



Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla

**Fisiopatología de la HSA: alteraciones en la
funcionalidad vascular en un modelo animal
de HSA y cambios en las células
mononucleares de sangre periférica de
pacientes**

Gonzalo Revilla González

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla, 2.022**

Antonio Castellano Orozco, Catedrático de Universidad, adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla.

María del Carmen González Montelongo, Investigadora Senior del Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz-Hospital Universitario Puertal del Mar.

CERTIFICAN:

que el doctorando Gonzalo Revilla González, Graduado en Biomedicina Básica y Experimental con máster en Investigación Biomédica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Fisiopatología de la HSA: alteraciones en la funcionalidad vascular en un modelo animal de HSA y cambios en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes**”, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Y para que así conste, firman el presente documento en Sevilla a 2 de noviembre de 2.021.



Fdo: Antonio Castellano Orozco

Fdo: M^a del Carmen González Montelongo

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA ANEURISMÁTICA	1
1.1. Fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea aneurismática y el vasoespasmo	1
1.2. Incidencia, diagnóstico, tratamiento y pronóstico.....	2
2. MÚSCULO LISO ARTERIAL	5
2.1. Anatomía de la circulación cerebral arterial	5
2.2. Estructura e histología arterial y del músculo liso vascular	6
2.3. Mecanismos de regulación de la contracción	9
2.3.1. Contracción mediada por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$	10
2.3.1.1. Entrada de Ca^{2+} del medio extracelular.....	11
2.3.1.2. Reservorios intracelulares y mecanismos de extracción de Ca^{2+}	12
2.3.1.3. Liberación de Ca^{2+} por el RS	13
2.3.2. Contracción mediada por mecanismos de sensibilización a Ca^{2+}	15
2.3.2.1. Ruta de RhoA/ROCK.....	15
2.3.2.2. Ruta de PKC.....	16
3. CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs) EN LA HSA	18
3.1. Linaje hematopoyético.....	18
3.1.1. Diferenciación de las células sanguíneas	18
3.1.2. Histología y función de las subfamilias de células sanguíneas.....	19
3.2. Inflamación	20
3.2.1. Papel temporal de las PBMC en la inflamación	20
3.2.1. Relación entre inflamación, células mononucleares y HSA	22
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
1. MODELO ANIMAL.....	25
1.1. Anestesia, procedimiento quirúrgico y estabulación.	25
1.2. Sacrificio y obtención de muestras	26
2. MUESTRAS HUMANAS	26
2.1. Criterios de inclusión de pacientes y cronología de extracción.....	26
2.2. Aislamiento de muestras y criopreservación	27
3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS Y MICROFLUORIMÉTRICAS EN VSMC DISPERSAS DE MODELO ANIMAL DE HSA	28
3.1. Preparación de muestras y dispersión celular	28
3.2. Determinación del potencial de membrana en reposo (V_m) y de las corrientes dependientes de voltaje de Ca^{2+} y K^+ en células aisladas	28
3.3. Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en VSMC	29
4. EXPERIMENTOS FUNCIONALES EN ANILLOS ARTERIALES DE MODELO ANIMAL DE HSA ..	31
4.1. Preparación, montaje y normalización de muestras en miógrafo de cable.....	32
4.2. Abordaje experimental y farmacológico	33
5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE ARTERIAS BASILARES DE MODELO ANIMAL DE HSA	33
5.1. Sacrificio, perfusión y fijación del animal.....	33
5.2. Cortes histológicos y tinciones	34

5.2.1. Tinción tricrómica de Masson.....	34
5.3. Visualización microscópica de tejidos y análisis de los resultados.....	35
6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN ARTERIAS DE MODELO ANIMAL DE HSA Y EN MUESTRAS DE PACIENTES	35
6.1. Estudio de proteínas de tejido arterial murino mediante western blot.....	35
6.1.1. Obtención de extractos proteicos	35
6.1.2. Cuantificación proteica en extractos tisulares.....	36
6.1.3. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida (SDS-PAGE) y detección de proteína mediante western blot	36
6.2. Extracción de RNA total procedente de tejido arterial.....	37
6.3. Estudio de la expresión génica mediante microarray	37
7. CULTIVOS CELULARES	38
7.1. Procedimientos en cultivo de líneas celulares comerciales	38
7.1.1. Descongelación y mantenimiento de células HUVEC	38
7.1.2. Descongelación y mantenimiento de las células Jurkat y THP-1	39
7.1.3. Criopreservación de células	39
7.2. Experimentos de adhesión al endotelio	40
7.2.1. Adhesión de PBMCs procedentes de pacientes a células endoteliales.....	41
7.2.2. Adhesión de líneas celulares a HUVEC inducida por plasma de pacientes ..	41
8. INMUNOFENOTIPADO DE PBMCs POR CITOMETRÍA DE FLUJO	41
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
10. SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	43
RESULTADOS.....	45
CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LA RESPUESTA VASCULAR Y ALTERACIONES FISIOPATOLÓGICAS EN ARTERIAS DE MODELO ANIMAL DE HSA	46
1. CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE MIOCITOS DEL POLÍGONO DE WILLIS PROCEDENTES DEL MODELO ANIMAL DE HSA	46
1.1. Potencial de membrana en reposo	46
1.2. Estudio de corrientes dependientes de voltaje de Ca^{2+} y K^{+}	47
2. ESTUDIO DE LA $[Ca^{2+}]_i$ EN MIOCITOS AISLADOS EN MODELO ANIMAL DE HSA	52
2.1. Nivel de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la despolarización inducida mediante incrementos de $[K^{+}]_e$	53
2.2. Participación de los LTTC en la regulación del $[Ca^{2+}]_i$	56
2.2.1. Participación en la regulación del $[Ca^{2+}]_i$ basal	56
2.2.2. Participación en la despolarización inducida por incremento de $[K^{+}]_e$	57
3. ESTUDIO DE LA FUERZA ISOMÉTRICA EN ANILLOS ARTERIALES DEL MODELO ANIMAL DE HSA	58
3.1. Participación de $PKC\alpha$ en la contracción inducida por despolarización prolongada	59
3.2. Participación de RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada.....	62
3.3. Participación conjunta de $PKC\alpha$ y RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada.....	63
3.4. Participación de los LTCCs en la contracción inducida por despolarización prolongada.....	67
3.5. Relación entre los LTCCs y ruta de RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada.....	69
4. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE $PKC\alpha$ Y RHOA EN ARTERIAS CEREBRALES DE MODELO ANIMAL DE HSA	72

5. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE ANÁLISIS POR MICROARRAY DE ARTERIAS DE MODELO ANIMAL DE HSA	73
5.1. Análisis del perfil transcripcional de las arterias de modelo animal de HSA	74
5.2. Análisis de enriquecimiento de genes en arterias de modelo animal de HSA....	77
5.2.1. Enriquecimiento o empobrecimiento de genes implicados en la dinámica de Ca^{2+}	78
5.2.2. Empobrecimiento de genes implicados en la dinámica de K^+	81
5.2.3. Análisis global de GSEA en muestras de modelo animal de HSA.....	84
6. CURSO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS DE LA ARTERIA BASILAR EN MODELO ANIMAL DE HSA.....	87
CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE LAS PBMCs PROCEDENTES DE PACIENTES CON AHSA.....	91
1. ESTUDIO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES DE AHSA.....	91
1.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes y controles	91
2. INTERACCIÓN DE PBMCs-ENDOTELIO.....	93
2.1. Estudio de la adhesión in vitro de PBMCs en condición basal sobre células HUVEC	93
2.2. Efecto del plasma procedente de pacientes sobre la adhesión al endotelio	100
3. INMUNOFENOTIPADO DE PBMCs.....	101
3.1. Caracterización inmunofenotípica de PBMCs aisladas en estado basal.....	104
3.2. Caracterización inmunofenotípica de PBMCs adheridos al endotelio	114
DISCUSIÓN.....	124
1. ALTERACIONES DE LAS DINÁMICAS IÓNICAS EN EL FENÓMENO DE VASOESPASMO SECUNDARIO A HSA.....	125
2. PARTICIPACIÓN DE LAS RUTAS DE PKC Y RHOA/ROCK EN EL VASOESPASMO SECUNDARIO A HSA.....	131
3. CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN ARTERIAS TRAS LA HSA.....	133
4. CAMBIOS EN LAS PBMCs TRAS LA AHSA. POSIBLES IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS	134
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	141
ANEXO I: TABLAS DE LOS 20 GENE SETS MÁS ENRIQUECIDOS Y MÁS EMPOBRECIDOS EN LAS SIGUIENTES COMPARACIONES SEGÚN LAS LIBRERÍAS MOLECULAR FUNCTION Y KEGG.	156

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Esquema representativo del entorno subyacente a la HSA.....	1
Figura 2. Representación de las técnicas de clipaje y “coiling”.....	4
Figura 3. Detalle anatómico de la circulación arterial en la base del cráneo..	6
Figura 4. Representación histológica de una sección transversal de una arteria muscular..	7
Figura 5. Modelo de contracción de la VSMC.....	9
Figura 6. Mecanismo de contracción mediado por aumento de $[Ca^{2+}]_i$	10
Figura 7. Mecanismos de movilización del Ca^{2+}	14
Figura 8. Ruta de RhoA/ROCK.....	16
Figura 9. Sensibilización a Ca^{2+} mediada por las rutas de RhoA/ROCK y PKC.....	17
Figura 10. Proceso de hematopoyesis y generación de las diferentes estirpes de células sanguíneas.....	19
Figura 11. Proceso de adhesión, transmigración y actuación de leucocitos circulantes tras la liberación de sangre debido a la rotura de un aneurisma.....	23

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 12. Detalle de la disposición de la rata durante la intervención quirúrgica para la inducción de la HSA.....	26
Figura 13. Espectros de excitación y emisión del Fura-2AM.....	30
Figura 14. Camino óptico de la excitación y emisión.....	31
Figura 15. Cámara del miógrafo Mulvany-Halpern 610M.....	32
Figura 16. Detalle representativo de las referencias anatómicas de los cortes histológicos.....	34
Figura 17. Esquema del protocolo del ensayo de adhesión Cytoselect™ Leukocyte-Endothelium.....	41

RESULTADOS

Figura 18. Potencial de membrana en reposo de miocitos aislados procedentes de arterias del polígono de Willis.....	47
Figura 19. Caracterización de las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de miocitos aislados de las arterias del polígono de Willis.....	50
Figura 20. Caracterización de las corrientes de K^+ dependientes de voltaje de miocitos aislados de las arterias del polígono de Willis.....	51
Figura 21. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de miocitos aislados del polígono de Willis en respuesta a despolarizaciones inducidas por K^+	54
Figura 22. Niveles de $[Ca^{2+}]_i$ basal en respuesta a 30K.....	55
Figura 23. Efecto de la Nifedipina (0,5 μ M) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en miocitos aislados.....	56

Figura 24. Efecto de la Nifedipina (0,5 μ M) sobre la despolarización inducida por 30K en miocitos aislados.....	57
Figura 25. Registros representativos de estudios de miografía..	59
Figura 26. Efecto de GFX (0,5 μ M) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar.	60
Figura 27. Efecto de GFX (0,5 μ M) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar..	61
Figura 28. Efecto de Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar..	63
Figura 29. Efecto de Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar..	63
Figura 30. Efecto combinado de GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar.	65
Figura 31. Efecto combinado de GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar..	65
Figura 32. Efectos vasorrelajantes tras la administración separada y conjunta de GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M)..	66
Figura 33. Efecto de Nifedipina (2,5 nM) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar.....	68
Figura 34. Efecto de Nifedipina (2,5 nM) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar.....	69
Figura 35. Efecto combinado de Nifedipina (2,5 nM) y Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar.	70
Figura 36. Efecto combinado de Nifedipina (2,5 nM) y Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar.	71
Figura 37. Expresión de PKC α y RhoA analizada mediante western blot.....	73
Figura 38. Análisis de componentes principales de muestras de microarray.....	74
Figura 39. Análisis de microarray de los genes sobreexpresados e infraexpresados en comparaciones de grupos Control, Sham7d y HSA7d.	76
Figura 40. Cambios en el patrón de expresión de genes implicados en la dinámica del Ca ²⁺	80
Figura 41. Empobrecimiento en la expresión de genes relacionados con la dinámica de K ⁺	83
Figura 42. Enriquecimiento de genes implicados en la activación de la respuesta inmune.	85
Figura 43. Enriquecimiento de procesos relacionados con daño y reparación del ADN.	86
Figura 44. Remodelado vascular tras la HSA	89
Figura 45. Adhesión de PBCMs en condiciones basales sobre células HUVEC.....	94
Figura 46. Correlación de la adhesión de PBMCs de pacientes a las 24 horas con las diferentes escalas de valoración de la aHSA.....	95

Figura 47. Correlación de la adhesión de PBMCs de pacientes a los 5 días con las diferentes escalas de valoración de la aHSA.....	97
Figura 48. Análisis estadístico de la adhesión de PBMCs de pacientes a las 24 horas en función de las diferentes categorías de vasoespasmo.....	98
Figura 49. Análisis estadístico de la adhesión de PBMCs de pacientes a los 5 días en función de las diferentes categorías de vasoespasmo.....	99
Figura 50. Efecto del plasma sobre las células HUVEC en el proceso de adhesión...	101
Figura 51. Estrategia y jerarquía de gates para el inmunofenotipado de PBMCs.....	103
Figura 52. Cuantificación y análisis estadístico de linfocitos y monocitos procedentes de muestras de PBMCs de controles y pacientes en estado basal.....	105
Figura 53. Jerarquía de gates representativos mediante citometría de flujo.....	106
Figura 54. Correlación entre el descenso de monocitos no clásicos de pacientes a las 24 horas con respecto al riesgo de vasoespasmo de los pacientes según la escala Fisher modificada.....	107
Figura 55. Análisis de correlación entre el porcentaje de monocitos y la adhesión sobre células HUVEC sin estimular.....	109
Figura 56. Análisis estadístico entre el porcentaje de monocitos en función a las categorías de vasoespasmo.....	110
Figura 57. Expresión de moléculas de superficie relacionadas con adhesión en subpoblaciones linfocitarias y monocitarias.....	112
Figura 58. Análisis de correlaciones de la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a 24h.....	113
Figura 59. Cuantificación y análisis estadístico de linfocitos y monocitos procedentes de muestras de PBMCs de controles y pacientes adheridos.....	115
Figura 60. Registros representativos mediante citometría de flujo.....	117
Figura 61. Correlación del recuento de monocitos clásicos adherentes de pacientes en el día 5 con la GCS.....	118
Figura 62. Expresión de moléculas de adhesión en subpoblaciones linfocitarias y monocitarias adherentes.....	121
Figura 63. Análisis de correlación de la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a 5 días tras la aHSA.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1. V_m teóricos alcanzados con el uso de soluciones despolarizantes mediante reemplazo isosmótico de la $[K^+]_e$.	31
Tabla 2. Relación de anticuerpos para detección de proteínas mediante Western Blot.	37
Tabla 3. Relación de anticuerpos para inmunofenotipado de PBMCs mediante citometría de flujo.	42

RESULTADOS

Tabla 4. Genes de interés expresados diferencialmente en las comparaciones HSA7d vs. Control y HSA7d vs. Sham7d.	77
Tabla 5. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de Ca^{2+} (HSA7d vs. Control).	78
Tabla 6. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de Ca^{2+} (HSA7d vs. Sham7d).	79
Tabla 7. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de K^+ (HSA7d vs. Control).	81
Tabla 8. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de K^+ (HSA7d vs. Sham7d).	82
Tabla 9. Datos demográficos de los individuos controles y los pacientes con aHSA.	91
Tabla 10. Clasificación de pacientes según escalas de consciencia, severidad tras aHSA y riesgo de isquemia cerebral tardía.	92
Tabla 11. Frecuencia de vasoespasmó según diferentes métodos diagnósticos.	93
Tabla 12. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los pacientes a 24 horas y 5 días tras la HSA y las escalas de severidad.	107
Tabla 13. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los sujetos controles y los datos demográficos y de adhesión.	108
Tabla 14. Significaciones estadísticas entre de la diferencia en porcentaje de poblaciones monocitarias en función de la presencia o ausencia de vasoespasmó.	109
Tabla 15. Correlación de la expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T y monocitos con las escalas de evaluación de la aHSA y el grado de adhesión global de PBMCs a células HUVEC estimuladas.	112
Tabla 16. Significaciones estadísticas entre de la expresión de moléculas de adhesión en función de la presencia o ausencia de vasoespasmó.	112
Tabla 17. Análisis estadístico de los recuentos de poblaciones celulares de PBMCs adheridas con respecto de los hallados en PBMCs en condición basal.	117
Tabla 18. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los pacientes y las escalas de severidad.	118
Tabla 19. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los sujetos Controles y de adhesión.	119
Tabla 20. Significaciones estadísticas entre de la diferencia en porcentaje de poblaciones monocitarias en función de la presencia o ausencia de vasoespasmó.	119

Tabla 21. Correlación de la expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T y monocitos con las escalas de evaluación de la aHSA y el grado de adhesión de PBMCs a células HUVEC estimuladas.. 121

Tabla 22. Significaciones estadísticas entre de la expresión de moléculas de adhesión en función de la presencia o ausencia de vasoespasmos..... 121

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i, concentración de Ca²⁺ intracelular

[K⁺]_e, concentración de K⁺ extracelular

ADN, ácido desoxirribonucleico

AngioTAC, angiografía mediante tomografía axial computerizada

ARN, ácido ribonucleico

ATP, adenosin trifosfato

BSA, albúmina sérica bovina (“Bovine Serum Albumin”)

CCICR, liberación de Ca²⁺ inducida por canales de Ca²⁺

CICR, liberación de Ca²⁺ mediada por Ca²⁺

CLP, progenitor linfoide común, (“Common Lymphoid Progenitor”)

CMP, progenitor mieloide común, (“Common Myeloid Progenitor”)

DAG, diacilglicerol

DCR, daño cerebral retardado

DCT, daño cerebral temprano

DEPC, dietil pirocarbonato

DMSO, dimetilsulfóxido

FBS, suero bovino fetal (“Fetal Bovine Serum”)

FSC, flujo sanguíneo cerebral

GAP, GTPase activating protein

GCS, escala de coma de Glasgow (“Glasgow Coma Scale”)

GDI, guanine nucleotide dissociation inhibitor

GEF, guanine nucleotide exchange factor

GSEA, análisis de enriquecimiento de genes (“Gene Set Enrichment Assay”)

HSA, hemorragia subaracnoidea

HSC, célula madre hematopoyética (“Hematopoietic Stem Cell”)

HUVEC, células endoteliales humanas de vena umbilical (“Human Umbilical Vein Endothelial Cells”)

IP₃, inositol trifosfato.

IP₃R, receptor para IP₃

K_v, canal de K⁺ dependiente de voltaje

LCR, líquido cefalorraquídeo.

LTCCs, canales de calcio tipo L

MLC, cadena ligera de miosina (“Myosin Light Chain”)

MLCK, quinasa de la cadena ligera de miosina (“Myosin Light Chain Kinase”)

MLCP, fosfatasa de la cadena ligera de miosina (“Myosin Light Chain Phosphatase”)

NCX, intercambiador de Na^+ - Ca^{2+}
PBMCs, células mononucleares de sangre periférica
PFA, paraformaldehído
PIC, presión intracraneal
PIP₂, fosfatidil inositol bifosfato
PKC, proteína quinasa C (“Protein Kinase C”)
PLC, fosfolipasa C
PMCA, ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática
PPC, presión de perfusión cerebral
PVDF, difluoruro de polivinilideno (“polyvinylidene difluoride”)
RBD, dominio de unión a Rho
ROCC, canales de Ca^{2+} operados por receptor
ROCK, proteína quinasa asociada a Rho (“Rho-associated protein kinase”)
RS, retículo sarcoplásmico
RTCCs, canales de Ca^{2+} tipo R
RyR, receptor sensible a rianodina
SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (“Sarcoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase”)
SOCCs, canales de Ca^{2+} operados por reservorio
TNF- α , factor de necrosis tumoral α
TRPs, canales (“Transient Receptor Potential”)
TTCC, canal de calcio tipo T
VDCCs, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
 V_m , potencial de membrana en reposo
VSMCs, miocitos o células musculares lisas vasculares
WFNS, escala de la federación mundial de neurocirugía (“World Federation Neurosurgery”)

INTRODUCCIÓN

1. Hemorragia subaracnoidea aneurismática

1.1. Fisiopatología de la hemorragia subaracnoidea aneurismática y el vasoespaso

La hemorragia subaracnoidea aneurismática (aHSA) es una extravasación de sangre al espacio subaracnoideo producida por la rotura de una malformación vascular llamada aneurisma. Estas malformaciones se producen en las arterias cerebrales debido al estrés hemodinámico que puede generar el flujo sanguíneo sobre las paredes o bifurcaciones arteriales (Munarriz y cols., 2016; Sun y cols., 2020). La salida de sangre al espacio subaracnoideo causa un incremento de la presión intracraneal (PIC) y un descenso de la presión de perfusión cerebral (PPC) y del flujo sanguíneo cerebral (FSC), los cuales están relacionados con el daño cerebral y el pronóstico de los pacientes (Wang y cols., 2018; Wettervik y cols., 2021) (Figura 1).

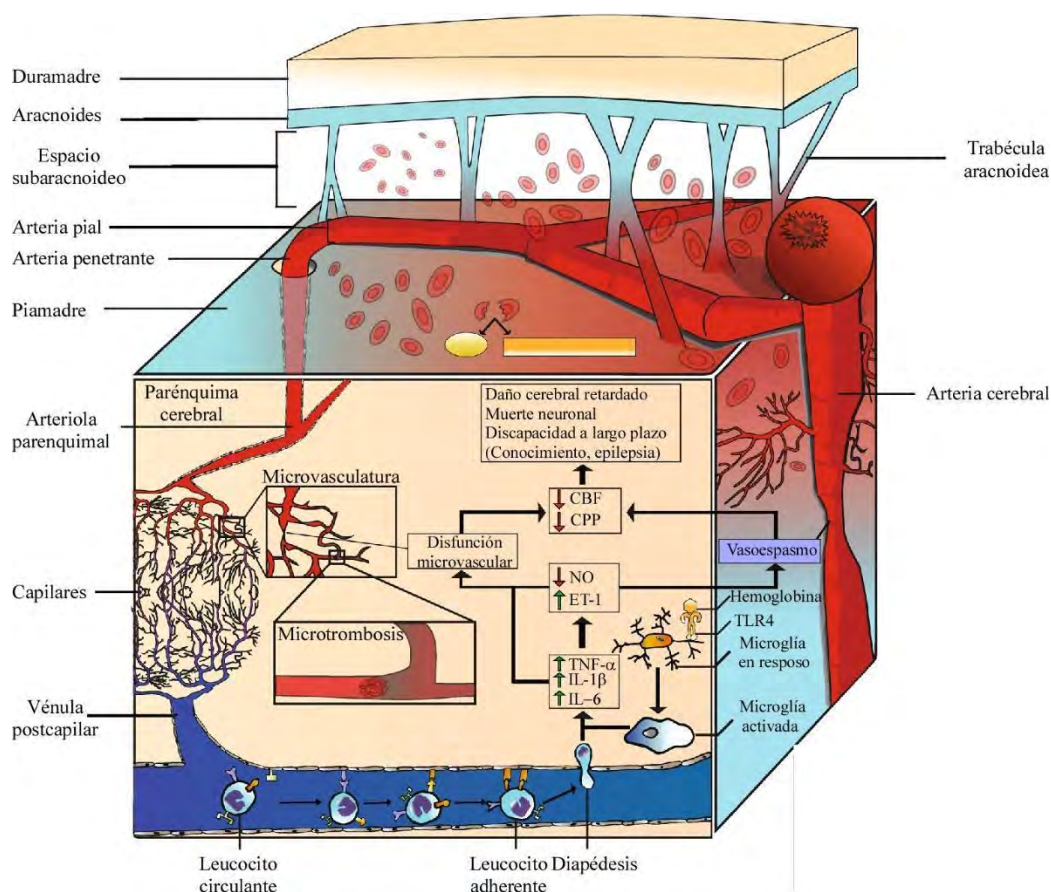


Figura 1. Esquema representativo del entorno subyacente a la HSA. Detalle anatómico y principales procesos desencadenados. Modificado de Geraghty y cols, (2019).

El daño cerebral producido se divide en **daño cerebral temprano** (DCT, antes de las 72h) y **daño cerebral retardado** (DCR, entre los días 3 y 14, después del sangrado)

(Macdonald y Schweizer, 2017). El **DCT** tiene lugar como consecuencia de la extravasación de sangre al espacio subaracnoideo y cursa, tanto en pacientes como en modelos animales experimentales, con: isquemia, debido a la disminución de la PPC y el aumento de la PIC (Prunell y cols., 2003; Wettervik y cols., 2021); activación de la producción de citoquinas, apoptosis y del sistema inmune (Gris y cols., 2019; Savarraj y cols., 2018; Shimamura y cols., 2020). El **DCR** se caracteriza por el desarrollo de daño cerebral isquémico. Este daño ha sido clásicamente relacionado con el desarrollo del vasoespasmo en grandes vasos (Brami y cols., 2020; Crowley y cols., 2011; Egea-Guerrero y cols., 2015; Mossa-Basha y cols., 2019) cuya oclusión provoca una disminución de la irrigación de los territorios posteriores originando isquemia y daño cerebral en las regiones afectadas. Dicho daño suele estar directamente relacionado con el volumen de sangre liberada al espacio subaracnoideo y la proximidad al foco de sangrado. Además del vasoespasmo, otros eventos se han relacionado recientemente con el desarrollo del DCR. Estos tienen que ver con el papel de la inflamación y del sistema inmunitario (Ridwan y cols., 2021; Zhang y cols., 2020), alteraciones en la coagulación (Chen y Zhang, 2020) o alteraciones a nivel microvascular (Anzabi y cols., 2019; Gölitiz y cols., 2018).

1.2. Incidencia, diagnosis, tratamiento y prognosis

La incidencia mundial de HSA en 2010 fue de 6,1 pacientes por cada 100.000 habitantes cada año y en Europa de 6,3 pacientes por cada 100.000 habitantes. Esta incidencia es superior a la española, que se sitúa en 4,1 pacientes por cada 100.000 habitantes. La edad media de debut de esta patología es de 47 años, siendo su distribución por sexos mayor en mujeres que en hombres y acentuándose a partir de los 55 años (Etminan y cols., 2019).

