The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. J Cell Biol. 2005, 170(3):443-53.

You S, Zhong C, Xu J, Han Q, Zhang X, *et al.* LDL-C/HDL-C ratio and risk of allcause mortality in patients with intracerebral hemorrhage. Neurol Res. 2016, 38(10):903-8.

Yu Z, Zheng J, Guo R, Ma L, You C, *et al.* Prognostic impact of leukocytosis in intracerebral hemorrhage: A PRISMA-compliant systematic review and metaanalysis. Medicine (Baltimore). 2019, 98(28):e16281.

Zhang L, Valdez JM, Zhang B, Wei L, Chang J, *et al.* ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency. PLoS One. 2011, 6(3):e18271.

Zhao H, Chen Y, Feng H. P2X7 Receptor-Associated Programmed Cell Death in the Pathophysiology of Hemorrhagic Stroke. Curr Neuropharmacol. 2018, 16(9):1282-1295.

Zhao X, Gu C, Yan C, Zhang X, Li Y, *et al.* Nalp3-inflammasome-related gene polymorphisms in patients with prehypertension and coronary atherosclerosis. Bio. Med Res. Int. 2016. 2016, 7395627.

Zhao X, Sun G, Zhang J. Strong R, Song W, Gonzales N, Grotta JC, Aronowski J: Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in microglia/ macrophages. Ann Neurol. 2007, 61:352–362.

Zheng H, Chen C, Zhang J, Hu Z. Mechanism and Therapy of Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage. Cerebrovasc Dis. 2016, 42(3-4):155-69.

Zhou Y, Wang Y, Wang J, Anne Stetler R, Yang QW. Inflammation in intracerebral hemorrhage: from mechanisms to clinical translation. Prog Neurobiol. 2014, 115:25-44.

Zhou Z, Meng Y, Asrar S, Todorovski Z, Jia Z. A critical role of Rho-kinase ROCK2 in the regulation of spine and synaptic function. Neuropharmacology. 2009, 56(1):81-9.

Ziai WC, Carhuapoma JR. Intracerebral Hemorrhage. Continuum (Minneap Minn). 2018, 24(6):1603-1622.

Ziai WC. Hematology and inflammatory signaling of intracerebral hemorrhage. Stroke. 2013, 44:S74–S78.