El diagnóstico de esta patología puede llevarse a cabo mediante distintas técnicas. Actualmente, la técnica de elección es la angiografía mediante tomografía axial computerizada (angioTAC) que cuenta con unos altos índices de sensibilidad y especificidad dentro de las seis primeras horas tras la hemorragia (Perry y cols., 2011). En casos donde el angioTAC no sea concluyente o hayan pasado más de seis horas desde el evento hemorrágico existe la posibilidad de realizar una punción lumbar para valorar la presencia de xantocromía (decoloración amarillenta del líquido cefalorraquídeo) (Backes y cols., 2012). En tercer lugar, encontramos la angiografía mediante resonancia

magnética, que cuenta con unos valores ligeramente inferiores en sensibilidad y especificidad al angioTAC (Sailer y cols., 2014).

Con respecto al tratamiento de la HSA, el primer objetivo es la detención del sangrado. Esto puede llevarse a cabo mediante dos abordajes diferentes: la técnica de clipaje, que consiste en la colocación de un clip en el cuello del aneurisma cerrándolo e impidiendo la extravasación de sangre; y la técnica de “*coiling*”, basada en el emplazamiento de muelles dentro del aneurisma para detener la hemorragia (Brisman y cols., 2006) (Figura 2). La elección de una u otra técnica depende de las características del paciente, del sangrado y de los riesgos de la intervención. Mientras que la técnica de “*coiling*” tiene un mejor pronóstico que la técnica de clipaje a largo plazo, esta presenta mayor riesgo de resangrado que la segunda, sin encontrarse diferencias significativas en el riesgo asociado a cada una de ellas (Li y cols., 2013). Una vez resuelto el sangrado, las principales complicaciones pueden ser la hidrocefalia y el vasoespasma, pudiendo ambos ser causantes del DCR. En casos de hidrocefalia se recomienda el uso de un drenaje ventricular externo para reducir la presión intracraneal (Steiner y cols., 2013). Para el vasoespasma, el único tratamiento recomendado con claras evidencias es el uso de nimodipina (antagonista de los canales de calcio tipo L, LTCCs). Actualmente se están desarrollando nuevos fármacos para abordar el vasoespasma, entre los que destaca el Fasudil, inhibidor de ROCK con efecto vasodilatador (Li y cols., 2019; Steiner y cols., 2013).

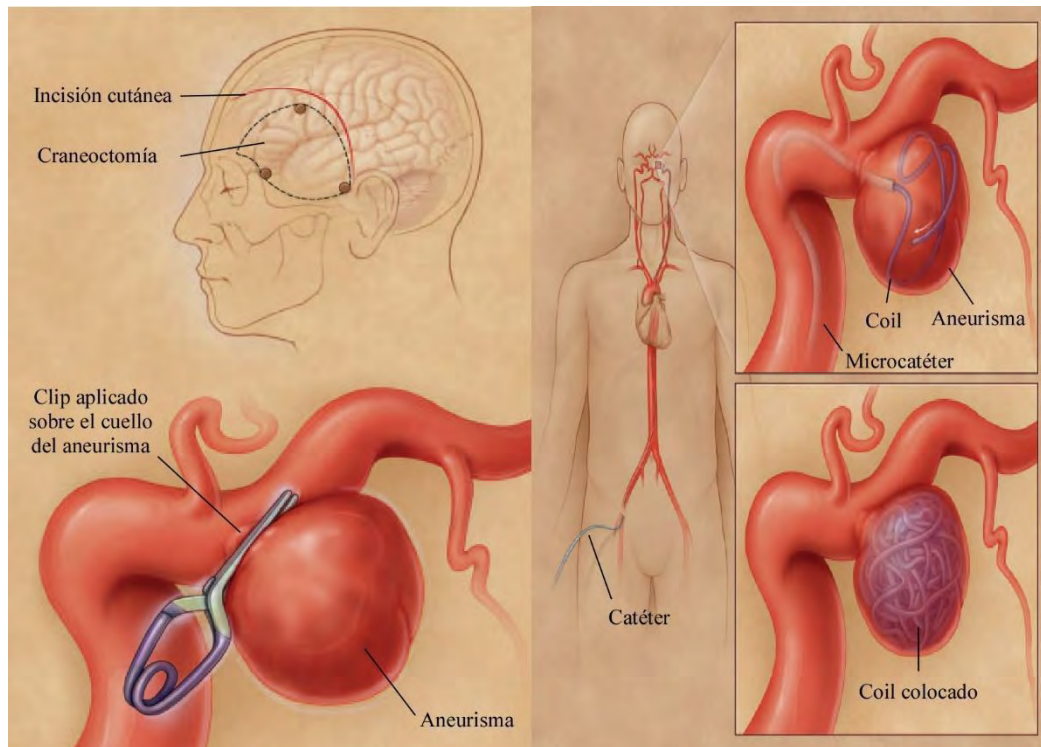


Figura 2. Representación de las técnicas de clipaje (izquierda) y “coiling” (derecha). Modificado de Brisman y cols., (2006).

El pronóstico de los pacientes que han sufrido una HSA muestra una elevada letalidad, al fallecer un 8,3 % antes de llegar al hospital y hasta el 26 % a causa de la enfermedad. De los supervivientes, el 19 % son dependientes para actividades de la vida cotidiana y el 55 % restante independientes para estas actividades (Nieuwkamp y cols., 2007). Los supervivientes presentan en un porcentaje alto, aunque variable, afecciones cognitivas, funcionales y, en algunos casos, conductuales que se agravan de forma paralela a la severidad del daño causado por la hemorragia (Al-Khindi y cols., 2010; Eagles y cols., 2019). Debido a que la edad media de aparición corresponde con personas que están en su etapa laboral y, a menudo, poseen responsabilidades familiares, las secuelas representan un elevado coste a nivel social y poblacional. Esto es debido a que las personas afectadas a menudo pierden su empleo o la capacidad de seguir desempeñando las funciones que llevaban a cabo, en los casos más leves, o incluso llegan a requerir el cuidado asistencial de personas de su entorno o del sistema sanitario, en los casos más graves, al quedar incapacitados para funciones cotidianas y de la vida diaria.

2. Músculo liso arterial

2.1. Anatomía de la circulación cerebral arterial

El cerebro está irrigado por dos pares arteriales que le proveen de la sangre suficiente asegurando la disponibilidad de nutrientes y oxígeno necesarios para que sea capaz de desempeñar sus funciones. Estos pares arteriales son las arterias carótidas internas y las vertebrales. Las arterias carótidas internas son una rama de las carótidas comunes que conducen la sangre de lo que será posteriormente denominado circulación anterior. Las arterias vertebrales aportan la sangre de lo que será posteriormente conocido como circulación posterior. Ambos pares arteriales al pasar por la base del cráneo confluyen en una estructura vascular denominada **polígono de Willis** que se conforma por las arterias cerebrales anteriores, las arterias comunicantes anteriores, las arterias cerebrales medias, las arterias cerebrales posteriores, las arterias comunicantes posteriores y la arteria basilar. Dentro de este entramado, las arterias anteriores dan lugar a la **circulación cerebral anterior**, que lleva a cabo la irrigación del cerebro y de la mayor parte del diencefalo. Por su parte, las arterias posteriores junto a la basilar conforman la **circulación cerebral posterior**, que irriga al cerebelo y al bulbo raquídeo mayoritariamente (Chandra y cols., 2017) (Figura 3). La circulación cerebral anterior aporta aproximadamente un 72 % de la sangre necesaria al cerebro, mientras que la circulación posterior lo hace en el 28 % restante (Zarrinkoob y cols., 2015).

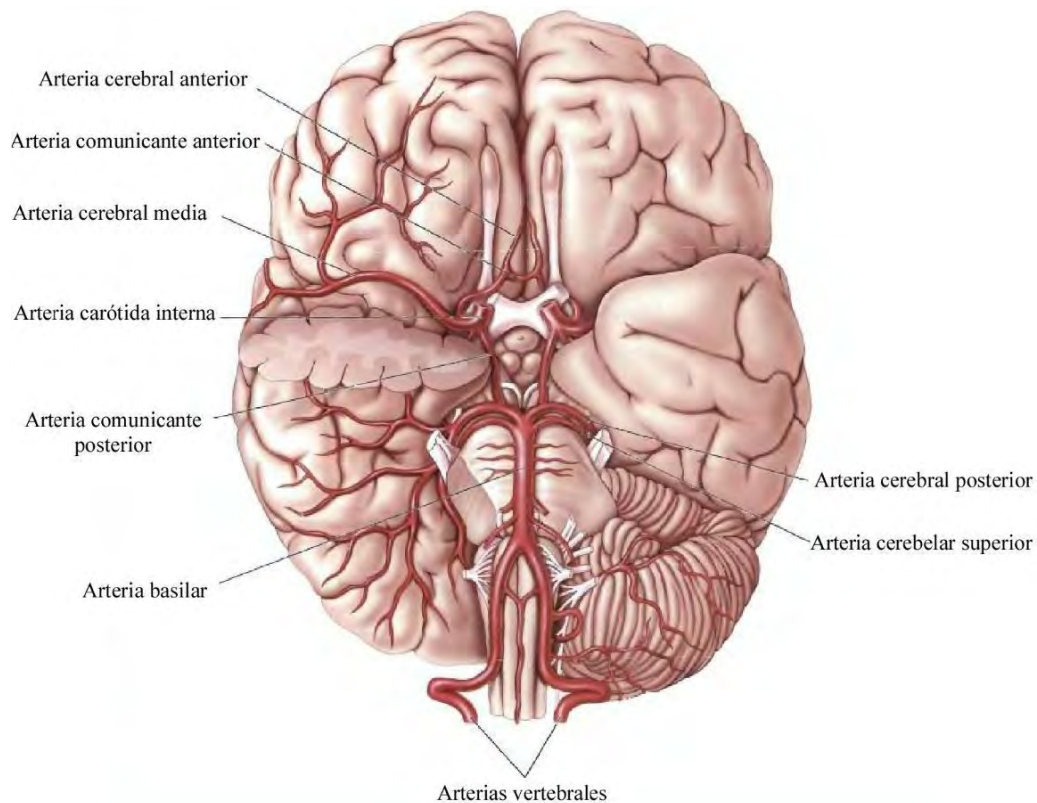


Figura 3. Detalle anatómico de la circulación arterial en la base del cráneo. Modificado de Bear y cols., (2008).

2.2. Estructura e histología arterial y del músculo liso vascular

Las arterias descritas en el epígrafe anterior se denominan arterias medianas o musculares. Estas no poseen la elasticidad de las grandes arterias y presentan una pared más rígida, estando destinadas a la conducción. Se estructuran en tres capas concéntricas o tunicas (Figura 4) (Ross y Pawlina, 2008):

- **Túnica íntima:** es la capa más interna a la luz arterial y está en contacto con el flujo sanguíneo. Se compone de un revestimiento endotelial junto con su lámina basal, una capa subendotelial de tejido conjuntivo y una membrana elástica interna prominente. En adultos jóvenes esta capa representa aproximadamente una sexta parte de la pared.
- **Túnica media:** representa la capa intermedia de la pared arterial. Está conformada por células musculares lisas, dispuestas en espiral, entre fibras de colágeno y un escaso material elástico. La contracción de las células musculares contribuye a mantener y regular el tono vascular y la presión arterial. Las células musculares lisas poseen una lámina basal externa que producen el colágeno, la elastina y la sustancia fundamental que forman la matriz extracelular.

- **Túnica adventicia:** es la capa más externa de la pared vascular. Se compone mayoritariamente por fibroblastos, fibras de colágeno y fibras elásticas. En las arterias musculares representa una capa gruesa, con un espesor que puede ser similar a la capa muscular. Aunque el componente principal es el colágeno, se puede encontrar una acumulación de fibras elásticas en el límite con la túnica media que conforma la membrana elástica externa. También por esta capa discurren pequeños vasos y nervios que irrigan e inervan a estas arterias. Son el *vasa vasorum* y *nervi vascularis*.

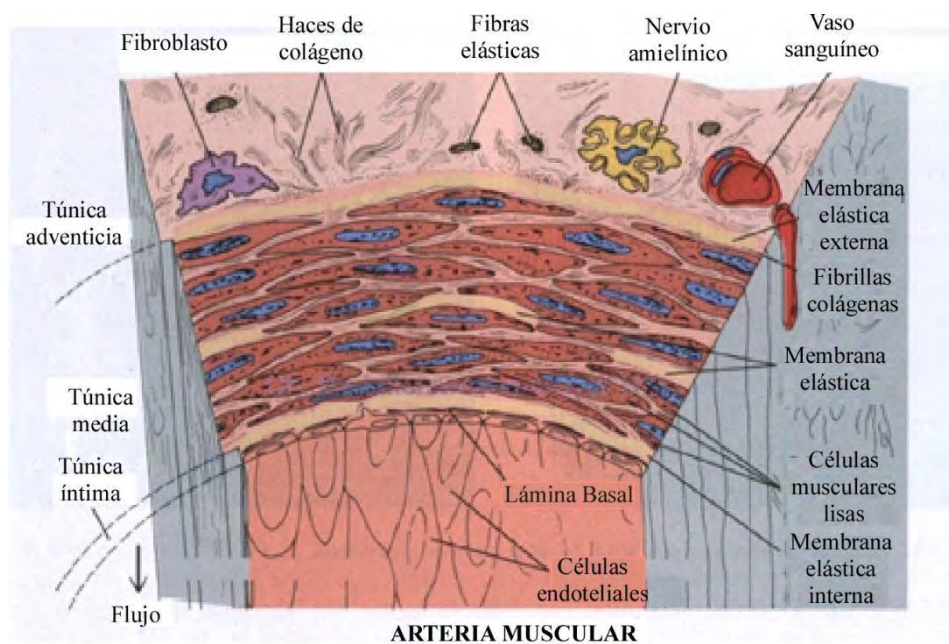


Figura 4. Representación histológica de una sección transversal de una arteria muscular. Modificado de Ross y Pawlina, (2008).

Con respecto a la musculatura lisa que conforma la túnica media de las arterias, esta capa se compone de **miocitos** o **células musculares lisas vasculares (VSMCs)**. Dichas células tienen un aspecto fusiforme y disponen su núcleo en el centro. Presentan un tamaño aproximado entre 20 y 100 μm (Dickhout y Lee, 2000; Miller y cols., 1987; Ross y Pawlina, 2008), estando unidas entre ellas por uniones en hendidura. Estructuralmente podemos distinguir dos entidades de gran importancia en estas células, estas son el citoesqueleto y el aparato contráctil.

El citoesqueleto de las VSMCs está compuesto por filamentos intermedios de desmina y vimentina que se unen a unas estructuras denominadas cuerpos densos. Estos cuerpos densos están conformados por varias proteínas de placa de adhesión donde destaca la α -

actinina y su función es la fijación del citoesqueleto al aparato contráctil, puesto que también se unen a los filamentos finos de actina (Figura 5).

El **aparato contráctil** del miocito está formado por dos componentes distintos:

- **Filamentos finos:** se componen principalmente de actina, pero también presentan otras proteínas como la tropomiosina y dos proteínas específicas del músculo liso, la caldesmona y la calponina. La posición que ocupa la tropomiosina sobre la actina se regula por el estado de fosforilación de las cabezas de miosina. Este estado de la miosina también controla la función de la caldesmona y la calponina, cuyo papel es fijar la actina bloqueando el sitio de unión para la miosina.
- **Filamentos gruesos:** se componen de miosina II, formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas y cuatro ligeras. En el músculo liso las moléculas de miosina se disponen orientadas en una misma dirección en un polo del filamento y en dirección contraria en el otro polo. Además, se escalonan en paralelo uniéndose a una molécula compañera antiparalela con una superposición leve. Esta estructura se denomina filamento de miosina polar lateral y permite la máxima interacción con los filamentos finos en toda la longitud del filamento grueso.

En las VSMCs también destaca la presencia de una gran cantidad de invaginaciones de la membrana celular o caveolas (Devine y cols., 1972). Estas estructuras se localizan próximas a las cisternas del retículo sarcoplásmico (RS) y están relacionadas con mecanismos de mantenimiento del tono vascular (Lohn y cols., 2000). Destacan en estas estructuras las caveolas y como proteína principal, la caveolina, de la que en músculo liso encontramos sus tres isoformas: caveolina-1, caveolina-2 y caveolina-3 (Cohen y cols., 2004).

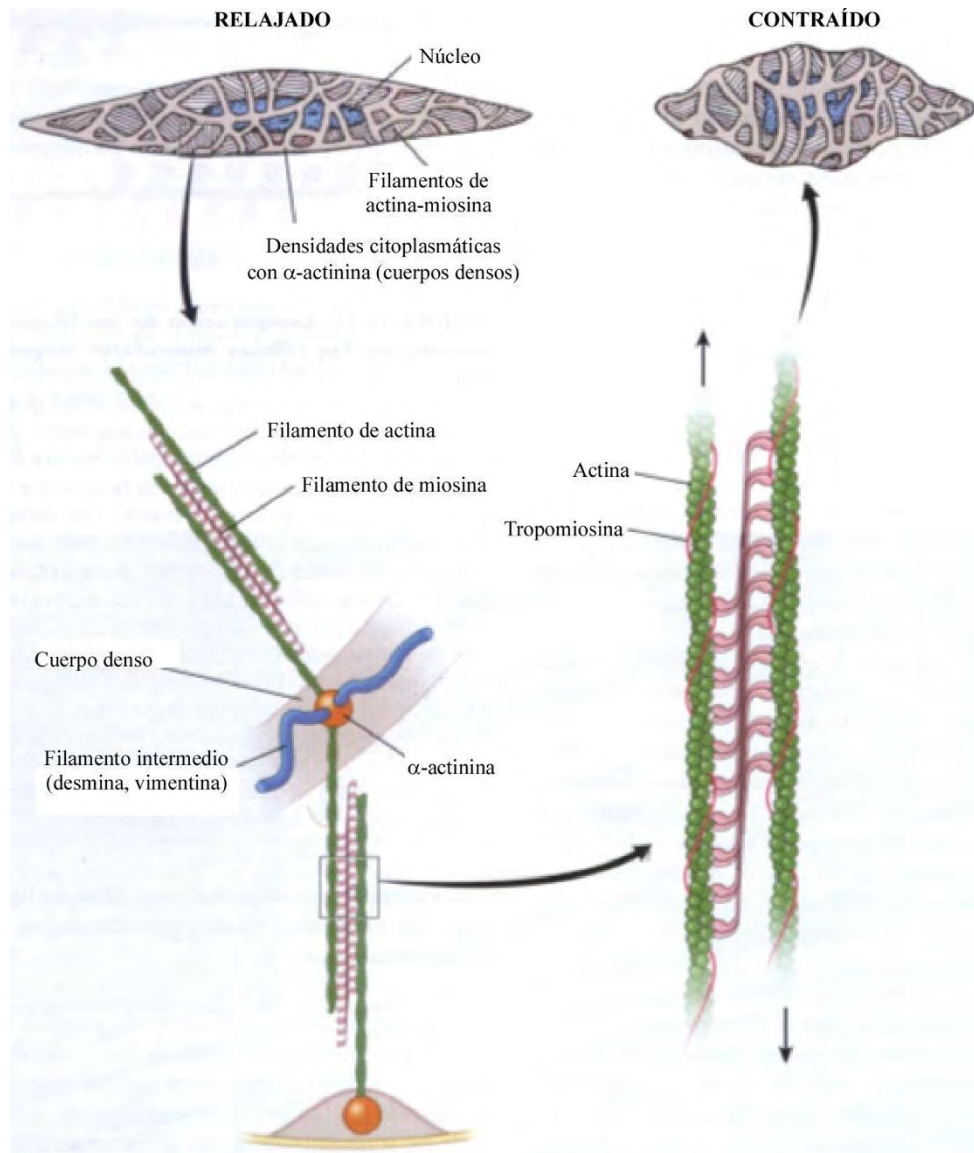


Figura 5. Modelo de contracción de la VSMC. Detalle de la interacción entre el citoesqueleto y el aparato contráctil. Modificado de Ross y Pawlina, (2008).

2.3. Mecanismos de regulación de la contracción

La contracción del músculo liso puede estar mediada por dos mecanismos que se diferencian por su dependencia al Ca^{2+} . Estos son dos, la contracción producida por un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la generada por mecanismos de sensibilización a Ca^{2+} donde se produce un aumento de la contracción, manteniéndose constante la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El funcionamiento de estos mecanismos no es excluyente y ambos pueden estar actuando de forma paralela.

2.3.1. Contracción mediada por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$

La contracción del músculo liso mediada por cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se produce cuando la concentración de este ion aumenta en el citoplasma de las VSMCs. Este flujo de iones puede provenir tanto del medio extracelular como de reservorios intracelulares. Esto se detalla más adelante.

Como consecuencia del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ se produce la unión reversible de cuatro moléculas de dicho ion a dos moléculas de una proteína reguladora llamada *calmodulina*, formando el complejo Ca^{2+} -calmodulina. Este complejo posteriormente se une a una proteína quinasa, la *quinasa de la cadena ligera de miosina* (MLCK, “Myosin Light Chain Kinase”) que actúa fosforilando a la *cadena ligera de miosina* (MLC, “Myosin Light Chain”) haciendo que esta se una a la actina produciendo la contracción. Dicha contracción puede repetirse si la MLCK sigue fosforilada, permitiendo que la miosina se siga desplazando sobre la actina. Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye por debajo de un nivel crítico, este ion no se une a la calmodulina y deja de fosforilarse a la MLCK, deteniéndose el proceso de contracción. Para contrarrestar la contracción que se ha producido es necesario desfosforilar las cabezas de miosina que están fosforiladas. Este proceso es llevado a cabo por la *fosfatasa de la cadena ligera de la miosina* (MLCP “Myosin Light Chain Phosphatase”) que elimina el grupo fosfato de la miosina permitiendo su separación de la actina y favoreciendo la relajación total del músculo. Con todo ello, el proceso de contracción es un mecanismo que se debe al equilibrio entre la fosforilación y desfosforilación de la MLC y el resultado final se deberá al desplazamiento hacia un lado u otro de dicho equilibrio (Hall, 2016; Somlyo y Somlyo, 2003) (Figura 6).

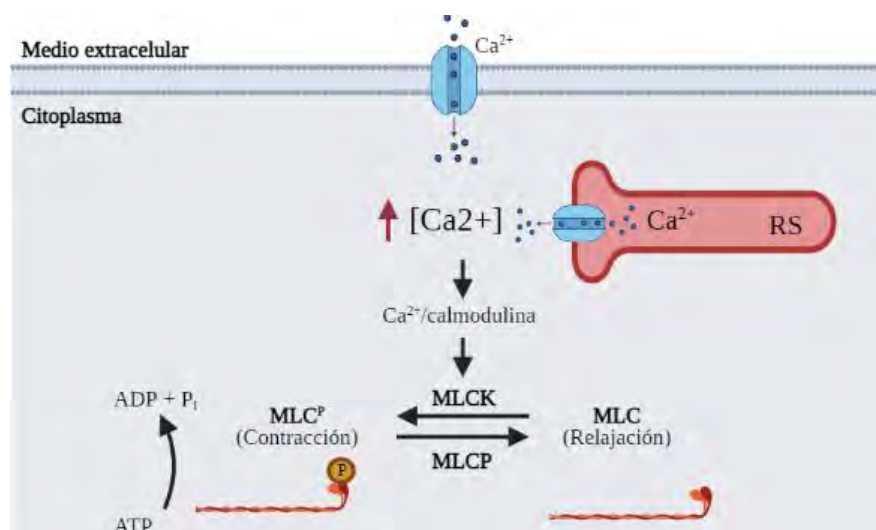


Figura 6. Mecanismo de contracción mediado por aumento de $[Ca^{2+}]_i$. Creado en BioRender, (2021).

2.3.1.1. Entrada de Ca²⁺ del medio extracelular

En este apartado se detallarán los distintos mecanismos por los que se produce la entrada de Ca²⁺ desde el medio extracelular al interior celular. Estos difieren en las características de activación y procesos por los que se produce la entrada del ion. Se distinguen: canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (VDCCs), canales TRPs, canales de Ca²⁺ operados por receptor (ROCCs), canales de Ca²⁺ operados por reservorio (SOCCs) y canales de Ca²⁺ mecanosensibles (Figura 7).

Los **VDCCs** son canales que se activan mediante la despolarización de las VSMCs cuando su potencial de membrana aumenta por encima del umbral de despolarización. En músculo liso vascular se han descrito dos tipos diferentes VDCC que difieren en sus propiedades: el **canal tipo-L (LTCC)**, de gran conductancia, activado por despolarizaciones grandes y con corriente de larga duración; y el **canal tipo-T (TTCC)**, de pequeña conductancia, activado por pequeñas despolarizaciones y con corriente transitoria (Benham y cols., 1987; Ghosh y cols., 2017). El LTCC es inhibido farmacológicamente por la familia de las dihidropiridinas, a diferencia del TTCC que no se ve afectado. Aunque ambos canales están presentes en las VSMCs, es el LTCC quien dirige principalmente la entrada de Ca²⁺ mediada por despolarización. Tiene un umbral de activación en torno a - 40 mV y su pico de máxima conductancia se sitúa aproximadamente en + 10 mV. Este canal está formado por una subunidad α que conforma el poro a través del que pasan los iones.

Los **canales TRP** (Transient Receptor Potential) son una familia de canales catiónicos que poseen un gran papel en la entrada de Ca²⁺ en el interior celular. Cada subunidad posee seis segmentos transmembranarios. Poseen una región denominada dominio TRP que puede estar implicada en la unión a PIP₂, así como ser un sitio de ensamblaje. También en la región intracelular hay múltiples elementos regulatorios, lugares de interacción y dominios enzimáticos. Se dividen en 6 subfamilias: canónica (TRPC), vaniloide (TRPV), melastatina (TRPM), ankyrina (TRPA), mucopilina (TRPML) y policistina (TRPP). Con respecto a su funcionalidad esta es muy amplia entre las distintas subfamilias por lo que se describirán las funciones de distintos miembros en los siguientes epígrafes (Earley y Brayden, 2015).

Con respecto a los **ROCCs**, dicha familia está conformada por canales catiónicos que permiten la entrada de Ca²⁺ cuando un ligando se une al receptor. Se han descrito varios

tipos de corrientes y canales asociados a diferentes ligandos como pueden ser el ATP o la acetilcolina. Estos canales catiónicos no son solo permeables a Ca^{2+} , aunque pueden mostrar distinta selectividad al ion (McFadzean y Gibson, 2002). También ha sido descrito el papel de canales catiónicos activados por proteínas G donde la apertura del canal se produce mediante el diacilglicerol (DAG) resultante de la unión del ligando de la proteína G y la activación de la fosfolipasa C (PLC). Se han identificado algunos canales TRPC que actúan como canales catiónicos en este tipo de ruta (Earley y Brayden, 2015).

Los SOCCs median la entrada de Ca^{2+} a la célula cuando se detectan niveles bajos del ion dentro del RS. En este contexto las proteínas STIM1 y Orai1 tienen un papel predominante. STIM1 es una proteína situada en la membrana del RS que sensa la cantidad de Ca^{2+} . Orai1 es un canal catiónico que se activa permitiendo el paso de Ca^{2+} . De esta forma cuando STIM1 detecta una bajada en las reservas iónicas del RS induce a Orai1 a permitir la entrada del ion (Ávila-Medina y cols., 2016; Soboloff y cols., 2006). También se ha identificado el papel de varios canales TRPC activados por reservorio. Estos son TRPC1, TRPC3, TRPC5 y TRPC7 (Bergdahl y cols., 2005; Xu y cols., 2006; Zagranichnaya y cols., 2005).

En lo relativo a los **canales de Ca^{2+} mecanosensibles** estos permiten la entrada de Ca^{2+} cuando tiene lugar una deformación de la célula. Se han asociado diferentes canales TPR a esta función. Se pueden distinguir entre ellos a los canales TRPV2 (Aguettaz y cols., 2017), TRPV4 (Ghosh y cols., 2017), TRPC6 (Welsh y cols., 2002) y la subfamilia TRPP (Earley y Brayden, 2015).

2.3.1.2. Reservorios intracelulares y mecanismos de extracción de Ca^{2+}

Como se introducirá en el próximo apartado, el RS es un reservorio intracelular que almacena el Ca^{2+} sobrante en el citoplasma cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta por encima de los niveles basales, ya que este ion está muy regulado al participar en una gran multitud de procesos. El proceso de almacenamiento de Ca^{2+} es llevado a cabo por la SERCA. De forma inversa, el RS también puede liberar dichas reservas de Ca^{2+} produciendo un incremento intracelular del ion que complementa a la entrada del mismo desde el medio extracelular. A continuación, se detallan dichos mecanismos (Figura 7).

La **liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3** es el primero de estos mecanismos. En él la activación de una proteína G mediada por la unión de un ligando a su receptor activa a la

PLC generando IP₃. Este segundo mensajero difunde por el citoplasma hasta llegar al receptor de IP₃ (IP₃R) situado en el RS al que se une produciendo su apertura y con ello la liberación de Ca²⁺ del interior del RS (Somlyo y cols., 1985). Este mecanismo es inhibido en presencia de heparina, al unirse al IP₃R y competir con el segundo mensajero (Kobayashi y cols., 1988).

La **liberación de Ca²⁺ mediada por Ca²⁺ (CICR)** es un segundo mecanismo en el que un incremento de Ca²⁺ en el citosol provoca la liberación de Ca²⁺ del RS. Este mecanismo está llevado a cabo por el receptor sensible a rianodina (RyR) que se abre cuando se produce un incremento en la [Ca²⁺]_i. Este mecanismo es principalmente inducido por el incremento del ion debido a la apertura de los VDCCs, pero también puede deberse al Ca²⁺ liberado por el IP₃R (Kamishima y McCarron, 1997).

En tercer lugar, encontramos la **liberación de Ca²⁺ inducida por canales de Ca²⁺ (CCICR)**. Este mecanismo es llevado a cabo por los VDCCs aunque mediado por una ruta metabotrópica y siendo independiente de la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular. La activación de los VDCCs, por despolarización o por unión de agonistas, provoca la apertura de los IP₃Rs y, en menor medida, de los RyRs dando lugar a la liberación de Ca²⁺ desde el interior del RS. Este efecto es reprimido en presencia de inhibidores de los VDCCs (del Valle-Rodríguez y cols., 2003).

2.3.1.3. Liberación de Ca²⁺ por el RS

De igual forma que la célula regula la entrada de Ca²⁺ a su interior, existen también varios mecanismos mediante los que lleva a cabo la retirada del ion cuando ya no es necesario, para mantener una concentración basal adecuada. Estos se diferencian entre la retirada hacia reservorios intracelulares o la extrusión hacia el exterior celular (Figura 7).

El **RS** es uno de los principales reservorios intracelulares de Ca²⁺ en las VSMCs. El mecanismo de recaptación es llevado a cabo mediante una proteína denominada **SERCA**, que se encuentra en la membrana del RS. Esta proteína es una ATP-asa que media la entrada de dos moléculas de Ca²⁺ al lumen del RS desde el citoplasma mediante el consumo de la energía producida por la hidrólisis de una molécula de ATP (Møller y cols., 2005; Shmygol y Wray, 2005).

La **mitocondria** es el segundo gran reservorio de Ca²⁺, aunque en las VSMCs es el RS quien tiene un papel predominante en el metabolismo del ion. Posee mecanismos separados de introducción y extracción del Ca²⁺ a través de la membrana mitocondrial.

En el interior del orgánulo el ion se combina con grupos fosfatos para quedar almacenado como fosfato cálcico de forma estable (Liu y Khalil, 2018).

La **ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA)** es una proteína transportadora situada en la membrana plasmática cuya función es la eliminación de Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular mediante la hidrólisis de ATP. Esta proteína, cuya función es dependiente de la $[\text{Ca}^{2+}]$, es estimulada por la calmodulina e inhibida por vanadato (De Jaegere y cols., 1990; Popescu y Ignat, 1983).

Un cuarto mecanismo en el proceso de extracción de Ca^{2+} del citosol es el **intercambiador de Na^+ - Ca^{2+} (NCX)**. Este transportador se localiza en la membrana plasmática del miocito y en condiciones fisiológicas media la salida de un ion de Ca^{2+} junto a la entrada de tres iones de Na^+ . Este mecanismo es dependiente del potencial de membrana y de los gradientes de ambos iones, por lo que también puede funcionar en forma reversa (Ashida y Blaustein, 1987; Grover y cols., 1983).

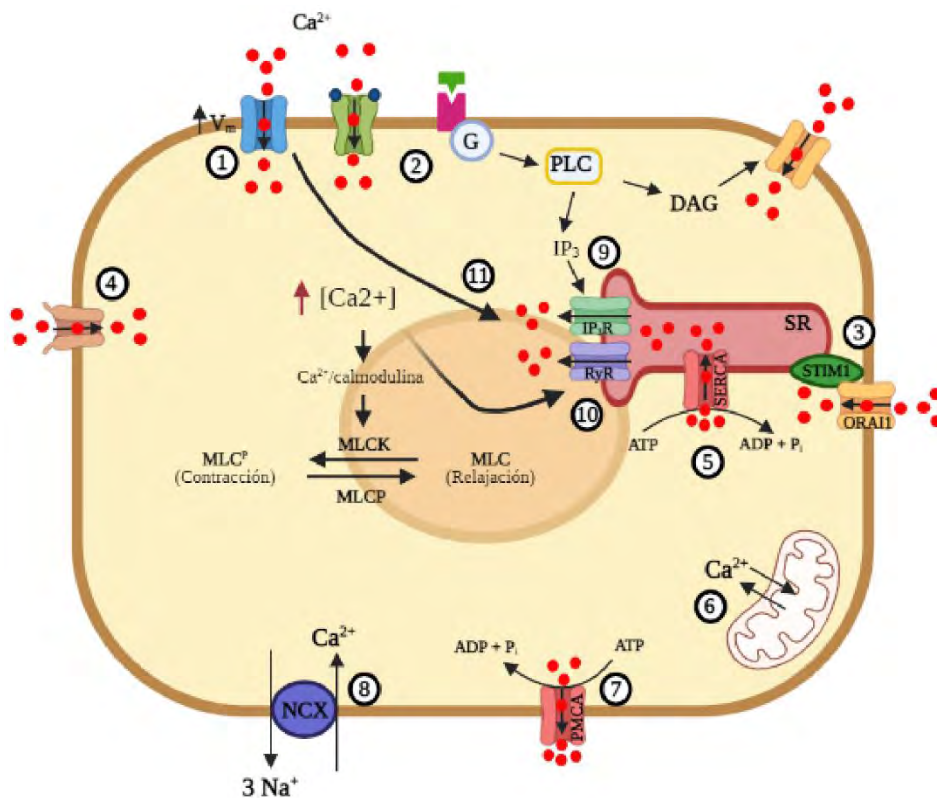


Figura 7. Mecanismos de movilización del Ca^{2+} . Entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular: VDCC (1), ROCC (2), SOCC (3) y canales de Ca^{2+} mecanosensibles (4). Reservorios intracelulares y mecanismos de extracción de Ca^{2+} : RS y SERCA (5), mitocondria (6), PMCA (7) y NCX (8). Liberación de Ca^{2+} por el RS: liberación de Ca^{2+} mediada por IP₃ (9), CICR (10) y CCICR (11). Creado en BioRender, (2021).

2.3.2. Contracción mediada por mecanismos de sensibilización a Ca^{2+}

El músculo liso vascular no solo se contrae mediante incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, también puede contraerse mediante mecanismos de sensibilización a Ca^{2+} donde no hay cambios en la concentración del ion. En estos mecanismos se produce una inhibición de la MLCP provocando de forma neta un desplazamiento de la miosina hacia un estado fosforilado al seguir la MLCK activa. Las rutas implicadas en este proceso son dos: la ruta de RhoA/ROCK y la ruta de PKC.

2.3.2.1. Ruta de RhoA/ROCK

Esta ruta consta de dos proteínas, RhoA y ROCK. La primera es una proteína que se encuentra en el citoplasma de forma inactiva y que se moviliza a la membrana al activarse. En la membrana esta proteína induce la activación de ROCK, una quinasa que media un papel efector en la ruta.

La proteína **RhoA** pertenece a la familia de las pequeñas GTPasas, junto con otras como RhoB, RhoC, Rac1 y Cdc42. Esta proteína tiene gran afinidad tanto por GDP como por GTP. En su estado inactivo RhoA se encuentra unida a GDP en el citoplasma donde es estabilizada formando un complejo con el factor GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). Cuando se produce una señal de activación de la ruta, el factor GEF (guanine nucleotide exchange factor) lleva a cabo el intercambio de GDP por GTP, produciendo la disociación de RhoA y GDI permitiendo que RhoA se desplace a la membrana plasmática donde interacciona con ROCK. En la desactivación de la ruta el factor GAP (GTPase activating protein) cataliza la hidrólisis del GTP en GDP haciendo que RhoA interaccione con GDI separándose de la membrana y volviendo al citoplasma (Godoy y Rattan, 2011) (Figura 8).

La proteína **ROCK** es una proteína quinasa que media la acción de RhoA. Esta proteína se encuentra en el citoplasma y tiene dos isoformas (ROCK1 y ROCK2). Está formada por tres regiones diferenciadas: dominio quinasa en el extremo -N terminal, una región intermedia formada por una α -hélice de 600 aminoácidos donde se encuentra el dominio de unión a Rho (RBD) y una región en el extremo -C terminal donde se encuentran los dominios PHD y CRD. El dominio CRD media la inactivación de ROCK al unirse al lugar activo del dominio quinasa. Cuando RhoA-GTP se une al RBD de ROCK induce un cambio conformacional separando al CRD del dominio quinasa permitiendo su actividad. Esta quinasa es inhibida por Fasudil (Julian y Olson, 2014).

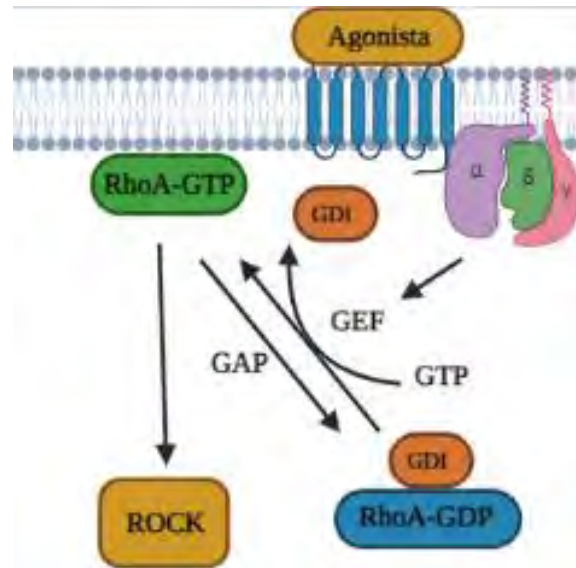


Figura 8. Ruta de RhoA/ROCK. Mecanismo de activación e inactivación de RhoA. Creado en BioRender, (2021).

En las VSMCs ambas proteínas actúan de forma secuencial inhibiendo la acción de la MLCP. La translocación de RhoA a la membrana plasmática en presencia de GTP está asociada a un incremento de la fuerza de contracción (Gong y cols., 1997). RhoA-GTP interacciona con ROCK activándola e incrementando su efecto sobre la MLCP (Matsui y cols., 1996) (Figura 9). La isoforma ROCK2 controla la producción de fuerza y contractilidad, esta se une a MLCP a través de la subunidad de unión a la miosina (MBS), mientras que ambas subunidades participan en la regulación de la estructura del citoesqueleto de forma balanceada controlando el área, las adhesiones focales y la distribución de fibras (Wang y cols., 2009). La ruta de RhoA/ROCK puede activarse mediante proteínas G o por despolarización de la célula mediante un mecanismo metabotrópico llevado a cabo por los LTCCs (Fernández-Tenorio y cols., 2011; Godoy y Rattan, 2011).

2.3.2.2. Ruta de PKC

La segunda vía de sensibilización a Ca^{2+} presente en las VSMCs es la ruta de la **proteína quinasa C (PKC)**. Esta familia de proteínas pertenece a la familia de las serinas/treoninas quinasas que codifica nueve genes diferentes y diez isoformas. La PKC está formada por un dominio regulatorio –N terminal, una región bisagra y un dominio catalítico –C terminal. La clasificación en las distintas subfamilias se lleva a cabo basándose en el dominio regulador. Se conocen subfamilias de PKC: convencionales, cPKCs (α , β I, β II y γ); novel, nPKCs (δ , ϵ , η y ι); y atípicas, aPKCs (ζ y ν / λ) (Liu y Khalil, 2018).

En vasos sanguíneos humanos se ha descrito la presencia de las isoformas α , β I, β II, δ y ϵ , donde solo α y β I cambian su localización del citoplasma a las membranas al estimular la ruta (Grange y cols., 1998). Cuando la célula se despolariza o tiene lugar la unión de algún agonista para PKC, esta se activa y fosforila a CPI-17, un factor intermediario. Al activarse este factor interacciona con MLCP inhibiendo su actividad fosfatasa sobre la MLC y, por tanto, desplazando el equilibrio hacia un predominio de MLC fosforilada (Jarajapu y Knot, 2005; Mizuno y cols., 2008). La actividad de la PKC es inhibida por bisindolylmaleimida I (GFX) (Figura 9).

Hallazgos recientes en nuestro laboratorio han demostrado que la isoforma PKC α está activada cuando la célula es estimulada mediante despolarización o mediante la unión de agonistas. En este contexto de activación PKC α se transloca a la membrana plasmática donde colocaliza con RhoA. También se ha descrito que PKC α media un papel inhibitorio sobre la función de RhoA, ya que cuando la primera es activada se produce un aumento de la segunda en el citoplasma y un descenso en la membrana plasmática. Por el contrario, si PKC α es inhibida durante la activación de la célula, mediante despolarización, la actividad de RhoA se incrementa en comparación a su actividad cuando PKC α no es inhibida (González-Montelongo y cols., 2019).

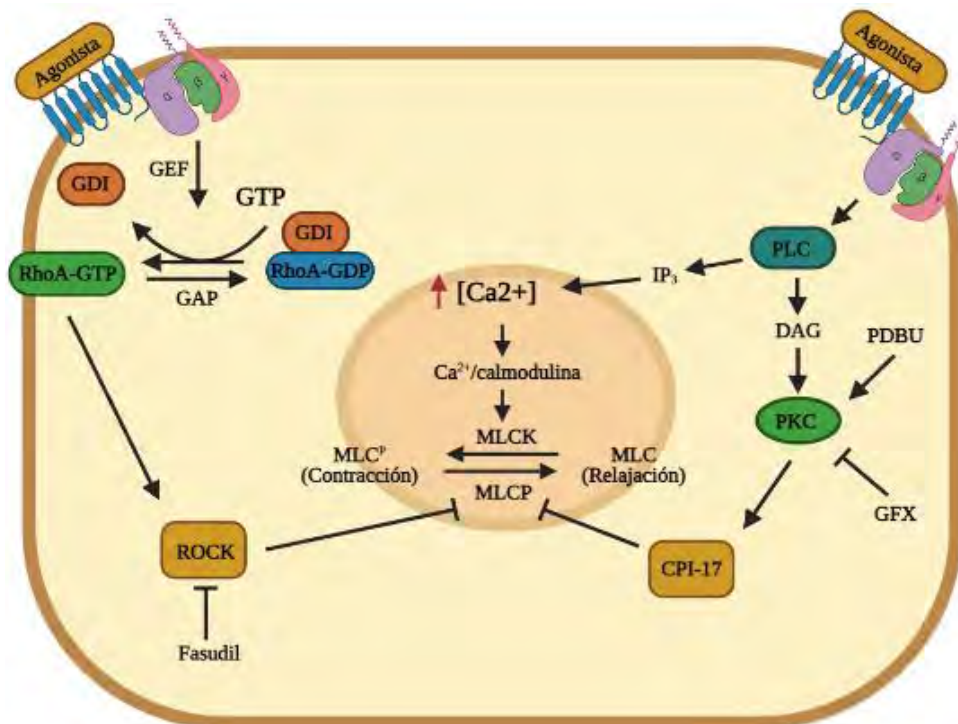


Figura 9. Sensibilización a Ca²⁺ mediada por las rutas de RhoA/ROCK y PKC. La unión de un agonista a los receptores correspondientes activa la ruta haciendo que los efectores ROCK y CPI-17 inhiban la acción de la MLCP. Creado en BioRender, (2021).

3. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en la HSA

Las PBMCs son un conjunto de células que se encuentran circulando en la sangre periférica de donde son aisladas. Estas células comparten la característica morfológica de poseer un núcleo de gran tamaño que no presenta lóbulos y se sitúa en el centro celular, ocupando un gran espacio dentro del citoplasma. Conforman esta agrupación los monocitos y los linfocitos. Estas células, aunque comparten ciertos rasgos morfológicos, varían en tamaño, aunque sobre todo en la funcionalidad de cada una. En los siguientes epígrafes se detallan las características y funciones de estas células.

3.1. Linaje hematopoyético

3.1.1. Diferenciación de las células sanguíneas

El proceso mediante el que se generan los elementos formes de la sangre a partir de sus precursores se denomina **hematopoyesis**. Este proceso de desarrollo celular sigue la teoría monofilética según la que todas las células sanguíneas maduras derivan de un primer precursor, la célula madre hematopoyética (HSC). Esta célula presenta una división asimétrica en la que una de sus células hijas comienza a diferenciarse para dar lugar a los diferentes linajes de células sanguíneas mientras que la otra célula conserva su capacidad de autorrenovación manteniendo la reserva de células precursoras. De forma clásica, tras la primera división de la HSC tiene lugar una primera diferenciación potencial donde la célula se diferencia en el **precursor linfoide común (CLP)** o en el **precursor mieoloide común (CMP)**. Tras ello, tiene lugar la diferenciación del resto de subfamilias de células sanguíneas. De la posterior diferenciación del CLP se generan los linfocitos T, B y células NK, que pertenecen a la estirpe linfoide. De forma similar, de la diferenciación del CMP se genera la estirpe mieoloide. Esta estirpe da luego lugar a los eritrocitos, los granulocitos, los monocitos y los megacariocitos (células precursoras de plaquetas) (Ross y Pawlina, 2008) (Figura 10). Hallazgos más recientes han cuestionado el modelo de diferenciación estricta descrito en el párrafo anterior. Estos han postulado vías de diferenciación menos restrictivas en los que algunas poblaciones de células pudieran diferenciarse antes de que se genere un linaje restrictivo (Doulatov y cols., 2010), o incluso en situación de necesidad del sistema inmune ciertas poblaciones celulares podrían cambiar su patrón de diferenciación para ayudar a regenerar el sistema inmune tras un daño (Pietras y cols., 2015).

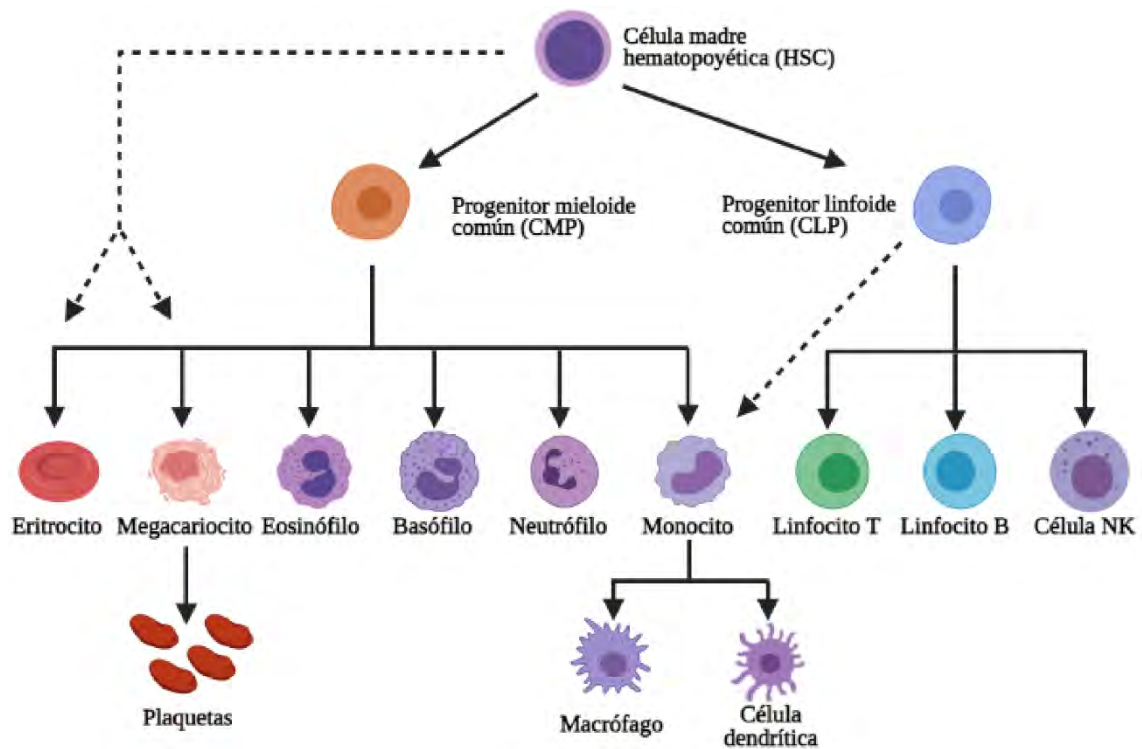


Figura 10. Proceso de hematopoyesis y generación de las diferentes estirpes de células sanguíneas. Las líneas sólidas representan el modelo clásico de la hematopoyesis (Ross y Pawlina, 2008). Las líneas discontinuas muestran modelos alternativos a la hematopoyesis clásica (Doulatov y cols., 2010; Pietras y cols., 2015). Creado en BioRender, (2021).

3.1.2. Histología y función de las subfamilias de células sanguíneas

Los distintos elementos formes de la sangre poseen diferentes funciones según la línea celular a la que pertenezcan. A continuación, se detallan las funciones según la línea celular (Tortora y Derrickson, 2018) (Figura 10):

- **Eritrocitos** o **glóbulos rojos**: presentan un tamaño de 7-8 μm y tienen una morfología de disco bicóncavo anucleado. Transportan la mayor parte del O_2 y parte del CO_2 mediante la hemoglobina.
- **Glóbulos blancos** o **leucocitos**: estas células se encargan de la inmunidad del organismo, forman el sistema inmune. Se diferencian por la presencia o no de gránulos en su interior dando lugar a células granulares o agranulares. Dentro de las células granulares encontramos las siguientes:
 - **Neutrófilos**: de 10-12 μm y con un núcleo que puede contener entre 2 o 5 lóbulos. Se encargan de la fagocitosis y destrucción de bacterias mediante lisozima, defensinas y agentes oxidantes.

- **Eosinófilos:** de 10-12 μm y con un núcleo con dos lóbulos. Combaten los efectos de la histamina en las reacciones alérgicas, fagocita complejos antígenos-anticuerpos y destruyen parásitos.
- **Basófilos:** de 8-10 μm y tienen un núcleo con dos lóbulos. Liberan heparina, histamina y serotonina en reacciones alérgicas intensificando la respuesta inflamatoria global.

Entre las células agranulares (o también, mononucleares) podemos diferenciar:

- **Linfocitos (T, B y células NK):** se diferencian entre linfocitos pequeños de 6-9 μm y linfocitos medianos o grandes de 10-14 μm . Su núcleo presenta una leve escotadura y ocupa una gran parte del citoplasma. Median las respuestas inmunitarias incluyendo las reacciones antígeno-anticuerpo. Los linfocitos B se encargan de generar anticuerpos; los linfocitos T atacan los virus invasores, células cancerosas y tejidos trasplantados; y las células NK atacan a una amplia variedad de patógenos y algunas células tumorales.
- **Monocitos:** de entre 12-20 μm . Su núcleo presenta una escotadura más pronunciada. Se encargan de la fagocitosis de los patógenos. Tardan un poco más en llegar al foco que los neutrófilos, pero una vez llegan se diferencian en macrófagos y fagocitan a los patógenos o a restos y detritos celulares. También se diferencian a células dendríticas.
- **Plaquetas:** de 2-4 μm , anucleados y contienen muchas vesículas. Forman el tapón plaquetario en la reacción hemostática y liberan factores que promueven el vasoespasmo y la hemostasia.

3.2. Inflamación

3.2.1. Papel temporal de las PBMC en la inflamación

Durante el proceso inflamatorio los dos tipos celulares que conforman las PBMCs llevan a cabo sus funciones con cronologías distintas. Los monocitos forman parte de la inmunidad innata, de carácter rápido tras la aparición de daño, mientras que los linfocitos forman parte de la inmunidad adaptativa, de carácter lento que se hacen cargo de la inmunidad a largo plazo.

Los monocitos se clasifican en tres poblaciones en base a la expresión de los marcadores de superficie CD14 y CD16: clásicos, de carácter proinflamatorio

(CD14⁺CD16⁻); intermedios, con carácter de transición (CD14⁺CD16⁺); y no clásicos, con carácter vigilante sin estar tan asociados a inflamación (CD14⁺CD16⁺⁺). Los monocitos clásicos son los que primero aparecen en el lugar del daño y de ellos posteriormente derivan el resto de poblaciones (Kratofil y cols., 2017). Tras producirse un daño, estos se adhieren al endotelio mediante moléculas de adhesión como LFA-1, MAC-1 y VLA-4 (Nourshargh y Alon, 2014). La población de monocitos se localiza en el lugar del daño entre las primeras doce horas y los cinco días. Su recuento está ligado proporcionalmente a un mal pronóstico. Los monocitos intermedios y no clásicos se asocian a pronósticos más favorables. Estos aparecen en el lugar del daño después que los clásicos, a partir de los 5 días y están asociados a procesos de vigilancia sin ejercer un carácter proinflamatorio. Tras la producción del daño, el número de monocitos en el bazo desciende rápidamente sin que este efecto sea similar en la médula ósea pudiendo indicar actúa como reservorio (Urta y cols., 2009; Van Der Laan y cols., 2014).

Los linfocitos median la respuesta inmune adaptativa. Estos se adhieren al endotelio cercano al foco de daño mediante las moléculas LFA-1 y VLA-4 (Nourshargh y Alon, 2014). Se subdividen mayoritariamente en dos linajes: los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B son las células encargadas de la producción de anticuerpos. Cuando son activadas se diferencian a células plasmáticas y producen gran cantidad de anticuerpos dirigidos contra la célula o patógeno cuyo antígeno le ha sido presentado. Por otro lado, los linfocitos T se subdividen a su vez en: células T CD4 o *helper*, que actúan como reguladoras del resto de linfocitos produciendo IL-2 y otras citoquinas; y T CD8 o citotóxicas, que tras su activación y potenciación con IL-2 localizan y destruyen los patógenos o células para las que habían sido seleccionadas. Los linfocitos son activados mediante células presentadoras de antígenos tras lo que sufren una selección clonal. Por esta razón, la respuesta adaptativa tiene lugar unos días después de la aparición de la respuesta innata. Tanto los linfocitos T como los B al activarse se subdividen en dos células: las células efectoras y las de memoria. Las células de memoria no tienen capacidad efectora, pero cuando se activan por infecciones posteriores se dividen rápidamente en células efectoras que llevan a cabo la respuesta inmune y se dividen también en nuevas células de memoria. Las células de memoria presentan una gran longevidad (Tortora y Derrickson, 2018).

3.2.1. Relación entre inflamación, células mononucleares y HSA

Como se ha visto en el apartado 1.1, la HSA ha sido de manera clásica asociada a la aparición del vasoespasmo centrandó el foco sobre la vasorreactividad arterial. Recientemente el papel del sistema inmunitario ha tomado también relevancia en la fisiopatología de esta enfermedad.

Cuando se rompe el aneurisma (1) se libera sangre en el espacio subaracnoideo generando un depósito de hemoglobina (2). Esta molécula fuera del torrente circulatorio resulta tóxica y ha de ser retirada por lo que su liberación induce la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio atrayendo a neutrófilos y monocitos (3). Estas células de la inmunidad innata acuden al lugar donde se ha producido el daño, se adhieren al endotelio (4a, 4b) y trasmigran hacia el tejido dañado (4c, 4d) donde fagocitan la hemoglobina del medio (5). Tras haber realizado la fagocitosis permanecen en el tejido varios días hasta su degradación generando daño en el tejido debido a la liberación de citoquinas, radicales libres y endotelinas (6). A su vez, la liberación de estas sustancias también induce la generación de vasoespasmo en las arterias (Chaichana y cols., 2010) (Figura 11).

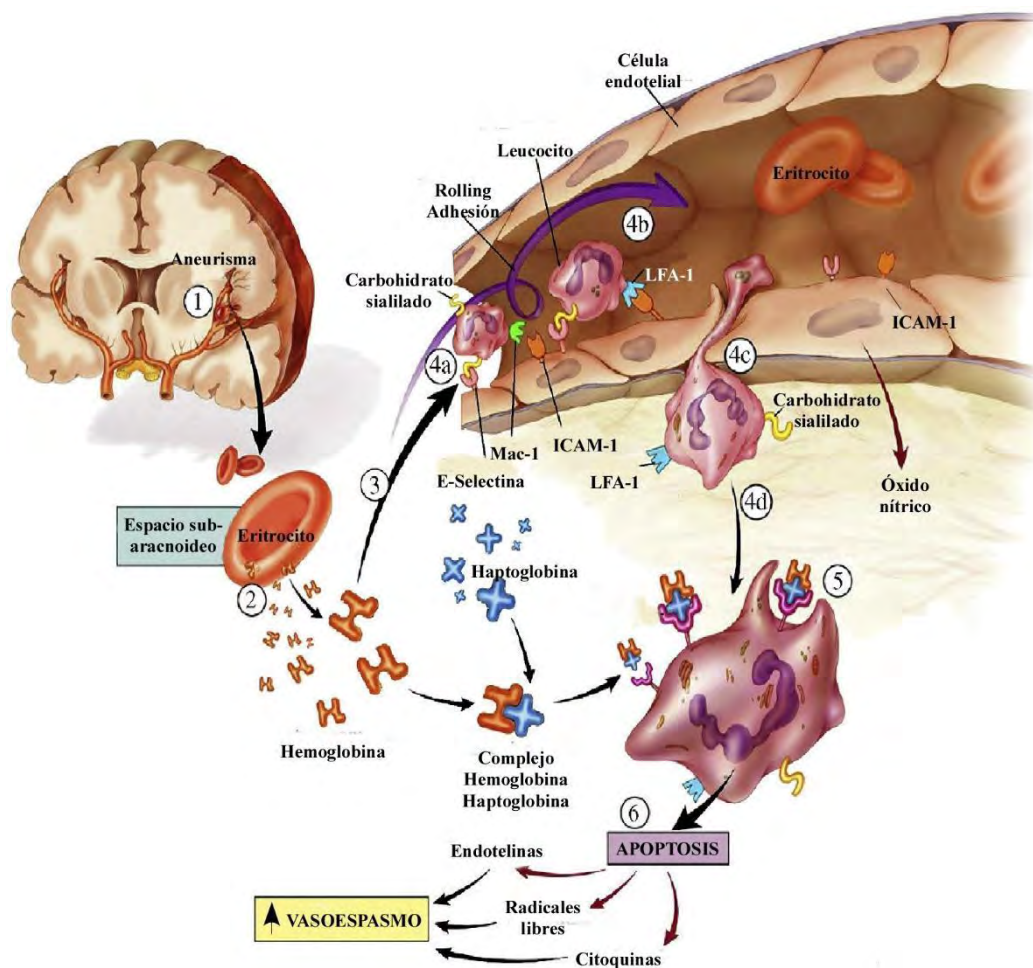


Figura 11. Proceso de adhesión, transmigración y actuación de leucocitos circulantes tras la liberación de sangre debido a la rotura de un aneurisma. Modificado de Chaichana y cols., (2010).

Existe poco conocimiento sobre el papel del sistema inmune adaptativo en el tejido dañado y su implicación patológica asociada al vasoespasmo (Coulibaly y Provencio, 2020). Se han detectado linfocitos T y B infiltrados en la pared arterial donde ha tenido lugar la rotura del aneurisma (Lucke-Wold y cols., 2016), aunque se ha descrito la presencia de inmunosupresión en pacientes que habían sufrido una HSA con respecto a controles. Diferentes estudios han identificado un descenso de células linfoides en la sangre periférica de estos pacientes con respecto a los controles, sin que los monocitos presenten cambios. Mediante estudios de expresión génica se ha detectado una regulación negativa de genes implicados en la activación de células linfoides acompañada de una regulación positiva de genes implicados en la activación de la respuesta inmune (Korostynski y cols., 2019; Pera y cols., 2013; Sarrafzadeh y cols., 2011). A pesar de esto, se ha descrito que, aunque hay un recuento bajo de células linfoides en la sangre periférica de estos pacientes su estado de activación es mayor que el de individuos controles (Moraes y cols., 2015).

La dinámica del citoesqueleto, junto con la participación de la ruta de RhoA/ROCK, juega un papel importante en lo referente al proceso de adhesión celular al endotelio. Esta ruta ha sido señalada como reguladora en los procesos de adhesión y migración de monocitos y linfocitos a través del control de los filamentos de actina del citoesqueleto (Honing y cols., 2004; Vicente-Manzanares y cols., 2003). En concordancia con estas observaciones, resultados recientes de nuestro laboratorio resaltan el incremento en la expresión de RhoA en pacientes con HSA con respecto a los controles, encontrándose en los pacientes una correlación entre la cantidad de daño y el nivel de expresión de RhoA. Además, existen diferencias significativas al cuarto día tras la HSA en la actividad de RhoA en pacientes encontrándose una mayor actividad GTPasa de RhoA en los pacientes que desarrollan vasoespasmo con respecto a los que no (González-Montelongo y cols., 2018).

OBJETIVOS

El trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral se centró en el estudio de las alteraciones en la funcionalidad vascular en un modelo de rata de HSA en un curso temporal prolongado (5-9 días) y en los cambios en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes. Así, los objetivos planteados fueron los siguientes:

1. Analizar el potencial de membrana en reposo y caracterizar las corrientes de K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje de los miocitos procedentes del polígono de Willis de un modelo animal de HSA.
2. Estudiar la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos del polígono de Willis aislados en modelo animal de HSA.
3. Analizar la participación de los LTCCs, RhoA/ROCK y PKC en arterias patológicas, y su posible participación en la vasorreactividad en la HSA.
4. Caracterizar histológicamente la pared de la arteria basilar de ratas con HSA.
5. Analizar los cambios en las PBMCs de pacientes con HSA en relación con la interacción de estas células con el endotelio y la expresión de sus moléculas de adhesión.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelo animal

1.1. Anestesia, procedimiento quirúrgico y estabulación.

En los experimentos llevados a cabo en modelo animal se han utilizado ratas Wistar macho con un peso aproximado de 450 g y seis meses de edad. Los animales fueron divididos en tres grupos experimentales: Control, Sham y HSA. Los grupos Sham y HSA fueron además subdivididos en días de seguimiento (días 1, 5, 7 y 9) cuando fue necesario. Todos los animales fueron tratados siguiendo la normativa de utilización de animales de experimentación, acordada por la Unión Europea en su directiva 2010/63/UE y publicada en España en el R.D. 53/2013.

Previamente a realizar la cirugía los animales fueron anestesiados con una mezcla de fármacos compuesta por: 96 µg/g de ketamina (Ketolar©, Pfizer, 50 mg/mL), 4,5 µg/g de xilacina (Rompun© 2 %, Bayer, 20 mg/mL) y 0,2 µg/g de atropina (Atropine Bayer©, 1 mg/mL). La dosis óptima para lograr un grado de sedación y analgesia adecuadas (2,5 µL/g) fue inyectada intraperitonealmente. Posteriormente, se afeitaron las regiones de la cabeza y el cuello junto con la parte superior de la cola y se fijaron los animales a un marco estereotáxico (Stoeling©) en posición decúbito prono. Durante la intervención se evaluó que la respiración y los grados de analgesia y anestesia fueran los adecuados.

Los modelos experimentales Sham y HSA se generaron utilizando agujas espinales 25G (BD Biosciences) y jeringas de 1 mL (BD Plastipak©) que fueron montadas sobre el brazo articulado del marco estereotáxico. Las agujas fueron introducidas en el cráneo con una inclinación de 35° con respecto a la horizontal a través del foramen magnum y de la membrana posterior atlanto-occipital hasta llegar a la cisterna magna, que se encuentra en la línea media a 16 mm posterior a Bregma (Figura 12). Posteriormente, se retiraron 100 µL de líquido cefalorraquídeo (LCR), siendo sustituidos por 100 µL de sangre autóloga no heparinizada procedente de la vena caudal, en el caso del modelo HSA. La sangre fue rápidamente inyectada para evitar la coagulación. Tras inyectar la sangre la incisión de la cola fue suturada con seda no reabsorbible, desinfectando la incisión con povidona yodada. Para la generación de animales Sham se siguió el mismo procedimiento sustituyendo el LCR por 100 µL de suero salino fisiológico (0,9 % NaCl). Tras la operación los animales se devolvieron a sus jaulas de almacenaje independientes para su recuperación y posterior estabulación en el área del animalario correspondiente. Los animales controles no fueron sometidos a ninguna cirugía. Se mantuvo una temperatura

estable entre los 23 °C y los 27 °C y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. La comida y el agua se administraron *ad libitum* antes y después de la cirugía (Muñoz-Sánchez y cols., 2012).



Figura 12. Detalle de la disposición de la rata durante la intervención quirúrgica para la inducción de la HSA. La aguja espinal es insertada con una inclinación de 35° a través de foramen magnum atravesando la membrana posterior atlanto-occipital para llegar a la cisterna magna.

1.2. Sacrificio y obtención de muestras

Los animales fueron sacrificados mediante desangramiento seccionando la aurícula derecha tras inducir una sedación profunda con una dosis letal de tiopental sódico. Posteriormente para acceder a las arterias cerebrales se realizó una incisión en la piel de la parte superior del cráneo, eliminando posteriormente la región ósea para tener acceso al cerebro. El cerebro completo con todas las arterias fue extraído y sumergido en solución Hank's a 4 °C. Posteriormente, las arterias inmersas en Hank's fueron limpiadas de tejidos cerebral y conjuntivo bajo una lupa binocular. El tipo y cantidad de arterias usadas fue distinto según cada experimento y el procesamiento posterior de las arterias dependió de la finalidad que fuesen a tener las muestras. Para experimentos funcionales las arterias fueron mantenidas con sus respectivas soluciones, mientras que para los experimentos de biología molecular las arterias se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

2. Muestras humanas

2.1. Criterios de inclusión de pacientes y cronología de extracción

Para la obtención de muestras procedentes de pacientes con HSA se incluyeron a aquellos que ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos Neurocríticos del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR). Los pacientes fueron reclutados en las primeras 24 horas posteriores al inicio de los síntomas y con evidencia de sangrado confirmado

mediante tomografía axial computerizada (TAC). Se excluyeron aquellos pacientes con HSA de origen traumático, secundaria a malformaciones arteriovenosas, neoplasias o discrasias sanguíneas, con aneurisma incidental, con episodios previos de HSA, con cualquier otra patología previa concurrente al sistema nervioso central, insuficiencia renal, imposibilidad de seguimiento a largo plazo o pacientes con tratamiento dislipémico previo, como estatinas, o antihipertensivo, como antagonistas del calcio. Las muestras fueron extraídas en las primeras 24 horas y en el día 5 tras la aparición de los síntomas. En los individuos controles se extrajo la muestra en día único.

Se recogieron además los siguientes datos de los pacientes: edad, sexo, y antecedentes personales de carácter clínico (hipertensión arterial, diabetes, dislipemia, cardiopatía, enfermedad respiratoria, hepatopatía, función renal, neoplasia y tratamientos antiagregantes y anticoagulantes).

2.2. Aislamiento de muestras y criopreservación

Las muestras de sangre periférica se extrajeron en tubos CPT (BD Vacutainer®) que contenían una solución 0,1 M de citrato de sodio. Se invirtió un rango entre 7 y 9 veces el tubo para evitar su coagulación y las muestras se procesaron de inmediato. Las muestras fueron centrifugadas 30 minutos a 1.800 Xg a temperatura ambiente para separar las PBMCs del resto de componentes de la sangre total. Una vez separados, el plasma y las PBMCs se aislaron independientemente. Las PBMCs posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS, centrifugando las células 15 minutos a 300 Xg a temperatura ambiente. Una vez lavadas eran contabilizadas y posteriormente congeladas en presencia de su propio plasma. Para criopreservar las células destinadas a experimentos de cocultivos estas fueron congeladas con DMSO al 10 % utilizando un dispositivo de congelación lenta y luego se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Las células utilizadas para experimentos de biología molecular se congelaron directamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El plasma sobrante se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

3. Técnicas electrofisiológicas y microfluorimétricas en VSMC dispersas de modelo animal de HSA

3.1. Preparación de muestras y dispersión celular

Con el fin de obtener VSMC dispersas para los experimentos de electrofisiología y de microfluorimetría se utilizaron las arterias cerebrales procedentes del polígono de Willis. Estas arterias fueron obtenidas una vez que el cerebro era extraído, se limpiaban en solución Hank's y posteriormente eran incubadas toda la noche a 4 °C en 1 mL de solución de dispersión con 1,16 mg/mL colagenasa tipo 1A (Sigma), 0,5 mg/mL de elastasa tipo III (Sigma) y 2,5 mg/mL de BSA fracción V (Sigma). El día del experimento las arterias eran incubadas a 30 °C durante 40 segundos y luego se las sometía a una dispersión mecánica suave mediante pipetas de vidrio de diverso calibre. Posteriormente, las células eran sembradas en cubres previamente flameados y se dejaban reposar durante 20 minutos para que estas se asentasen y adhiriesen a los cubres. Pasado este tiempo se observaba el aspecto de las células para evaluar su viabilidad para los experimentos.

3.2. Determinación del potencial de membrana en reposo (V_m) y de las corrientes dependientes de voltaje de Ca^{2+} y K^+ en células aisladas

Para registrar el V_m de las VSMC dispersas se utilizó un microscopio invertido Olympus IX70 junto a un amplificador EPC10 (HEKA) que incluía una tarjeta conversora AD/DA. El amplificador filtró la corriente a 2.9 kHz y se digitalizó en un intervalo de 10 a 500 μ s por punto dependiendo del protocolo de registro. Para el registro del voltaje se utilizó el programa PatchMaster (versión v2x73.3, HEKA) y para el análisis se usó el programa FitMaster (versión v2x90.5, HEKA).

Las micropipetas fueron elaboradas a partir de capilares de cristal de borosilicato (Sutter Instrument©). El vidrio fue estirado en un estirador horizontal P-1000 (Sutter Instrument©) obteniéndose dos micropipetas con resistencias en torno a los 3 M Ω .

Se utilizó la técnica de “*patch clamp*”, en modo de registro “*current clamp*” para medir el V_m de las VSMC. Para ello, se empleó una micropipeta de vidrio conectada al amplificador rellena de solución conductora interna que se acercaba a la célula a registrar. Cuando la micropipeta había tocado la célula se ejercía una ligera succión para generar una presión negativa dentro de la pipeta que formase un sello con la membrana de la célula del orden de 1 G Ω , alcanzando la configuración de “*cell attached*”. Llegados a este punto se compensaban las corrientes capacitativas antes de volver a succionar y romper

el sello, pasando a la configuración de registro de “*whole cell*”. Los valores de V_m que fueron adquiridos eran los inmediatamente posteriores a la apertura de la célula, para evitar la variación de este como consecuencia de la dialización del interior celular con el contenido de la micropipeta. Para determinar las corrientes voltaje dependientes se siguió el procedimiento anterior cambiando el modo de registro a “*voltage clamp*”.

3.3. Determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ en VSMC

Para la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ se ha utilizado el marcador fluorescente FURA 2-AM. Este marcador es un derivado del BAPTA y presenta la capacidad de unir Ca^{2+} con más afinidad que otros iones divalentes. Dicha molécula es capaz de permear al interior celular debido a la presencia del grupo acetoximetil éster, que es escindido por las esterasas celulares impidiendo su salida una vez esté dentro de la célula. Este marcador permite cuantificar los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ debido a que cuando se une el ion tiene lugar una alteración en la intensidad de fluorescencia emitida. Presenta una emisión máxima a una longitud de onda (λ) aproximada de 510 nm y muestra dos franjas de excitación diferentes, una de 250 nm a 360 nm y otra de 360 nm a 410 nm dependiendo de la $[Ca^{2+}]$ del medio. Cuando no hay Ca^{2+} en el medio y la molécula no se encuentra unida al ion presenta un pico máximo de absorción a 380 nm con una intensidad de absorción del 45 % y un pico máximo de emisión a 510 nm con una intensidad cercana al 40 %. No obstante, cuando hay Ca^{2+} y la molécula se le une el espectro de absorción es desplazado encontrando su pico de absorción máximo próximo a los 340 nm con una intensidad de absorción cercana al 100% y una intensidad de emisión también próxima al 100 % (Figura 13A). De esta forma para medir la $[Ca^{2+}]_i$ se eligen estas dos longitudes de onda (340 y 380 nm) ya que presentan una mayor sensibilidad a los cambios en la concentración del ion. Cuando el marcador es excitado a 340 nm la intensidad de emisión es proporcional a la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que al excitar a 380 nm la intensidad de la señal es inversamente proporcional a la concentración del ion. Estos intervalos se delimitan a 360 nm donde para cualquier $[Ca^{2+}]_i$ hay una misma intensidad de emisión, es el llamado punto isobéctico (Figura 13B). La existencia de ambos perfiles de absorción/emisión diferentes permite obtener dos registros complementarios simultáneos y realizar un cociente de la fluorescencia emitida cuando se excita con ambas longitudes de onda. Este cociente (F_{340}/F_{380}) es llamado indicador ratiométrico, que proporciona un valor que es proporcional a la $[Ca^{2+}]_i$ (Grynkiewicz y cols., 1985).

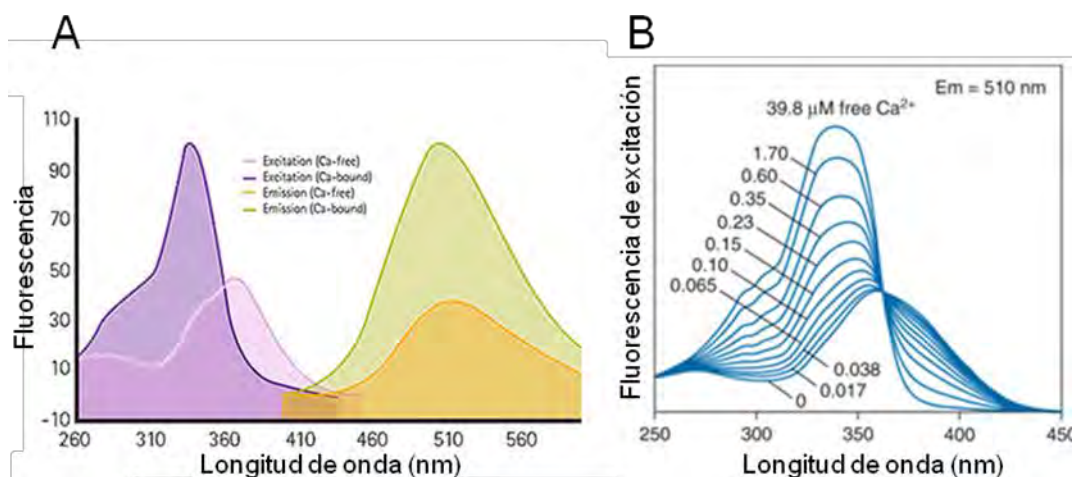


Figura 13. Espectros de excitación y emisión del Fura-2AM. A) Espectros de excitación y emisión del Fura-2AM en condiciones de ausencia y saturación de Ca^{2+} . B) Espectro de excitación del Fura-2AM para una emisión fijada a 510 nm en presencia de $[Ca^{2+}]$ crecientes. Tomado de Revilla-González, (2015).

El registro de la fluorescencia que emiten las células se realizó con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 acompañado de un policromador Policrome V (TILL Photonics) como sistema de excitación y una cámara CCD Orca-Flash 4 (Hamamatsu) para detectar la fluorescencia emitida por el marcador. Las longitudes de onda de excitación emitidas por el policromador fueron conducidas por una fibra óptica hasta el microscopio y reflejadas hacia la muestra por un espejo dicróico BSP430 situado en el cubo de filtros del microscopio. El haz de excitación pasaba a través del objetivo hacia la muestra que generaba un haz de emisión al ser excitada. Este era conducido de vuelta al cubo de filtros donde atravesaba el espejo dicróico pasando a través de un filtro de emisión ET510/80 (Chroma), que permitía el paso de longitudes de onda entre 470 nm y 550 nm. Dicho haz era reconducido mediante espejos hasta la cámara CCD o hasta los oculares para permitir el registro y la visualización de la muestra (Figura 14). La información que procedía de la cámara era analizada con el programa Acucosmos 2.6 (Hamamatsu), con un intervalo de muestreo de 500 ms.

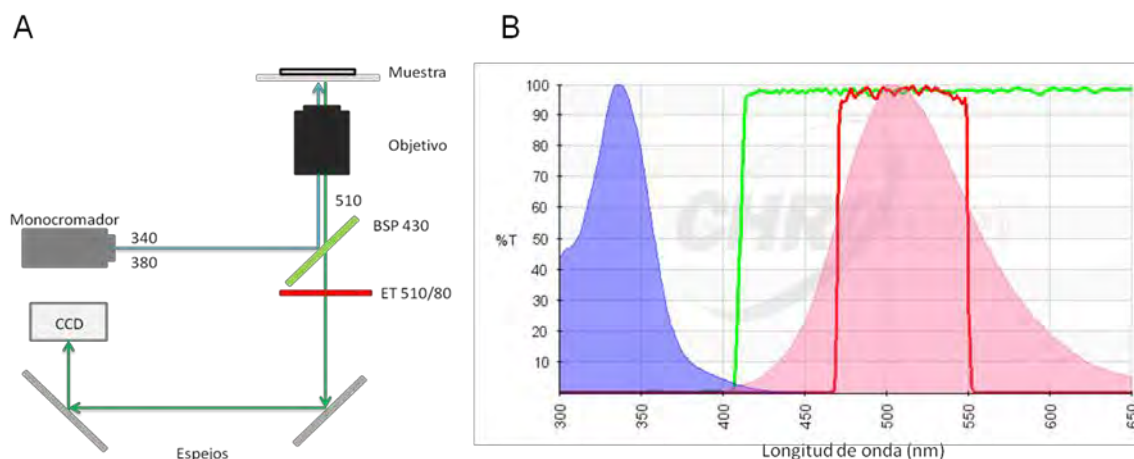


Figura 14. Camino óptico de la excitación y emisión. A) Esquema de epifluorescencia y disposición de los elementos del cubo de filtros (dicroico BSP430 y filtro de emisión ET510/80). B) Espectros de absorción (azul) y emisión de Fura-2AM saturado de Ca^{2+} (rojo) junto a la transmitancia del dicroico (verde) y del filtro de emisión (rojo). Tomado de Revilla-González, (2015).

Para poder realizar los registros, las VSMC se cargaban con FURA-2 AM. Para ello, tras dejarlas asentar después de su dispersión sobre los cubres, las células eran sumergidas en solución de dispersión con $1 \mu\text{M}$ de FURA-2 AM durante un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Tras esta incubación los cubres eran de nuevo sumergidos en solución de dispersión y mantenidos en oscuridad para minimizar la pérdida de fluorescencia. Los cubres fueron situados en una cámara, situada en la pletina del microscopio sobre el revólver de objetivos. Esta era continuamente perfundida por las soluciones PSS control o con distintas $[\text{K}^+]$ (tabla 1) en presencia o ausencia de los distintos fármacos disueltos. Estas se eliminaban mediante un equipo de vacío.

Solución	Composición iónica	V_m teórico
Control	140 mM Na^+ , 2,7 mM K^+ y 144,5 mM Cl^-	-47,7 mV
10K	132,7 mM Na^+ , 10 mM K^+ y 144,5 mM Cl^-	-40,4 mV
20K	122,7 mM Na^+ , 20 mM K^+ y 144,5 mM Cl^-	-35,1 mV
30K	112,7 mM Na^+ , 30 mM K^+ y 144,5 mM Cl^-	-31,3 mV
50K	92,7 mM Na^+ , 50 mM K^+ y 144,5 mM Cl^-	-24,6 mV
70K	72,7 mM Na^+ , 70 mM K^+ y 144,5 mM Cl^-	-19,3 mV

Tabla 1. V_m teóricos alcanzados con el uso de soluciones despolarizantes mediante reemplazo isosmótico de la $[\text{K}^+]_e$.

4. Experimentos funcionales en anillos arteriales de modelo animal de HSA

La determinación de la fuerza isométrica de las arterias permite determinar la vasorreactividad arterial en presencia de diferentes estímulos. Esta fuerza se produce

cuando las fibras se contraen sin producir un acortamiento del músculo. Para registrar dicha fuerza se montaron anillos arteriales en un miógrafo de cable Mulvany-Halpern 610M (Danish Myo Technology) que utilizaba el programa AcqKnowlegde 3.8.1.

4.1. Preparación, montaje y normalización de muestras en miógrafo de cable

Para estos experimentos se utilizó la arteria basilar. Tras realizar la limpieza de la arteria de tejido conjuntivo se cortó en anillos de 2 mm de longitud para montarlas en el miógrafo. Durante el procedimiento de limpieza y montaje en hilos de acero de 40 μm los anillos estaban inmersos en solución Hank's. Una vez que los hilos de acero habían sido pasados por el interior de los anillos estos eran dispuestos en las cámaras del miógrafo fijándolos a ambos cabezales de la cámara. Uno de los cabezales está conectado a un micrométrico que permite controlar la distancia entre los soportes y medir la circunferencia del vaso. El otro cabezal está unido a un transductor de fuerza para registrar la fuerza que desarrolla el vaso. En las cámaras los anillos arteriales se encontraban sumergidos en solución Krebs's control (control) que era burbujeada permanentemente con carbógeno (5 % CO_2 y 95 % O_2) a una temperatura de 30 °C (Figura 15). Tras el montaje (tal y como indica el manual del fabricante), los anillos permanecían durante 30 minutos sin aplicación de ninguna fuerza para su estabilización antes del proceso de normalización.

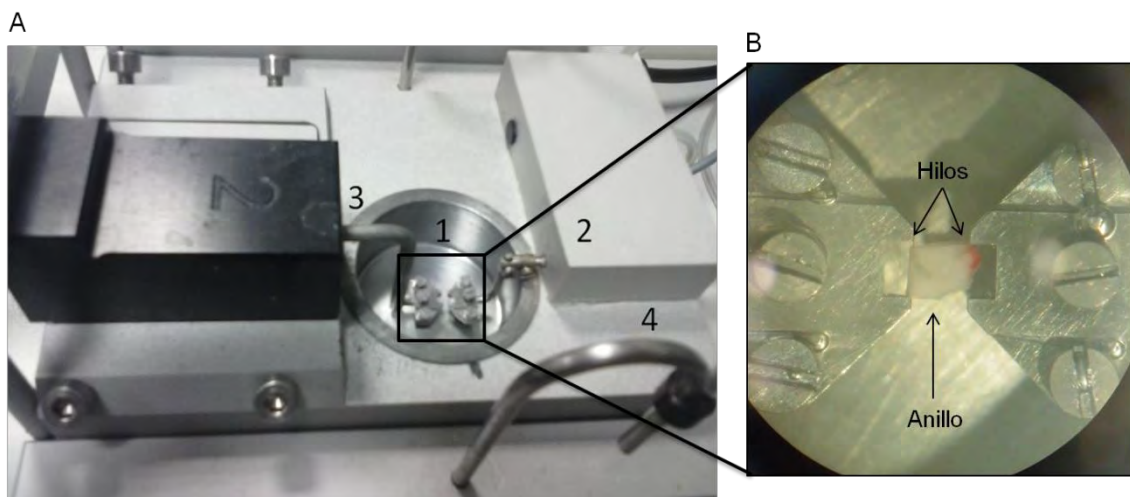


Figura 15. Cámara del miógrafo Mulvany-Halpern 610M. A) Estructuras principales: 1) Cámara de incubación. 2) Cabezal unido a un dinamómetro. 3) Cabezal unido a un micrómetro. 4) Sistema de perfusión de carbógeno y vacío. B) Detalle de la cámara donde se sumergen los anillos arteriales. Tomado de Revilla-González, (2015).

La normalización es un proceso consistente en la determinación de la tensión basal a la que deben mantenerse los anillos para producir una respuesta óptima. Ésta se corresponde con el 90 % de la tensión a la que estaría sometido un anillo con una presión transmural de 100 mm Hg (Mulvany y Halpern, 1977). Tras este procedimiento los anillos se dejaron estabilizar al menos 50 minutos antes de realizar los experimentos.

4.2. Abordaje experimental y farmacológico

Antes de realizar los experimentos todos los anillos fueron sometidos a dos pulsos de 5 minutos con solución Kreb's 70 mM K⁺ (70K) con objeto de comprobar su viabilidad y reactivar sus propiedades mecánicas y contráctiles. Cada pulso estuvo separado un total de 5 minutos por lavados con solución Kreb's control (ver composición en el apartado 10). Después de que los anillos hubieran recuperado su fuerza basal, tras los lavados, se aplicaron las soluciones 70K o Kreb's 30 mM K⁺ (30K) según el experimento a realizar. Cada solución despolarizante era aplicada durante 15 minutos previamente a la aplicación de los fármacos, que fueron añadidos a las soluciones de alto potasio para evaluar su efecto inhibitor. Durante esta parte del experimento los lavados de los fármacos se realizaron con la solución de alto potasio correspondiente. Tras aplicar los fármacos y evaluar su efecto, los anillos se lavaban con solución Kreb's de alto K⁺ para comprobar su viabilidad. Al finalizar el experimento los anillos se lavaban con solución Kreb's control con objeto de asegurar su recuperación tras la despolarización mantenida. Las soluciones se mantuvieron burbujeadas con carbógeno a 30 °C y se retiraban de las cámaras mediante un sistema de vacío.

Se utilizaron los siguientes inhibidores para actuar sobre las distintas rutas: GFX (inhibidor de la ruta de PKC), Fasudil (inhibidor de la ruta de RhoA/ROCK) y Nifedipina (inhibidor de los canales de calcio tipo L). Los stocks estaban disueltos en DMSO.

5. Análisis histológico de arterias basilares de modelo animal de HSA

5.1. Sacrificio, perfusión y fijación del animal

Para fijar el tejido preservando su estructura con el mínimo daño se realizó el protocolo de perfusión de los animales con paraformaldehído al 4 % (PFA 4 %) en PBS (Sigma-Aldrich®) desarrollado en (Revilla-González, 2016) . Previamente a la perfusión de los animales estos se sedaron mediante una inyección intraperitoneal de tiopental sódico en una dosis letal. A continuación, se practicó la apertura de la caja torácica y se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja conectada a un sistema de perfusión FH100 (Thermo

Fisher Scientific Inc.). Tras realizar una incisión en la aurícula derecha se perfundió PBS a 37 °C para retirar la sangre a una velocidad de perfusión de 45 rpm. Posteriormente, se siguió la perfusión con PFA 4 % a 37 °C para proceder a la fijación de los tejidos. Se estableció un grado correcto de fijación cuando se habían producido contracciones tetánicas a lo largo del cuerpo y se detectaba rigidez tanto en los músculos como en las vísceras.

Tras realizar la fijación se extraía el cerebro de los animales perfundidos realizando una incisión en la piel sobre el cráneo y retirando la parte superior del mismo. Después se mantenían en PFA 4 % toda la noche a 4 °C para proseguir con el proceso de fijación.

5.2. Cortes histológicos y tinciones

Tras la fijación los cerebros fueron cortados en planos coronales de 2 mm tomando como punto de partida el final de los bulbos olfatorios (Bregma + 5 mm). Estas secciones se incluyeron en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de las secciones desde Bregma -11 mm hasta -17 mm. De cada sección se realizaron tres cortes consecutivos de 5 µm, tras los que se descartaba una región de 50 µm hasta el próximo corte. Se obtuvieron así 15 cortes de cada sección que se colocaron en portaobjetos para su tinción (Figura 16). Las referencias anatómicas se tomaron de acuerdo a una rata de entre 250 a 350 g (Paxinos y Watson, 1986).

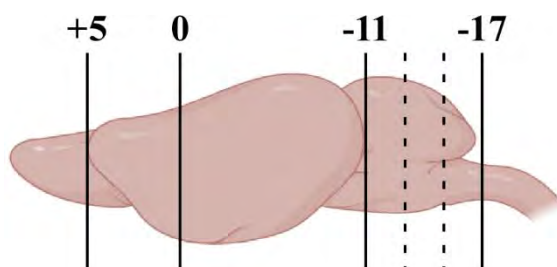


Figura 16. Detalle representativo de las referencias anatómicas de los cortes histológicos. La numeración indica las coordenadas de referencia desde Bregma. Las líneas discontinuas representan las secciones de 2 mm de grosor de las que se realizan los cortes histológicos consecutivos. Creado en BioRender, (2021).

5.2.1. Tinción tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson siguió el siguiente protocolo:

- Hidratación:
 - 2 x 20 minutos en xileno.
 - 2 x 3 minutos en etanol al 100 %.
 - 2 x 1 minuto en etanol al 96 %.

- 2 x 1 minuto en etanol al 70 %.
- Incubación con hematoxilina férrica según Weigert durante 10 minutos.
- Lavado abundante con agua corriente durante 5 minutos.
- Incubación con fucsina ácida durante 15 minutos.
- Lavado con agua destilada.
- Incubación con ácido fosfotúngstico durante 15 minutos.
- Retirar sin enjuagar.
- Incubación con azul de anilina durante 10 minutos.
- Incubación con solución concentrada de ácido acético durante 2 minutos.
- Deshidratación:
 - Inmersión en etanol al 70 %.
 - Inmersión en etanol al 96 %.
 - Inmersión en etanol al 100 %.
 - 3 minutos en etanol al 100 %.
 - 2 x 5 minutos en xileno.

Después de haber dejado evaporar el xileno, las preparaciones se montaron con un cubreobjetos utilizando el medio de montaje Mounting medium Acrytol (Leica).

5.3. Visualización microscópica de tejidos y análisis de los resultados

Las imágenes fueron visualizadas y adquiridas con un microscopio Olympus BX61 utilizando el programa cellSens (Olympus Corporation©). Las imágenes se adquirieron en campo claro a 40 aumentos (40X).

Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ v1.53g (NIH). Mediante este programa se procedió al análisis de las áreas y al conteo de núcleos de los cortes histológicos. Para realizar medidas precisas y trasladables el programa es calibrado con la distancia real para ofrecer los datos en unidades de distancia (μm).

6. Técnicas de biología molecular en arterias de modelo animal de HSA y en muestras de pacientes

6.1. Estudio de proteínas de tejido arterial murino mediante western blot

6.1.1. Obtención de extractos proteicos

La extracción de proteínas se realizó a partir de las arterias de la superficie del cerebro. Las arterias fueron congeladas tras su extracción hasta el momento de su uso. El proceso de limpieza de las arterias del tejido adyacente se realizó siempre a 4 °C. Para obtener los

extractos proteicos de las arterias se utilizó el kit comercial Sample Grinding kit (GE Healthcare) junto con el buffer de lisis para disgregar la muestra mediante abrasión con el pistilo y la resina provista por el kit durante 5 minutos. Tras ello, los extractos fueron centrifugados a 16.000 Xg durante 10 minutos a 4 °C para separar los restos celulares de los extractos. El sobrenadante fue traspasado a un tubo eppendorf y vuelto a centrifugar de nuevo en las mismas condiciones para asegurar la separación de los restos celulares. De nuevo el sobrenadante se traspasó a un eppendorf del que se separaban 5 µL para llevar a cabo la cuantificación y el resto se mantenía en el tubo, pudiendo ser inmediatamente congelado a -80°C o usado para seguir con el análisis de proteínas según fuera conveniente.

6.1.2. Cuantificación proteica en extractos tisulares

La cuantificación de los extractos se realizó mediante absorbancia siguiendo el método de Bradford realizando una curva patrón con concentraciones crecientes de BSA. Se utilizó un espectrofotómetro DU® 640 (Beckman) para realizar las mediciones y las concentraciones de los extractos se extrapolaron con la curva patrón. Se calculó el volumen necesario para cargar 50 µg de proteína y las muestras se completaban con tampón de carga 5X y con buffer de lisis hasta alcanzar los 25 µL de muestra. Tras esto las muestras fueron calentadas 5 minutos a 95°C con la finalidad de desnaturalizar las proteínas y luego mantenidas en hielo si se iba a continuar en ese momento con el western blot o congeladas a -20°C hasta su uso.

6.1.3. Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida (SDS-PAGE) y detección de proteína mediante western blot

Las proteínas fueron sometidas a electroforesis (SDS-PAGE) en geles de acrilamida al 10 % a 100 V a 4°C utilizando un tampón para electroforesis con un sistema Mini-Proteom (BioRad). Posteriormente fueron transferidas a membranas de PVDF (Amersham GE Healthcare), previamente activadas en metanol, en un sistema de transferencia húmeda (BioRad) con tampón de transferencia a 4°C durante 3 horas a 90 mA o toda la noche a 60 mA. A continuación, la membrana se incubó una hora con solución de bloqueo (leche desnatada al 5 %) a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana fue incubada toda la noche con los anticuerpos primarios en agitación a 4°C. Al día siguiente, se incubó con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se procedía al revelado de las bandas mediante el kit de revelado ECL (GE

Healthcare) y el sistema de cuantificación Chemidoc Touch (BioRad). El programa utilizado para analizar las imágenes fue Image Lab v5.2.1 (BioRad).

Los anticuerpos utilizados se detallan en la tabla 2:

Anticuerpos primarios		
Nombre	Casa comercial	Dilución
PKC α Monoclonal	BD Biosciences	1:1.000
RhoA Monoclonal (26C4)	Santa Cruz	1:250
α -tubulina monoclonal	Sigma-Aldrich	1:10.000
Anticuerpo secundario		
Nombre	Casa comercial	Dilución
ECL Antimouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody	GE Healthcare	1:10.000

Tabla 2. Relación de anticuerpos para detección de proteínas mediante Western Blot.

6.2. Extracción de RNA total procedente de tejido arterial

Para la extracción de RNA se utilizaron arterias de la superficie del cerebro de rata que habían sido extraídas en solución Hank's libre de RNAsas. Para ello el agua se trató con 100 μ L/L de dietil pirocarbonato (DEPC). Tras la extracción, las arterias fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C .

La extracción del RNA se realizó utilizando un politron PT4000 (Kinematica) para disgregar el tejido durante 5 segundos en el buffer de lisis RLT del kit RNeasy® Micro Kit (Quiagen). Tras disgregar el tejido las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugaron 3 minutos a 12.000 \times g para eliminar cualquier posible resto celular. Posteriormente el proceso de extracción se continuaba en la plataforma robotizada QIAcube (Quiagen) utilizando el protocolo de extracción para microRNAs para muestras procedentes de tejidos y células animales. Una vez extraído el RNA, se eluyó en 15 μ L de agua libre para RNAsas y se cuantificó en un dispositivo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para posteriormente ser congelado a -80°C .

6.3. Estudio de la expresión génica mediante microarray

El ARN se amplificó y marcó usando el kit GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). La amplificación se llevó a cabo con 100 ng de ARN total siguiendo los procedimientos descritos en el manual de usuario del kit. El ADNc amplificado fue cuantificado, fragmentado y marcado con el fin de prepararlo para la hibridación con GeneChip® Clariom S Rat Array (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los

arrays se lavaron y marcaron en una GeneChip® Fluidics Station 450 (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se escanearon con GeneChip® Scanner 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Por último, los resultados fueron analizados con el programa Transcriptome Analysis Console (TAC) v4.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Además, también se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento o empobrecimiento de genes utilizando el programa GSEA v4.1 (UC San Diego y Broad Institute) (Mootha y cols., 2003; Subramanian y cols., 2005). Para el enriquecimiento de genes se utilizaron las siguientes colecciones de *gene set*: *KEGG C2 v7.4*, *Reactome C2 v7.4*, *GO Biological processes C5 v7.4* y *GO Molecular Functions C5 v7.4*.

7. Cultivos celulares

En la realización de los experimentos de adhesión se utilizaron tanto PBMCs procedentes de pacientes con HSA como líneas celulares comerciales. Las PBMCs procedían de las muestras que eran extraídas de los pacientes que sufrían una HSA o de individuos controles y eran criopreservadas (ver protocolo de aislamiento y criopreservación de PBMCs en el apartado 2.2). Las líneas celulares comerciales fueron las siguientes: HUVEC, línea de células endoteliales humanas; Jurkat, línea de linfocitos T; y THP-1, línea de monocitos.

7.1. Procedimientos en cultivo de líneas celulares comerciales

7.1.1. Descongelación y mantenimiento de células HUVEC

Para poner en marcha el cultivo de células HUVEC se descongeló un vial con 1 mL de suspensión celular en un baño con agua a 37°C con una leve agitación durante un tiempo no superior a 2 minutos. Una vez descongeladas, las células se resuspendieron suavemente y se sembraron en dos frascos de cultivo de 25 cm² que contenían 5 mL de medio de cultivo EBM (CC-3121, Lonza) atemperado completado con Bulletkit (CC-3124, Lonza). Posteriormente los frascos de cultivo se conservaron en el incubador a 37°C y a un 5 % de CO₂ para permitir su crecimiento.

Las células HUVEC eran mantenidas cambiándoles el medio de cultivo cada dos días retirando el medio agotado y añadiendo 5 mL de medio EBM completo atemperado. Las células eran subcultivadas una vez a la semana cuando alcanzaban en torno al 80-90 % de la confluencia (contabilizándose en torno a 10⁶ células por frasco). Tras tripsinizarlas y contabilizarlas, se sembraban 5 x 10⁴ células en frascos de cultivo nuevos con 5 mL de medio EBM completo previamente atemperado. Las células eran de nuevo mantenidas en

el incubador a 37 °C y 5 % de CO₂. Para los experimentos de adhesión se utilizaron células que se encontraban entre los pases 2 y 7.

7.1.2. Descongelación y mantenimiento de las células Jurkat y THP-1

Debido al carácter de cultivo en suspensión de las líneas Jurkat y THP-1 los protocolos de descongelación y mantenimiento difieren del anterior.

Para proceder a arrancar los cultivos celulares se descongeló parcialmente un vial de cada línea en un baño a 37°C durante un tiempo no mayor a 2 minutos. El contenido de cada vial se vertió en un tubo Falcon con 8 mL de medio RPMI-1640 (21875-034, Gibco) completado con FBS al 10 % y con glutamina y penicilina/estreptomicina al 1 %. Los viales se enjuagaron con 1 mL de medio completo, que se transfirió a los tubos Falcon. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 400 Xg durante 10 minutos desechando el sobrenadante y resuspendiendo las células en 1 mL de medio completo. Finalmente se añadieron las células de cada tubo a un frasco de cultivo añadiendo hasta 10 mL con medio de cultivo completo y se mantuvieron a 37°C y 5 % de CO₂ en el incubador.

Ambas líneas celulares eran subcultivadas cuando se observaban signos de agotamiento del medio y de una amplia proliferación, aproximadamente cada tres días. Para ello se recogía el volumen completo de cada frasco en un tubo Falcon de 15 mL. Estos eran centrifugados a 200 g durante 5 minutos descartando posteriormente el sobrenadante y resuspendiendos en 1 mL de medio RPMI-1640 completo atemperado. Tras ello se procedía al contaje de cada suspensión celular y posteriormente se sembraban 5 x 10⁴ células en 10 mL de medio en frascos nuevos. Este procedimiento era repetido en tantos frascos como fueran necesarios para los experimentos y para mantener la línea. De nuevo los frascos se incubaban a 37°C y 5 % de CO₂.

7.1.3. Criopreservación de células

Se utilizó el mismo protocolo de criopreservación para las tres líneas celulares. En cada vial se congelaban 10⁶ células en un volumen final de 1 mL. De esta forma se añadía en el vial 0,9 mL de suspensión celular más 0,1 mL de DMSO. Este último era añadido frío para disminuir su toxicidad celular. Tras ello, los viales fueron congelados en un dispositivo de congelación lenta y pasadas 24 horas se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

7.2. Experimentos de adhesión al endotelio

Para estos experimentos se utilizó el kit CytoSelect™ Leukocyte-Endothelium Adhesion Assay CBA-210 (Cell Biolabs Inc.) basado en un sistema de cocultivo celular.

Se utilizaron placas de 96 pocillos que eran tratadas añadiendo 100 μ L de gelatina por pocillo utilizado. Posteriormente, esta era dejada incubarse a 37°C durante 1 hora tras lo que se lavaban los pocillos con PBS. Luego en estos pocillos se sembraron 5×10^4 células HUVEC y se ajustó el volumen del pocillo a 200 μ L de medio. Las células HUVEC se dejaron incubarse durante 48 horas para que formasen una monocapa en el interior de pocillo. Durante las 12 horas previas al experimento las células endoteliales podían ser tratadas, este aspecto se detallará específicamente en los siguientes subapartados según corresponda. En el momento de comenzar el experimento las células mononucleadas que se utilizaron se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 0,5 % de BSA libre de suero a una concentración de 10^6 células/mL. Posteriormente estas células fueron marcadas con el marcador fluorescente LeukoTracker a una concentración final de 1X y se dejaron incubarse durante una hora a 37°C. Tras esta incubación las células fueron centrifugadas a 1000 rpm retirando el sobrenadante y añadiendo después medio RPMI-1640 + 0,5 % BSA. Este proceso se repitió tres veces para retirar el exceso de colorante. Posteriormente, habiendo lavado con el mismo medio los pocillos de la placa que contenían las células endoteliales, se disponían las células mononucleadas sobre las endoteliales en la configuración que correspondiese según el experimento. Tras dejar cocultivar 1 hora, se procedía a lavar tres veces los pocillos para eliminar las células no adheridas y, por último, se procedía a lisar las células. La fluorescencia era leída con espectrofotómetro CLARIOstar (BMG LABTCH) (Figura 17).

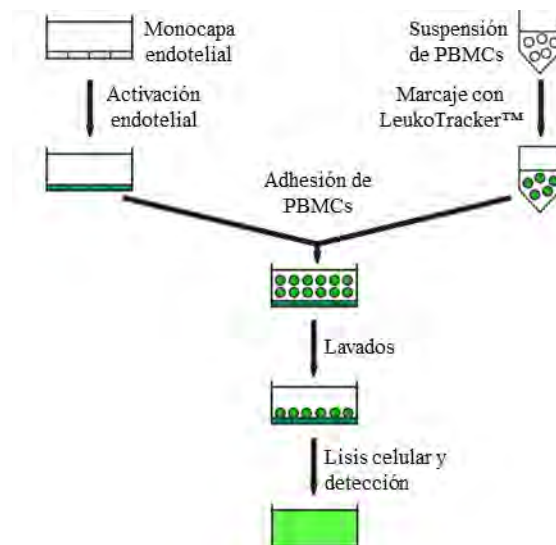


Figura 17. Esquema del protocolo del ensayo de adhesión Cytoselect™ Leukocyte-Endothelium (CBA-210). Modificado de Cell Biolabs.

7.2.1. Adhesión de PBMCs procedentes de pacientes a células endoteliales

En estos experimentos se quería comprobar la capacidad de adhesión intrínseca de las PBMCs procedentes de pacientes y controles. Para ello, las PBMCs utilizadas en este experimento se descongelaron previamente al experimento siguiendo el protocolo de descongelación para células en suspensión indicado en el apartado 7.1.2. Se utilizó medio DMEN + 0,5 % BSA. Se caracterizó la capacidad adherente de estas células de forma simultánea en condiciones de endotelio en estado basal y estimulado con 50 ng/mL TNF α durante las 12 horas previas al experimento.

7.2.2. Adhesión de líneas celulares a HUVEC inducida por plasma de pacientes

Para medir la inducción del efecto del plasma sobre el endotelio en la capacidad de adhesión de células mononucleadas las células endoteliales fueron tratadas con 200 μ L de plasma procedente de controles o pacientes durante las 12 horas previas al experimento. Se utilizaron células procedentes de las líneas Jurkat y THP-1 para medir la adhesión y evitar la variabilidad de las células procedentes de pacientes.

8. Inmunofenotipado de PBMCs por citometría de flujo

Para determinar qué linaje celular concreto de las PBMCs era el que incrementaba su adhesión en los pacientes con respecto de los controles, se llevó a cabo un inmunofenotipado de las células mediante citometría de flujo.

Las PBMCs que se habían adherido a las células HUVEC se lavaron dos veces con PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ para retirar estos iones del medio y favorecer su disociación. A continuación, se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente con Cell Dissociation Buffer Enzyme-Free PBS-based (13151-014, Gibco). Este buffer se aspiró suavemente y la placa se golpeó para separarlas mecánicamente sin alterar a las moléculas de la membrana plasmática. Tras ello, se resuspendieron en PBS y se incubaron con los anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se centrifugaron a 400 Xg durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 400 μ L de PBS. Para evaluar la expresión de cada marcador se utilizó un citómetro analizador LRS II Fortessa (BD). Los resultados fueron adquiridos mediante el programa BD FACSDiva v8 y analizados con FlowJo v.10.7.2.

A continuación, se detallan los anticuerpos utilizados para la tinción de marcadores específicos junto con el fluoróforo al que cada uno estaba conjugado (tabla 3). Todos los anticuerpos de citometría fueron adquiridos en BD Bioscience.

Anticuerpo	Fluoróforo
Mouse anti-Human CD45	APC-H7
Mouse anti-Human CD11b	APC
Mouse anti-Human CD14	FITC
Mouse anti-Human CD16	BV510
Mouse anti-Human CD3	PE-Cy7
Mouse anti-Human CD19	BV605
Mouse anti-Human CD11a	APC-R700
Mouse anti-Human CD162	BV421
Mouse anti-Human CD49d	PE-CF594
Mouse anti-Human CD62L	BV711
Mouse anti-Human CD43	PE
7AAD	

Tabla 3. Relación de anticuerpos para inmunofenotipado de PBMCs mediante citometría de flujo.

9. Análisis estadístico

Los datos están representados como la media \pm error estándar salvo para el recuento de células de pacientes, donde se utilizó la mediana y el rango intercuartílico (P₂₅-P₇₅). Las diferencias estadísticas se analizaron mediante el uso del programa informático SPSS versión 26 (IBM). Para determinar si las medias cumplían con una distribución normal se utilizaron los test de Saphiro-Wilk o Kolmogorov-Smirnov según fuese conveniente por el número de muestras. Así mismo, para determinar la existencia de igualdad entre las varianzas se utilizó el estadístico de Levene.

Cuando las medias cumplían con los criterios de normalidad y de homocedasticidad se utilizó el test de ANOVA de un factor para calcular las significaciones estadísticas entre los distintos grupos. Se utilizó el test de la *t* de Student cuando solo se realizó la comparación entre dos grupos muestrales.

Cuando las medias no cumplían los criterios de normalidad o de homocedasticidad se utilizó la prueba H de Kruskal-Wallis para determinar las significaciones estadísticas entre los distintos grupos. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney cuando solo se comparaban dos grupos independientes.

Cuando se medía la significación estadística de una misma variable medida en el tiempo se realizó estadística pareada. Cuando los grupos muestrales cumplían los criterios de normalidad y homocedasticidad se realizó la prueba t pareada. Cuando no cumplían estos criterios, se realizó el test de Wilcoxon.

Se ha considerado que las diferencias son significativas cuando p es inferior a: 0,05 (*), 0,01 (**) y 0,001 (***).

10. Soluciones y reactivos

Se detallan las composiciones en mM (a no ser que se indique unidad) de las soluciones utilizadas:

- Hank's: NaCl, 125; KCl, 5,36; KH_2PO_4 , 0,44; Na_2HPO_4 , 0,34; NaHCO_3 , 5; glucosa, 10; sacarosa, 1,45; HEPES, 10. pH: 7,4.
- PBS: NaCl, 137; KCl, 2,68; KH_2PO_4 , 17,6; Na_2PO_4 , 4,02. pH: 7,4.
- Solución de dispersión: se realiza a partir de Hank's, añadiendo MgCl_2 , 2 y CaCl_2 , 0,16.
- Solución interna para registro de V_m : KCl, 43; MgCl_2 , 1; NaCl, 13; HEPES, 5; K_2SO_4 , 60,5. pH: 7,2.
- Solución externa para registro de V_m : NaCl, 140; KCl, 2,7; CaCl_2 , 2,5; MgCl_2 , 1; HEPES, 10; glucosa, 5. pH: 7,4.
- Solución interna para registro de corrientes de Ca^{2+} : CsCl, 140; EGTA, 10; HEPES, 10; ATP-Mg, 4. pH: 7.
- Solución externa para registro de corrientes de Ca^{2+} : NaCl, 140; KCl, 4,7; BaCl_2 , 10; HEPES, 10; glucosa, 10. pH: 7,4.
- Solución interna para registro de corrientes de K^+ : glutamato- K^+ , 80; KCl, 50; MgCl_2 , 1; HEPES, 10; EGTA, 5; ATP-Mg, 4. pH: 7,2.
- Solución externa para registros de corrientes de K^+ : NaCl, 140; KCl, 2,5; HEPES, 10; glucosa, 10; CaCl_2 , 2,5; MgCl_2 , 4. pH: 7,4.

- PSS: NaCl, 140; KCl, 2,7; CaCl₂, 2,5; MgCl₂, 1; glucosa, 10; HEPES, 10. pH: 7,4. Las soluciones de alto potasio se realizaron sustituyendo isosmóticamente el NaCl por KCl.
- Kreb's: NaCl, 119; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,17; MgSO₄, 1,17; NaHCO₃, 24; glucosa, 5,5. Esta solución era burbujeada continuamente con carbógeno manteniendo el pH a 7,4. Las soluciones de alto potasio se realizaron sustituyendo isosmóticamente el NaCl por KCl.
- Buffer de lisis para proteínas: NaCl, 150; Tris-HCl, 50; PMSF, 1; inhibidor de proteasas, 10 µL/mL; triton X-100, 1 %. pH: 7,5.
- Tampón de carga: Tris-base, 250; SDS, 4 % (p/v); glicerol, 25 % (v/v); azul de bromofenol, 1 mg/mL. pH: 6,8. En el momento de ser utilizado se le añade β-mercaptoetanol 5 % (v/v).
- Tampón para gel compactador: Tris-base, 125 mM, SDS 0,1 % (p/v); acrilamida/bisacrilamida (29:1), 10 % (v/v); persulfato de amonio, 0,15 % (p/v); TEMED, 0,04 % (v/v). pH: 6,8.
- Tampón para gel separador: Tris-base, 375; SDS, 0,1 % (p/v), acrilamida/bisacrilamida (29:1), 5 % (v/v); persulfato de amonio, 0,01 % (p/v); TEMED, 0,01 % (v/v). pH: 8,8.
- Tampón de electroforesis: Tris-base, 25; SDS, 0,1 % (p/v); glicina, 192.
- Tampón de transferencia: Tris-base, 15; glicina, 120; metanol, 20 % (v/v).
- PBS Tween 0,05 % (v/v): usado para el lavado de las membranas de western blot. Se añade 0,5 mL de Tween 20.
- Solución de bloqueo: usada para bloquear membranas de western blot. Se añade leche en polvo desnatada 5 % (p/v) en solución PBS Tween 0,05 %.

Todos los reactivos para soluciones y fármacos se adquirieron en Sigma-Aldrich. El FURA-2AM se adquirió en Thermo Fisher Scientific. Los medios de cultivo y aditivos se adquirieron en Lonza y Gibco. Los kits de adhesión fueron comprados en Cell Biolabs. El kit de extracción de ARN fue proporcionado por Quiagen. Los reactivos para western blot fueron proporcionados por BioRad. Los anticuerpos para citometría se adquirieron en BD Biosciences.

RESULTADOS

Los resultados expuestos en el siguiente trabajo se centran en los acontecimientos fisiopatológicos que tienen lugar en el contexto de la HSA. Estos se dividen en dos grandes capítulos según hayan sido estudiados en modelo animal o en humanos. Dicha división se debe a las características y tipología de cada abordaje experimental, realizándose en modelo animal aquellos experimentos donde no fue posible la obtención del tejido humano necesario para su realización, por ser incompatible con la vida.

El primer capítulo (apartados 1-6) se enfocó en el estudio de la respuesta vascular y la alteración fisiopatológica que generan las arterias cerebrales de rata Wistar tras haber inducido una HSA en los animales. Para llevar a cabo la inducción de la HSA se siguió el protocolo quirúrgico descrito por Muñoz-Sánchez *y cols.* (2012) y detallado en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos. Se realizaron abordajes de electrofisiología, microfluorimetría y miografía para la caracterización funcional de las arterias expuestas a HSA; abordajes de proteómica y transcriptómica para la caracterización de expresión de distintos genes y rutas moleculares; e histología para la determinación de la estructura vascular. Todas estas técnicas se llevaron a cabo durante un curso temporal (de 1 a 9 días tras la HSA) con el objetivo de conocer los cambios ocurridos a través del tiempo y su evolución.

El segundo capítulo (apartados 7-9) se centró en la descripción del papel fisiopatológico de las PBMCs procedentes de pacientes que han sufrido una HSA. Las muestras de pacientes fueron obtenidas al primer y quinto día tras la HSA. Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* de adhesión en cultivo, para caracterizar su grado de adherencia a endotelio, e inmunofenotipado mediante citometría de flujo para determinar las subpoblaciones de PBMCs que participan y se alteran en el contexto de la HSA, así como la expresión de distintas moléculas de adhesión.

CAPÍTULO I: Estudio de la respuesta vascular y alteraciones fisiopatológicas en arterias de modelo animal de HSA

1. Caracterización electrofisiológica de miocitos del polígono de Willis procedentes del modelo animal de HSA

Como ha sido descrito en el apartado 1.1 de la introducción, varios días después de que la HSA haya tenido lugar se produce el fenómeno de vasoespasmo en las arterias cerebrales. Éste causa el estrechamiento de las mismas y la disminución de la irrigación cerebral, pudiendo ocasionar el DCR.

Con el objetivo de estudiar la posible alteración funcional de dichas arterias se plantearon experimentos de electrofisiología para caracterizar los miocitos de las arterias que conforman el polígono de Willis. En ellos se estudió el V_m en reposo de estas células en condiciones basales y, posteriormente, las corrientes de Ca^{2+} y K^+ dependientes de voltaje.

1.1. Potencial de membrana en reposo

Estudios previos llevados a cabo por otros investigadores (F. Wang y cols., 2015; Waters y Harder, 1985; D. Zhao y cols., 2020) en diferentes modelos animales han puesto de manifiesto que, de forma secundaria a la HSA, se produce una despolarización de los miocitos de las arterias cerebrales. Estos se encuentran en consonancia con resultados previos en nuestro laboratorio (Revilla-González, 2016), que son ampliados y actualizados en el presente apartado.

Como se detalla en el apartado 3.2 de Materiales y Métodos, para medir el V_m de los miocitos se utilizó la técnica de “*patch clamp*”, en modo de registro “*current clamp*” y en configuración de “*whole cell*”. Se ha llevado a cabo la caracterización de la evolución temporal del V_m correspondiente al período durante el que se produce el DCR (días 5 a 9). La figura 18 muestra registros representativos de los distintos grupos experimentales en los distintos días de seguimiento, junto al análisis estadístico. Se aprecia que no existían diferencias significativas entre el grupo Control ($V_m = -51,58$ mV) y los diferentes grupos Sham en los días 5, 7 y 9 tras la inducción de la HSA ($V_m = -56$ mV, $-51,9$ mV y $-48,44$ mV, respectivamente). Sin embargo, existían diferencias significativas en los grupos HSA en los días 5 y 7 ($V_m = -37,75$ mV y $-28,41$ mV, respectivamente) con respecto a sus grupos Sham correspondientes y al

grupo Control, además de existir también diferencias significativas entre estos dos grupos. Por el contrario, dichas diferencias desaparecieron en el grupo HSA al día 9 ($V_m = -51,23$ mV), al restablecerse un valor de V_m similar al del Control y los grupos Sham. Por tanto, confirmamos que, en nuestro modelo animal, los miocitos de animales HSA en los días 5 y 7 tras la hemorragia poseen un V_m más despolarizado que sus respectivos grupos Sham y el grupo Control.

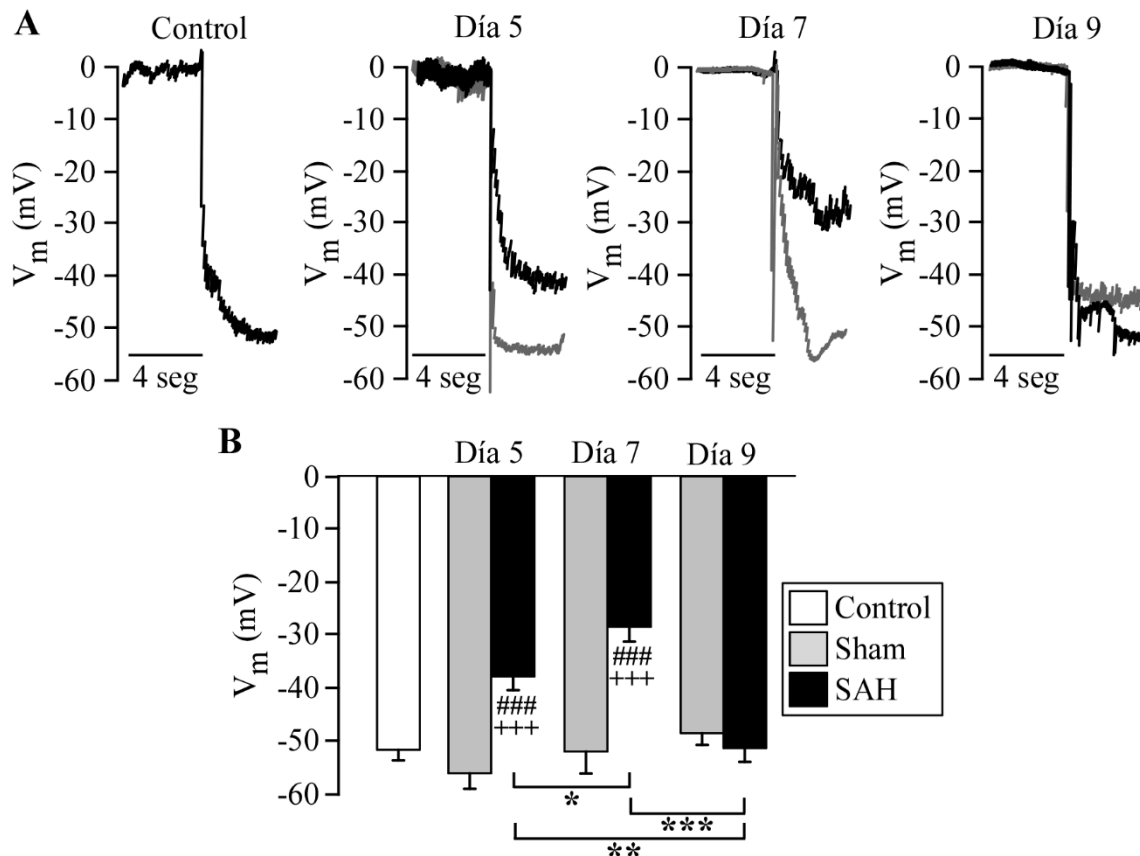


Figura 18. Potencial de membrana en reposo de miocitos aislados procedentes de arterias del polígono de Willis. (A) Registros representativos en distintos días de observación. Los días 5, 7 y 9 muestran registros de animales Sham (línea gris) y de animales HSA (línea negra). (B) Análisis estadístico del V_m en los distintos grupos. $n = 12$ células Control (6 animales), $n \geq 10$ células Sham (≥ 5 animales) y $n \geq 13$ células HSA (6 animales). *, **, *** $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ entre los distintos grupos de HSA; ### $P \leq 0,001$ HSA vs. Sham; +++ $P \leq 0,001$ HSA vs. Control.

1.2. Estudio de corrientes dependientes de voltaje de Ca^{2+} y K^+

Dado que en el apartado anterior se describió la despolarización de los miocitos pertenecientes a las arterias cerebrales expuestas a una HSA, se decidió realizar un estudio electrofisiológico de las corrientes de Ca^{2+} y K^+ dependientes de voltaje para estudiar su posible alteración. Este estudio fue realizado en el día 7 tras la HSA, al ser el momento en el que más se acentuó la despolarización de los miocitos.

Debido a que en estudios previos de nuestro laboratorio se observó que la Nifedipina abolía el incremento de la fuerza isométrica observado tras la normalización de anillos arteriales de animales HSA, se estudiaron distintos aspectos de las corrientes a través de los canales de Ca^{2+} (Figura 19). Para registrar las corrientes se sustituyó el Ca^{2+} por Ba^{2+} con el objeto de magnificar las corrientes ya que este ion permea mejor a través de los LTCCs. Se presentan registros representativos de “*voltage-clamp*” aplicando un pulso despolarizante de 20 ms de duración desde un V_m de -80 mV hasta +10 mV (panel A). La amplitud de la corriente del grupo Control, fue similar a lo descrito en tesis doctorales previas del laboratorio (Fernández-Tenorio, 2009; Porras-González, 2017). Se realizaron curvas I/V, normalizadas a la capacidad de la membrana, en respuesta a pulsos despolarizantes de 20 ms desde -40 mV hasta +40 mV, aplicados desde un potencial de reposo de -80 mV. Los miocitos HSA7d presentaron una menor amplitud con respecto a los miocitos Controles y Sham7d en el tramo de despolarización comprendido entre -10 y +20 mV. Sin embargo, las curvas correspondientes a los miocitos Controles y Sham7d presentaron valores más cercanos entre sí. Dada la magnitud del error de los distintos puntos de las curvas, no se observaron diferencias significativas a pesar de sí verse marcadas las tendencias. La densidad máxima de corriente se alcanzó a +10 mV en los tres grupos experimentales (Control= $-11,35 \pm 1,15$ pA/pF, Sham7d= $-12,36 \pm 1,57$ pA/pF y HSA7d= $-9,83 \pm 1,35$ pA/pF) (panel B). Se observó que existían diferencias significativas en la curva conductancia-voltaje (calculada a partir de la amplitud normalizada de la corriente de cola) entre los miocitos HSA7d con respecto a los Controles (panel C). Estas diferencias se situaron en el tramo de despolarización de -40 mV a -10 mV siendo de amplitud mayor en los miocitos HSA7d. Los valores de conductancia de los miocitos Sham se situaron próximos a los HSA7d en este tramo, pero sin existir diferencias significativas con ninguno de los otros grupos experimentales. Por otro lado, se estudió la inactivación de las corrientes de Ca^{2+} tras pulsos de 200 ms desde V_m de -80 mV hasta +10 mV (panel D). Estos resultados mostraron la existencia de una diferencia significativa en el porcentaje de inactivación entre el grupo Control y el Sham7d ($75,63 \pm 1,88$ % y $67,84 \pm 1,91$ %, respectivamente), al ser este segundo menor (panel E). El porcentaje de inactivación del grupo HSA se situó de forma intermedia a los otros dos ($72,16 \pm 2,54$ %), sin diferencias significativas con ninguno de ellos. Por último, también se midió la τ de inactivación. Aquí, los grupos Sham7d y HSA7d mostraron magnitudes similares mayores ($79,85 \pm 8,07$ ms y $78,43 \pm 8,25$ ms, respectivamente) que el

grupo Control ($65,77 \pm 3,84$ ms), pero solo existían diferencias significativas entre el grupo Control y el grupo Sham7d (panel F).

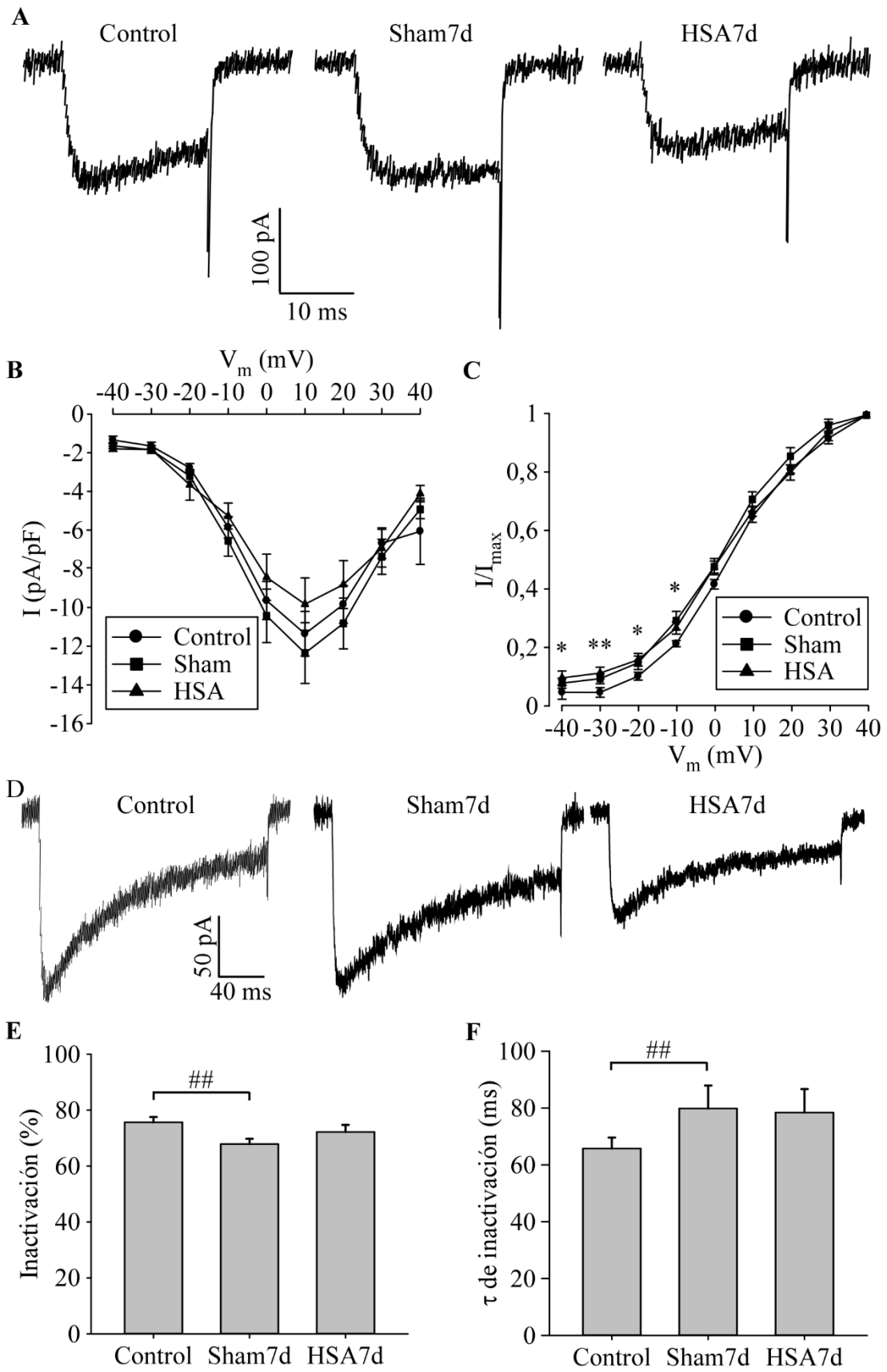


Figura 19. Caracterización de las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de miocitos aislados de las arterias del polígono de Willis. (A) Registros representativos de “*voltage-clamp*”. Pulso despolarizante de 20 ms desde V_m de -80 mV a +10 mV. (B) y (C) Curvas I/V y conductancia-voltaje. Se aplicaron estímulos de 20 ms desde -40 mV a +40 mV partiendo de un V_m de -80 mV. (D) Registros representativos obtenidos en respuesta a un pulso despolarizante de 200 ms desde V_m de -80 mV a +10 mV. Porcentajes (E) y τ (F) de inactivación obtenidos a partir de los pulsos mostrados en el panel D. $n \geq 22$ células Control (5 animales), $n \geq 28$ células Sham7d (8 animales) y $n \geq 25$ células HSA7d (7 animales). *, ** $P \leq 0,05, 0,01$ HSA7d vs. Control; ## $P \leq 0,01$ Sham7d vs. Control.

En la figura 20 se expone el estudio realizado sobre las corrientes de K^+ dependientes de potencial en miocitos de arteria basilar. En el panel A se muestran los registros representativos de las corrientes generadas en respuesta a un pulso despolarizante de 50 ms desde un V_m de -80 mV hasta +50 mV. El grupo Control presentó una mayor corriente de K^+ con respecto de los grupos Sham7d y HSA7d, situándose el grupo HSA7d con una corriente intermedia y el grupo Sham con la menor amplitud de corriente. En relación con las curvas I/V, en respuesta a estímulos de 50 ms desde -60 mV hasta los +50 mV, se observó la existencia de diferencias significativas entre la corriente del grupo Control con respecto a la del grupo Sham7d a 0 mV de despolarización, siendo mayor la corriente del grupo Control. Así mismo, existían también diferencias significativas entre el grupo Sham7d y el grupo HSA7d en el tramo de despolarización de 0 a +10 mV, siendo la corriente del grupo HSA7d de mayor amplitud. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre las amplitudes de la corriente en el tramo de despolarización desde +10 mV hasta los +50 mV. En el panel C se presenta la corriente normalizada en función del V_m . Se observó una conductancia del grupo HSA7d ($0,22 \pm 0,05$) significativamente mayor a la de los grupos Control y Sham7d ($0,12 \pm 0,02$ y $0,10 \pm 0,02$, respectivamente) a 0 mV (panel C). Por último, se muestran registros representativos de la inactivación de los canales de K^+ en los distintos grupos en respuesta a un pulso de despolarización de 500 ms desde un V_m de -80 mV hasta +50 mV (panel D). Se observó que existían diferencias significativas en el porcentaje de inactivación entre los grupos Sham7d y HSA7d que eran menores ($31,66 \pm 2,56$ % y $34,45 \pm 3,22$ %, respectivamente) con respecto del grupo Control ($45,33 \pm 2,49$ %) (panel E).

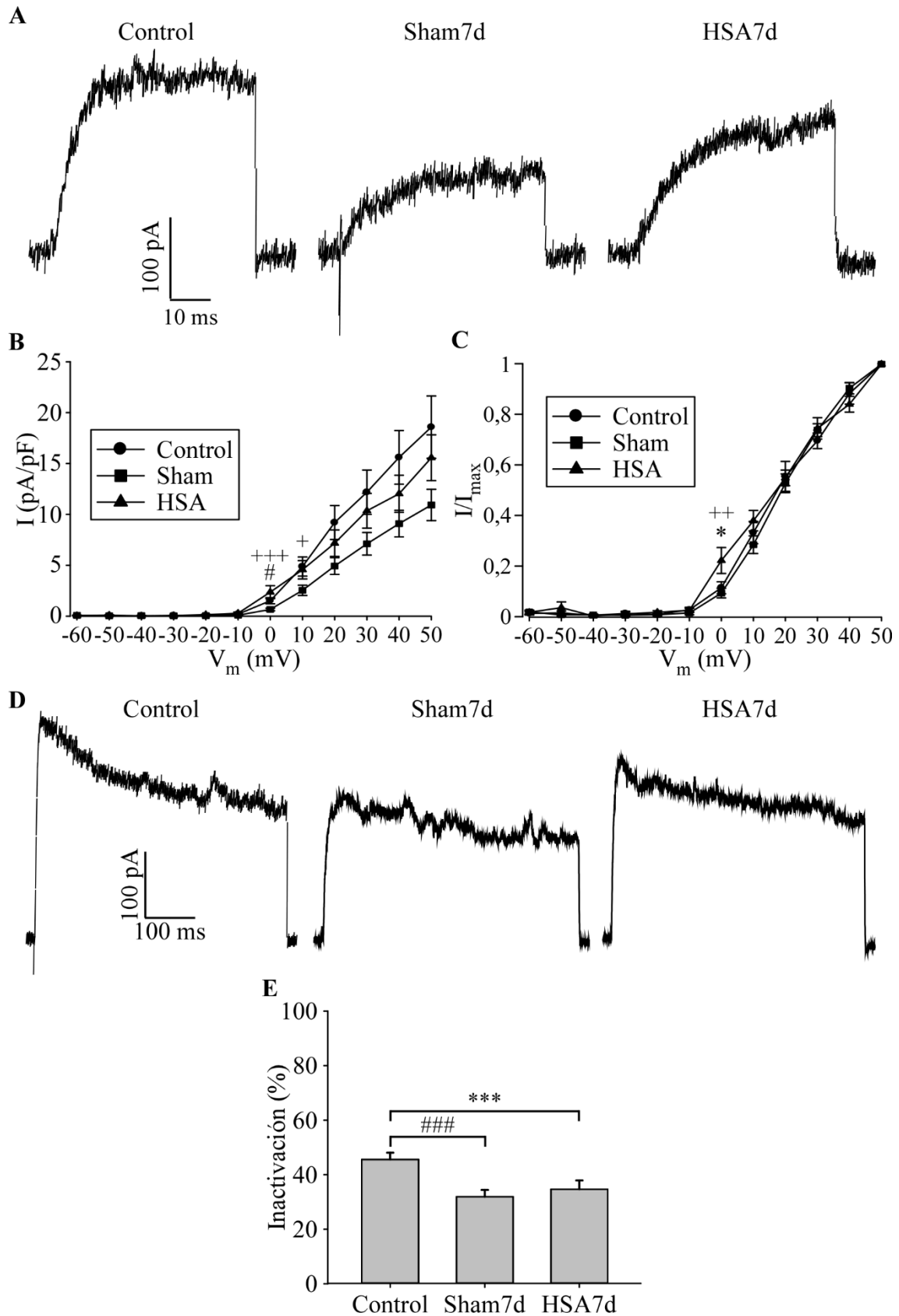


Figura 20. Caracterización de las corrientes de K^+ dependientes de voltaje de miocitos aislados de las arterias del polígono de Willis. (A) Registros representativos de “*voltage-clamp*”. Pulso despolarizante de 50 ms desde V_m de -80 mV a +50 mV. (B) y (C) Curvas I/V y de corriente normalizada. Se aplicaron

estímulos despolarizantes de 50 ms, partiendo de un V_m de -80 mV, desde -60 mV a +50 mV. (D) Registros representativos en respuesta a un pulso despolarizante de 500 ms desde V_m de -80 mV a +50 mV. (E) Porcentajes de inactivación durante el pulso de 500 ms. $n \geq 24$ células Control (5 animales), $n = 24$ células Sham7d (8 animales) y $n \geq 21$ células HSA7d (8 animales). *, *** $P \leq 0,05, 0,001$ HSA7d vs. Control; #, ### $P \leq 0,05, 0,001$ Sham7d vs. Control; +, ++, +++ $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ HSA7d vs. Sham7d.

En conclusión, con respecto a las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje el grupo HSA7d presentó una menor densidad de corriente normalizada con respecto a los otros grupos. Sin embargo, se halló una mayor conductancia significativa en el grupo HSA7d con respecto del Control en el tramo de -40 mV hasta -10 mV. Así mismo, los miocitos de los grupos Sham7d y HSA7d tenían menores porcentajes de inactivación con respecto al grupo Control y mayores τ de inactivación, aunque siendo solo significativos con respecto al grupo Sham7d.

Al respecto de las corrientes de K^+ , se encontró una mayor corriente normalizada en el grupo Control con respecto al Sham7d y al HSA7d, encontrándose diferencias significativas en el rango de despolarización de 0 mV a +10 mV. En este mismo tramo se produjo un aumento significativo de la conductancia en el grupo HSA7d frente al resto de grupos. Por último, el porcentaje de inactivación fue significativamente mayor en el grupo Control con respecto al resto de grupos.

2. Estudio de la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos aislados en modelo animal de HSA

Debido a que en el apartado anterior se observó una despolarización de los miocitos procedentes de arterias del polígono de Willis de animales HSA, con respecto a miocitos de los grupos Control y Sham, y a que también se observaron alteraciones a nivel de la conductancia al Ca^{2+} y a la corriente y conductancia al K^+ en este apartado, se decidió estudiar si la $[Ca^{2+}]_i$ pudiese estar alterada.

Este apartado se divide en dos subapartados principales. El primero de ellos analiza la $[Ca^{2+}]_i$ en situación de despolarización inducida y el segundo trata de explicar la participación de los LTCCs sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Para ello, los experimentos que se detallan a continuación se llevaron a cabo en un sistema de microfluorimetría equipado con epifluorescencia, (ver apartado 3.2 de Materiales y Métodos). El cociente F_{340}/F_{380} es proporcional a la $[Ca^{2+}]_i$ (Grynkiewicz y cols., 1985). Los experimentos se realizaron en el día 7 tras la HSA al ser cuando se observó una mayor despolarización.

2.1. Nivel de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la despolarización inducida mediante incrementos de $[K^+]_e$

Atendiendo a los hallazgos del apartado 1.1 de Resultados, en los que se describió una despolarización de los miocitos HSA frente a los de los grupos Control y Sham, el siguiente experimento se diseñó con el objetivo de ver si distintos niveles de despolarización inducidos por cambios en la $[K^+]_e$ desvelaban diferencias en el manejo del Ca^{2+} (ver tabla 2, apartado 3.3 de Material y Métodos). Para el cálculo de dichos valores se utilizó un simulador virtual de la ecuación de Goldman-Hodgkin y Katz de la Universidad de Arizona (Branch & Wright); las concentraciones iónicas intracelulares para músculo liso arterial, descritas en Hunt y cols. (2002); y sus permeabilidades; indicadas en Brown y cols. (1999) y Chipperfield y Harper, (2000).

En la figura 21 se observa el efecto de la aplicación de las soluciones despolarizantes de K^+ sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Se muestran registros de microfluorimetría de Ca^{2+} representativos llevados a cabo en miocitos aislados de animales de los diferentes grupos experimentales que fueron cargados con el marcador FURA2-AM (paneles A-C). Se observó un incremento significativo del nivel de la $[Ca^{2+}]_i$ basal en los miocitos procedentes del grupo HSA7d con respecto de los de los grupos Control y Sham7d (panel D). Además de ello, los miocitos del grupo HSA7d mostraron una respuesta mayor y más temprana a soluciones de baja concentración de K^+ en comparación a las de los otros grupos produciéndose aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ más pronunciados a estas concentraciones en este grupo. Los paneles E y F exponen el análisis estadístico de la amplitud de los picos y las mesetas de Ca^{2+} señalando que las diferencias en ambos elementos de la respuesta del Ca^{2+} también eran significativas entre el grupo HSA7d y los grupos Control y Sham7d para todos los grados de despolarización estudiados.

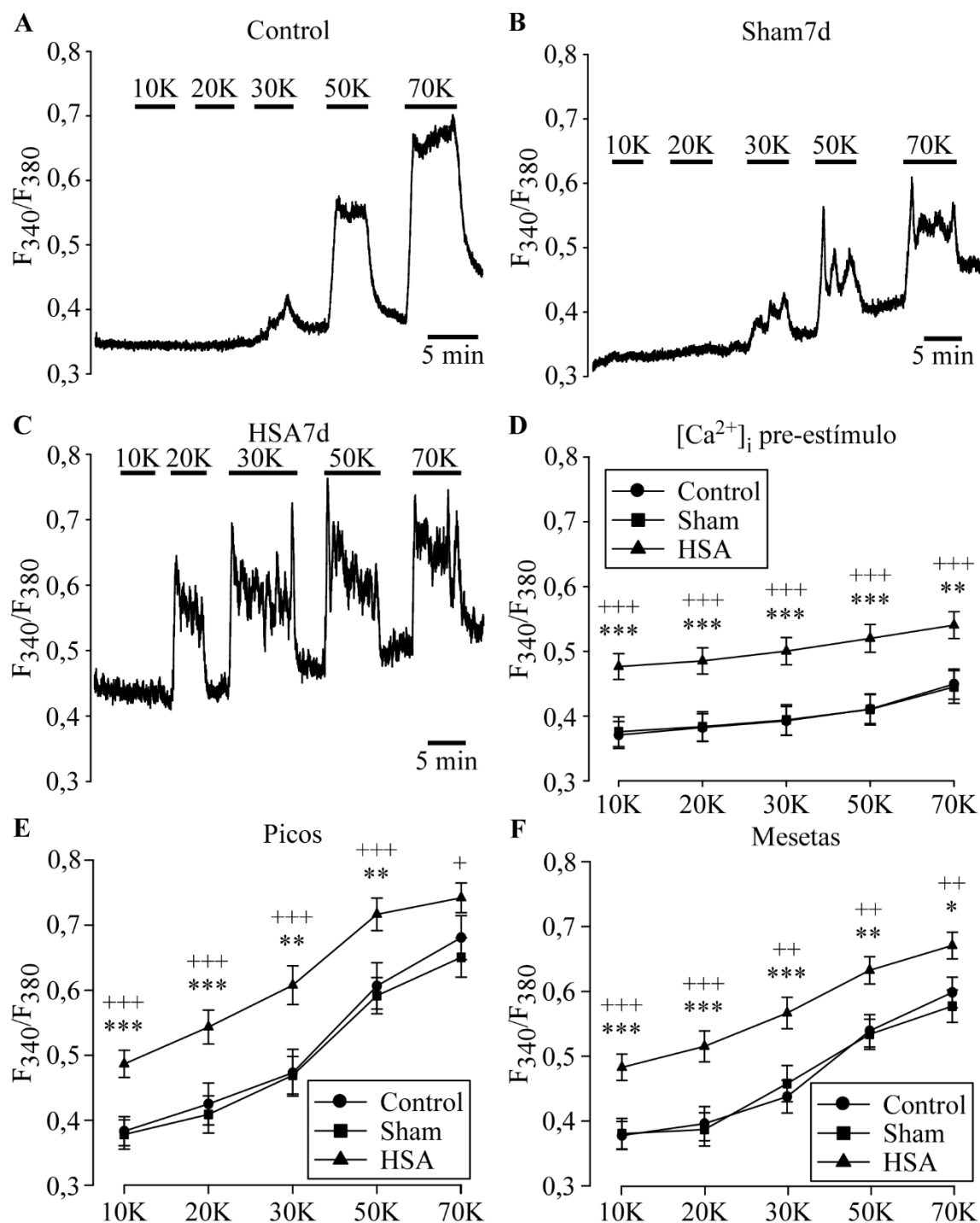


Figura 21. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de miocitos aislados del polígono de Willis en respuesta a despolarizaciones inducidas por K^+ . (A-C) Registros representativos de la respuesta de Ca^{2+} a despolarizaciones inducidas por K^+ . Los miocitos HSA muestran mayores incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a menores $[K^+]_e$ que los Controles y Sham. (D-F) Análisis estadístico de la dinámica del Ca^{2+} . $n \geq 34$ células Control (5 animales), $n \geq 42$ células Sham7d (5 animales) y $n \geq 53$ células HSA7d (6 animales). *, **, *** $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ HSA7d vs. Control; +, ++, +++ $P \leq 0,05, 0,01, 0,001$ HSA7d vs. Sham7d.

Más allá del análisis anterior, se estudió el porcentaje de células de cada grupo que respondían a una despolarización inducida con una solución de 30K y la amplitud de

dicha respuesta. Se eligió la solución de 30K debido a que generaba una despolarización moderada que se interpretó que podía mostrar mejor las diferencias que con la utilización de soluciones de más alta $[K^+]$ que pudieran generar una despolarización de gran magnitud que enmascarase los resultados. En la figura 22 se presentan las observaciones de este segundo análisis. Se advirtió un mayor porcentaje de células respondedoras a 30K en el grupo HSA7d (61,1 %) con respecto de los grupos Control y Sham7d (36,8 % y 44,7 %, respectivamente) (panel A). Se realizó el análisis estadístico de la $[Ca^{2+}]_i$ en estas células. Se observó en los grupos de células respondedoras a 30K existía una diferencia significativa entre el grupo HSA7d ($0,55 \pm 0,02$) y el grupo Control ($0,46 \pm 0,04$), mostrando esta tendencia entre el primero y el grupo Sham7d ($0,48 \pm 0,04$). En el grupo de células no respondedoras a 30K existían diferencias significativas entre el grupo HSA7d, que mostró una mayor $[Ca^{2+}]_i$ ($0,41 \pm 0,03$), con respecto de los grupos Control y Sham7d, con menores $[Ca^{2+}]_i$ ($0,36 \pm 0,02$ y $0,37 \pm 0,02$, respectivamente). También existían diferencias significativas entre los grupos HSA7d y Sham7d, ambos entre sí, entre las condiciones de respuesta a 30K (panel B).

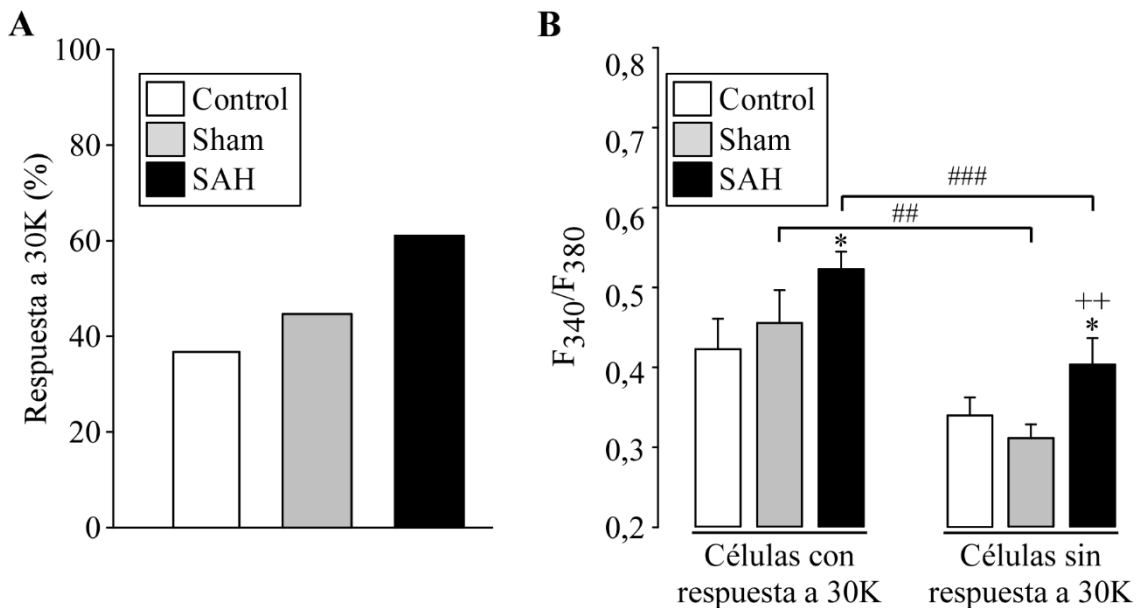


Figura 22. Niveles de $[Ca^{2+}]_i$ basal en respuesta a 30K. (A) Recuento de células con respuesta a 30K. (B) Análisis estadístico desagregado de la $[Ca^{2+}]_i$ basal de según respuesta a 30K. Células con respuesta a 30K: n= 14 células Control, 4 animales (36,8 % células, 5 animales); n=21 células Sham7d, 5 animales (44,7 % células, 5 animales); y n= 33 células HSA7d, 6 animales (61,1 % células, 6 animales). Células sin respuesta a 30K: n= 24 células Control, 5 animales (63,2 % células, 5 animales); n= 26 células Sham7d, 5 animales (55,3 % células, 5 animales); y n= 21 células HSA7d, 5 animales (38,9 % células, 6 animales). * $P \leq 0,05$ HSA7d vs. Control; ++ $P \leq 0,01$ HSA7d vs. Sham7d; ##, ### $P \leq 0,01, 0,001$.

2.2. Participación de los LTTC en la regulación del $[Ca^{2+}]_i$

Dado que en el apartado anterior se ha descrito que los miocitos del grupo HSA mostraban una mayor $[Ca^{2+}]_i$ en condición basal y una mayor amplitud de su respuesta a despolarización con 30K, se estudió la implicación de los LTCCs en ambos fenómenos.

2.2.1. Participación en la regulación del $[Ca^{2+}]_i$ basal

Para determinar si los LTCCs tenían alguna participación sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal esta se registró en miocitos sin estimular antes y durante la aplicación de Nifedipina ($0,5 \mu\text{M}$) en la solución control de perfusión de las células. No se hallaron diferencias significativas en la $[Ca^{2+}]_i$ entre el momento previo a la aplicación de la Nifedipina y durante su aplicación para ninguno de los grupos experimentales (Control: $0,46 \pm 0,02$ y $0,47 \pm 0,02$; Sham7d: $0,38 \pm 0,02$ y $0,38 \pm 0,02$; HSA7d: $0,46 \pm 0,02$ y $0,47 \pm 0,02$) (Figura 23).

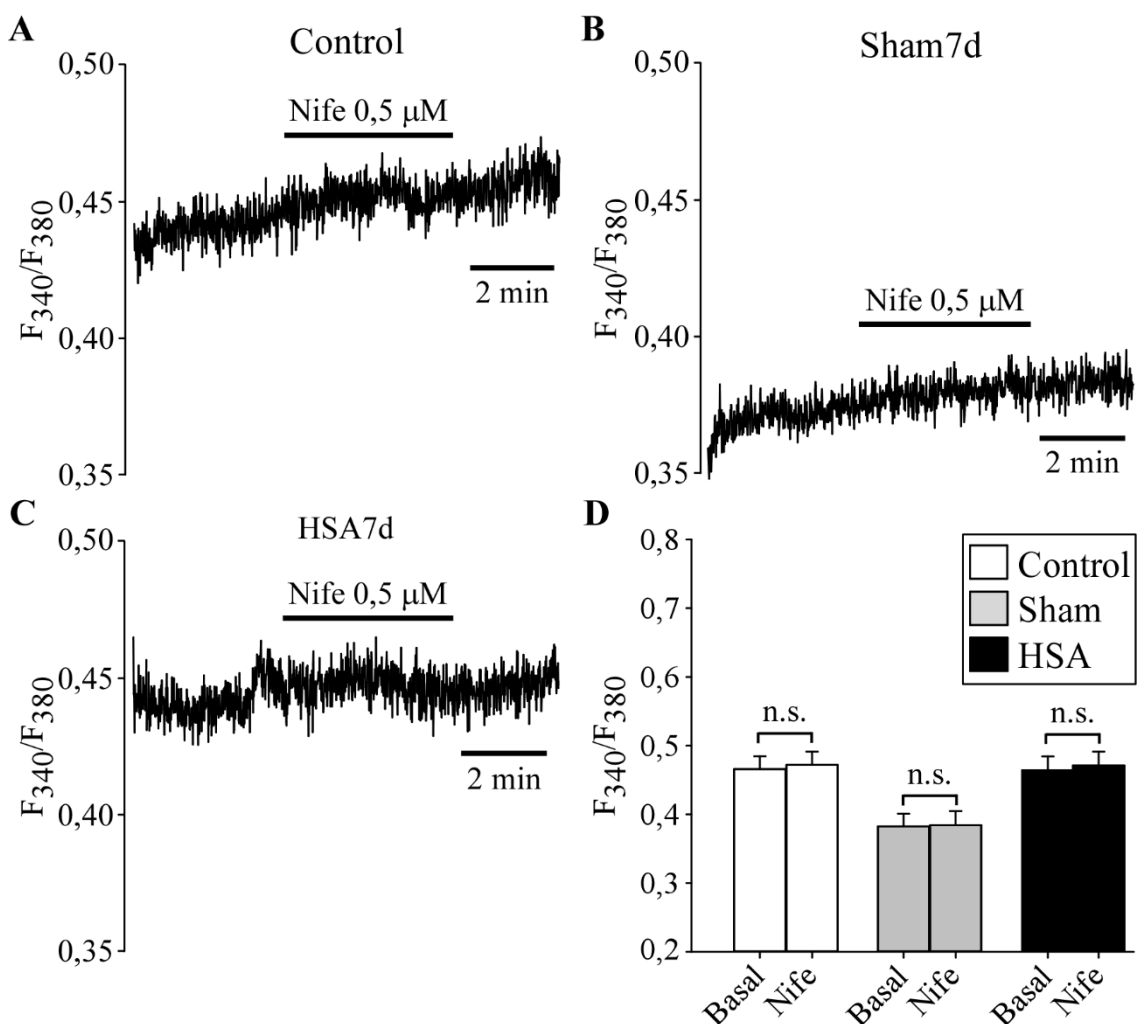


Figura 23. Efecto de la Nifedipina ($0,5 \mu\text{M}$) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal en miocitos aislados. (A-C) Registros representativos. No se apreció ninguna disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ basal tras la aplicación de Nifedipina en ninguno de los grupos. (D) Análisis estadístico del efecto de la nifedipina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal. $n = 66$ células Control (5 animales), $n = 44$ células Sham7d (5 animales) y $n = 40$ células HSA7d (6 animales).

2.2.2. Participación en la despolarización inducida por incremento de $[K^+]_e$

Para determinar la participación de los LTCCs en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ cuando los miocitos se despolarizaron con una solución de 30K y sobre la meseta se aplicó nifedipina ($0,5 \mu M$) (Figura 24). Se muestran registros representativos de dicho abordaje experimental donde se observó que en los miocitos de todos los grupos se reducía de manera significativa la $[Ca^{2+}]_i$ al aplicar la Nifedipina (paneles A-C). La aplicación de Nifedipina produjo una mayor inhibición significativa del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los miocitos del grupo HSA7d en comparación a los otros grupos ($[Ca^{2+}]_i$ remanente (%): Control= $70,42 \pm 3,31$; Sham7d= $72,53 \pm 3,18$; y HSA7d= $59,84 \pm 3,71$) (panel D).

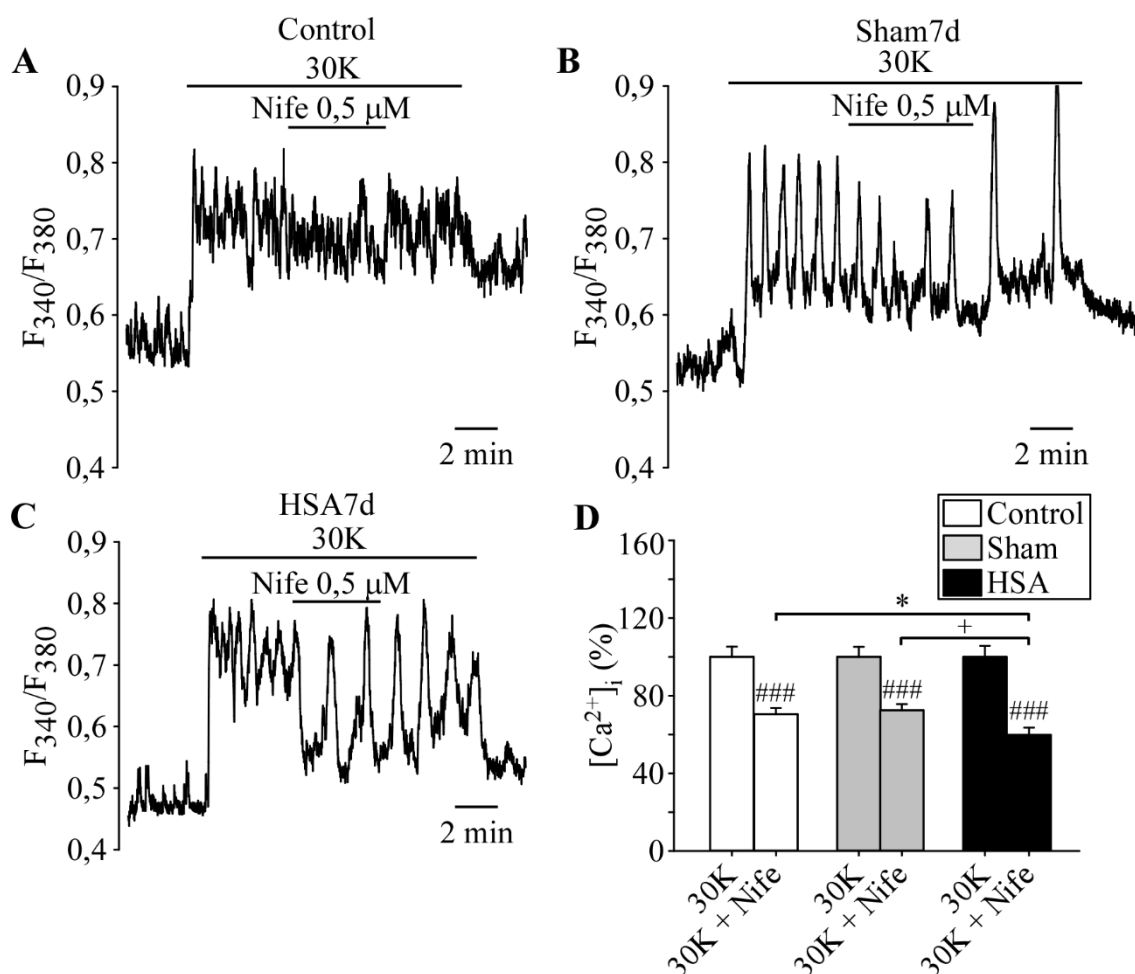


Figura 24. Efecto de la nifedipina ($0,5 \mu M$) sobre la despolarización inducida por 30K en miocitos aislados. (A-C) Registros representativos. La aplicación de Nifedipina tras la estimulación de los miocitos con solución 30K redujo significativamente la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos HSA con respecto a Controles y Sham. (D) Análisis estadístico del efecto de la Nifedipina sobre la despolarización inducida por 30K. $n=44$ células Control (6 animales), $n=52$ células Sham7d (8 animales) y $n=44$ células HSA7d (6 animales). * $P \leq 0,05$ HSA7d vs. Control; + $P \leq 0,05$ HSA7d vs. Sham7d; ### $P \leq 0,001$ 30K + Nife vs. 30K.

En resumen, los resultados de este apartado indican que los miocitos procedentes de animales HSA7d cuentan con una $[Ca^{2+}]_i$ basal significativamente mayor con respecto a la de los otros grupos, encontrándose también elevada en los picos y las mesetas evocadas con las despolarizaciones a $[K^+]_e$ crecientes. Además, se encontró un mayor recuento de células que respondían a 30K en el grupo HSA7d que en el resto y que tanto entre las células que respondían a 30K como las que no, la $[Ca^{2+}]_i$ basal se encontraba significativamente elevada con respecto a los otros grupos. Con respecto a la implicación de los LTCCs, no se produjo inactivación de estos en estado basal al aplicar Nifedipina, mientras que su aplicación sobre la meseta de Ca^{2+} tras la despolarización evocada con 30K produjo un mayor descenso en la $[Ca^{2+}]_i$ en el grupo HSA7d que en el resto de grupos.

3. Estudio de la fuerza isométrica en anillos arteriales del modelo animal de HSA

Vistos los resultados observados en células dispersas se emprendieron experimentos en anillos arteriales para ver si los hallazgos ocurridos a nivel celular se reproducían a nivel de órgano completo utilizando anillos de arteria basilar. Además, en este apartado también evaluó la participación de las rutas moleculares de PKC α y de RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada como continuación a las observaciones descritas en Egea-Guerrero y cols. (2015) y González-Montelongo y cols. (2019). Los experimentos se realizaron en condiciones de despolarización moderada (30K) y elevada (70K) (ver apartado 2.1 de Resultados) siendo los primeros desarrollados solo en el día 7, por las observaciones de los apartados anteriores, y los segundos en curso temporal completo. Se muestran registros representativos de las contracciones citadas y del curso temporal de la administración de fármacos (Figura 25).

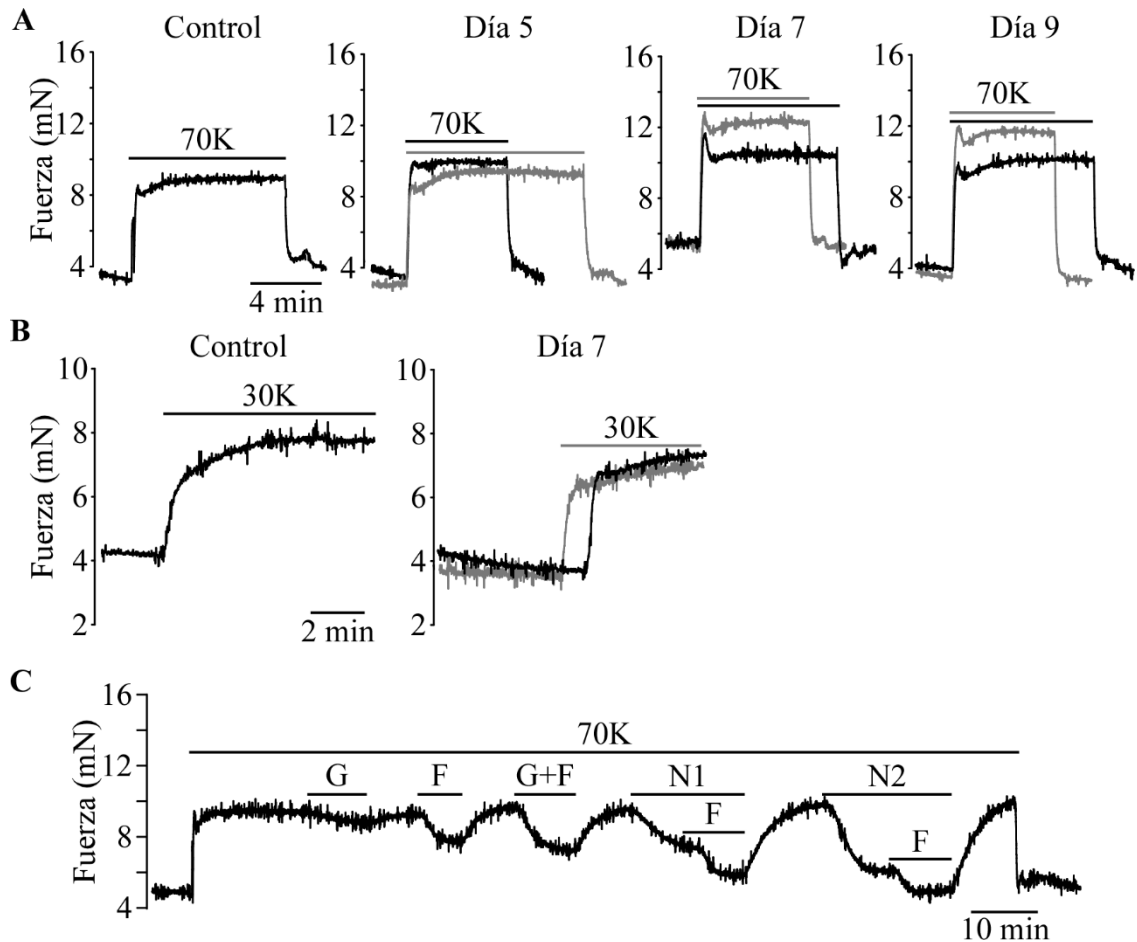


Figura 25. Registros representativos de estudios de miografía. (A-B) Contracción inducida con soluciones despolarizantes de 70K y 30K respectivamente. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro). (C) Curso temporal del tratamiento farmacológico sobre arterias despolarizadas. G= GFX (0,5 μ M), F= Fasudil (1 μ M), G+F= GFX (0,5 μ M) + Fasudil (1 μ M), N1= Nifedipina (2,5 nM) y N2= Nifedipina (5 nM).

3.1. Participación de PKC α en la contracción inducida por despolarización prolongada

En este apartado se estudió el efecto que tenía la aplicación de GFX (0,5 μ M) sobre la contracción prolongada inducida por soluciones despolarizantes de 30K y 70K. Tras comprobar la viabilidad de los anillos arteriales con dos pulsos despolarizantes de 70K de 5 minutos de duración y volver a la contracción basal en solución control, se indujo la despolarización prolongada aplicando la solución correspondiente durante los 15 minutos previos a la aplicación del inhibidor.

En el caso de la despolarización con la solución de 70K se observaron varias diferencias entre los distintos grupos experimentales. La figura 26 muestra los registros representativos (paneles A-D) y el análisis estadístico (panel E). En el caso de los anillos

arteriales del grupo HSA a los distintos días de observación, todos mostraron un mayor porcentaje significativo de fuerza remanente (Día 5= 90,54±1,19 %, Día 7= 91,03±1,65 % y Día 9=89,75±1,42 %) con respecto a los del grupo control (86,39±1,11 %), indicando de esta manera una menor inhibición de la contracción. Por el contrario, no existían diferencias significativas entre los distintos grupos HSA entre sí ni tampoco entre cada grupo HSA con su respectivo grupo Sham. En el caso de los distintos grupos Sham, sí existían diferencias significativas entre los días 5 y 7 (86,55±1,61 % y 92,04±1,09 %, respectivamente). También se daban entre el grupo Sham a día 7 y el grupo Control.

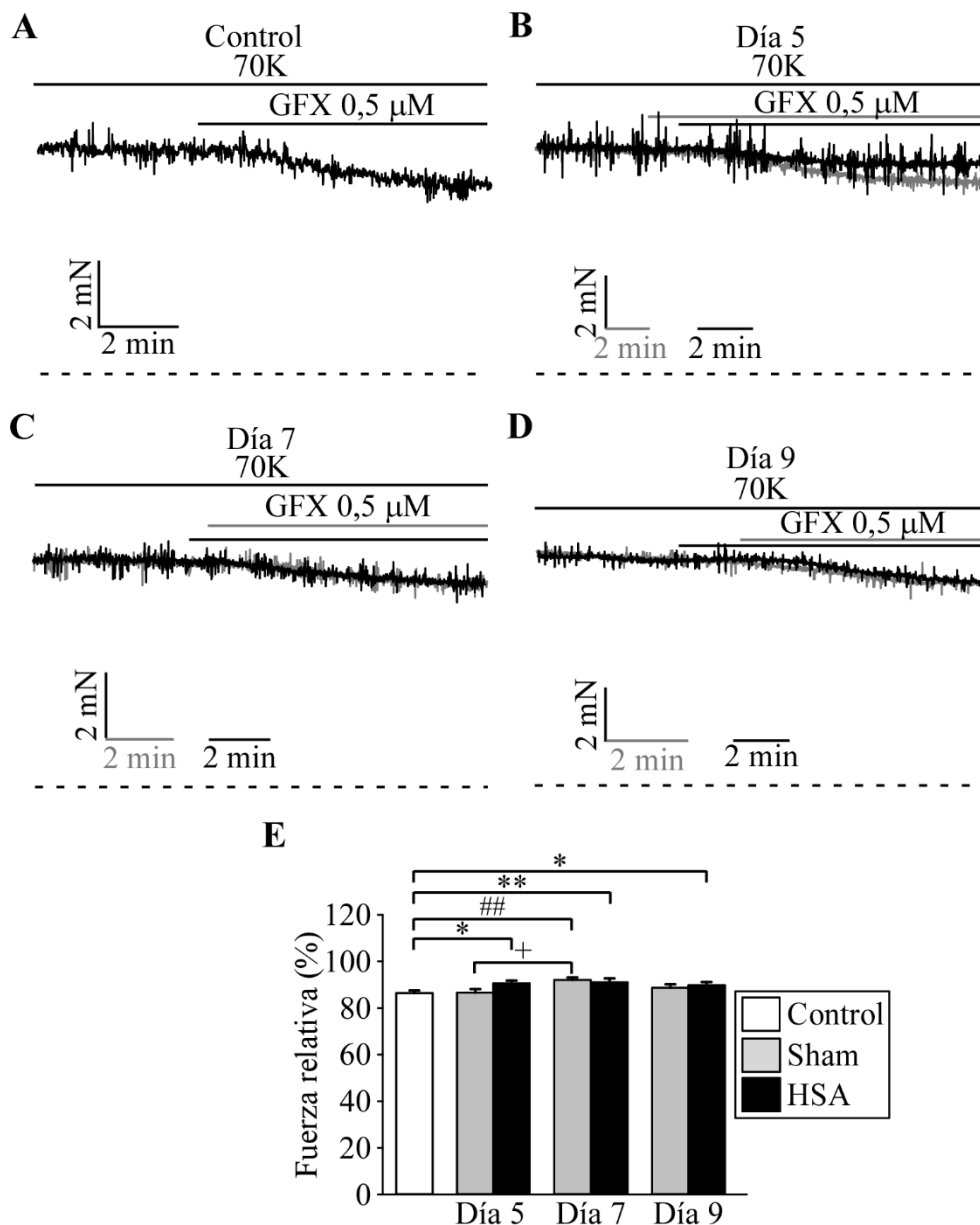


Figura 26. Efecto de GFX (0,5 μM) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar. (A-D) Registros representativos. Tras la aplicación de GFX, los anillos HSA muestran menor vasorrelajación que los Controles. Los anillos Sham7d muestran menor vasorrelajación que los Controles

y Sham5d. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (E) Análisis estadístico. n= 33 anillos Control (10 animales), n≥ 16 anillos Sham (7 animales) y n= 18 anillos HSA (9 animales). *, ** P≤ 0,05, 0,01 HSA vs. Control; ## P≤ 0,01 Sham vs. Control; + P≤ 0,05 Sham Día 7 vs. Sham Día 5.

A continuación, en la figura 27 se exponen los resultados del efecto de GFX sobre una despolarización moderada inducida por 30K. Como se había introducido en el epígrafe de esta sección, estos experimentos se llevaron a cabo solo en el día 7 tras la HSA. Se muestran los registros representativos (paneles A-B) y el análisis estadístico (panel C). A diferencia de lo que ocurría en la despolarización con 70K, en este caso no se produjeron diferencias significativas en la inhibición que ocurría al aplicar GFX sobre la contracción inducida por 30K. Sin embargo, el porcentaje de fuerza remanente fue similar a los descritos anteriormente para los grupos correspondientes (Control= 87,55±3,13 %, Sham7d= 91,8±1,92 % y HSA7d= 91,04±2,56 %).

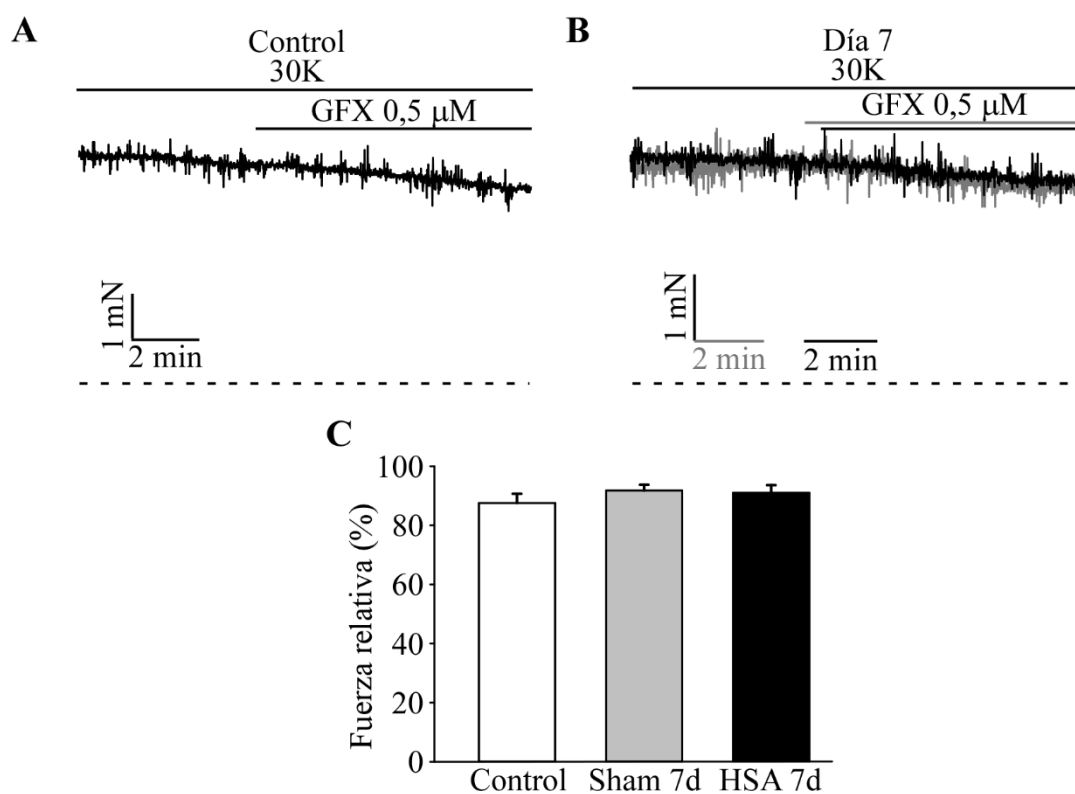


Figura 27. Efecto de GFX (0,5 μM) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar. (A-B) Registros representativos. No se apreciaron diferencias en el nivel de vasorrelajación entre los diferentes grupos. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas

temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (C) Análisis estadístico. n= 12 anillos Control (6 animales), n= 14 anillos Sham7d (9 animales) y n= 15 anillos HSA7d (9 animales).

3.2. Participación de RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada

En este apartado se describen los resultados de la inhibición inducida por Fasudil (1 μ M) sobre la contracción generada por las mismas condiciones despolarizantes descritas en el apartado anterior.

En el caso de producirse la contracción en respuesta a 70K se observó que no se producían diferencias significativas entre los porcentajes de fuerza remanente de ninguno de los grupos experimentales (Control= 64,40 \pm 1,97 %, Sham5d= 66,87 \pm 1,49 %, HSA5d= 62,91 \pm 2,71 %, Sham7d= 64,01 \pm 1,80 %, HSA7d= 59,54 \pm 2,50 %, Sham9d= 63,97 \pm 2 % y HSA9d= 62,27 \pm 1,90 %) (Figura 28).

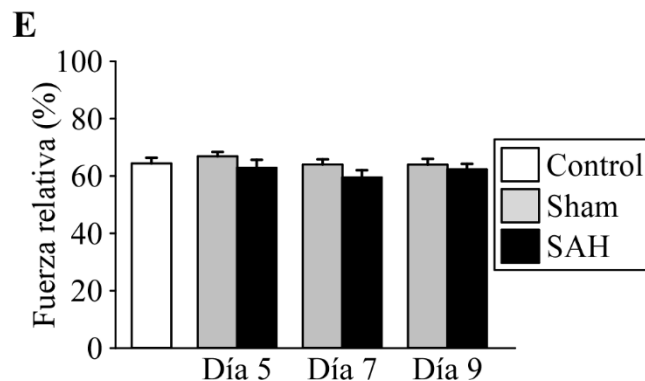
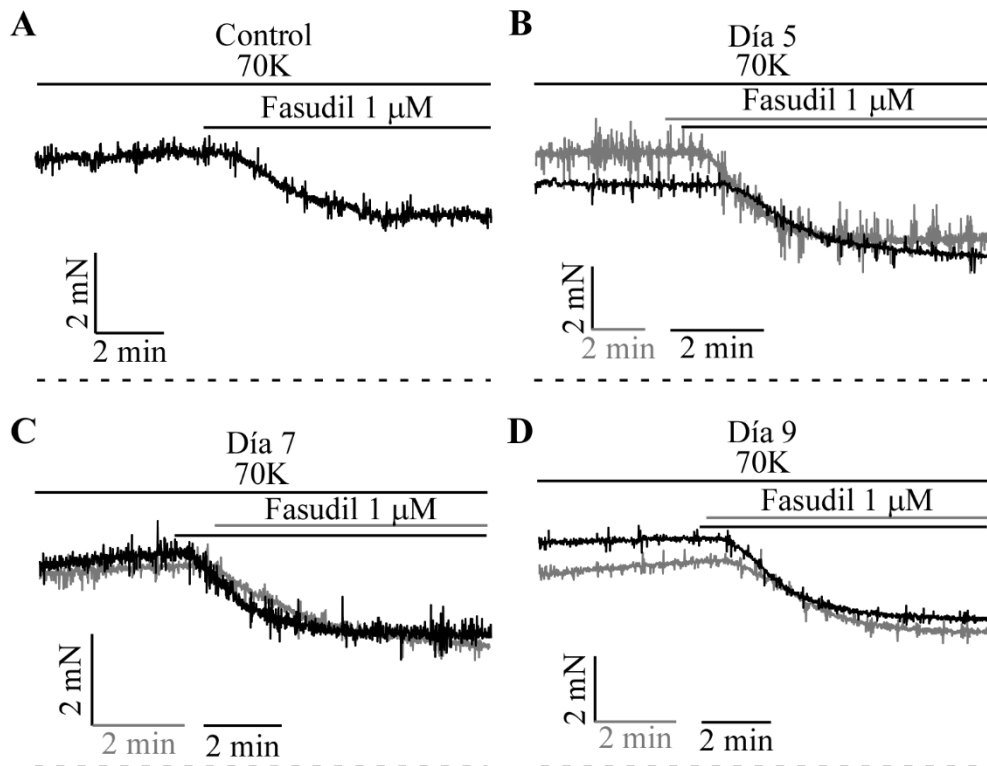


Figura 28. Efecto de Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar. (A-D) Registros representativos. No se observaron diferencias significativas en la vasorrelajación entre los distintos grupos. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (E) Análisis estadístico. n= 33 anillos Control (10 animales), n \geq 15 anillos Sham (7 animales) y n= 18 anillos HSA (9 animales).

De forma similar a lo ocurrido cuando se indujo una contracción con 70K, se observó que la aplicación de Fasudil no producía diferencias significativas en el porcentaje de inhibición la contracción tras inducir la con 30K (Control= 52 \pm 2,97 %, Sham7d= 57,47 \pm 2,83 % y HSA7d= 50,32 \pm 2,74 %) (Figura 29).

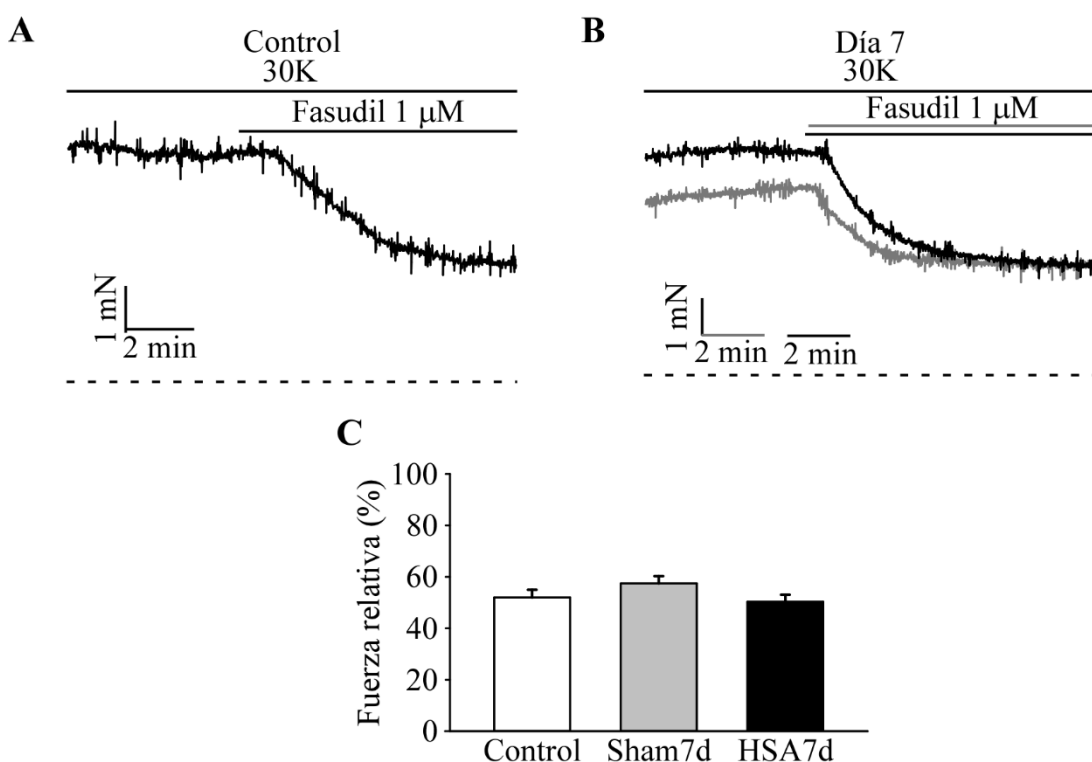


Figura 29. Efecto de Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar. (A-B) Registros representativos. No se observaron diferencias significativas en la vasorrelajación de los diferentes grupos. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (C) Análisis estadístico. n= 12 anillos Control (6 animales), n= 14 anillos Sham7d (9 animales) y n= 15 anillos HSA7d (9 animales).

3.3. Participación conjunta de PKC α y RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada

En este apartado se estudió si en las arterias pertenecientes a los animales del grupo HSA el uso combinado de inhibidores de las rutas de PKC y RhoA/ROCK daba lugar al efecto vasorrelajante sinérgico sobre la despolarización inducida por 70K descrito en

nuestro laboratorio (González-Montelongo y cols., 2019). Se indujo la despolarización prolongada con las distintas soluciones despolarizantes y tras esperar el tiempo establecido de incubación se añadieron GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M).

Con respecto a la contracción prolongada inducida por 70K, la aplicación conjunta de GFX y Fasudil mostró que el efecto vasorrelajante generaba porcentajes de fuerzas remanentes similares en todos los grupos experimentales salvo en el día 7 tras la HSA (Control= 48,12 \pm 2,47 %, Sham5d= 48,94 \pm 3,22 %, HSA5d= 49,83 \pm 3,08 %, Sham7d= 56,57 \pm 1,84 %, HSA7d= 50,8 \pm 2,75 %, Sham9d= 48,06 \pm 3,68 % y HSA9d= 47,15 \pm 2,96 %). En este día se hallaron diferencias significativas entre el grupo Sham y el grupo Control, al darse en el primero un menor efecto vasorrelajante. Dicha tendencia también fue observada con el correspondiente grupo HSA en el día 7, aunque no se alcanzó la significatividad estadística (Figura 30).

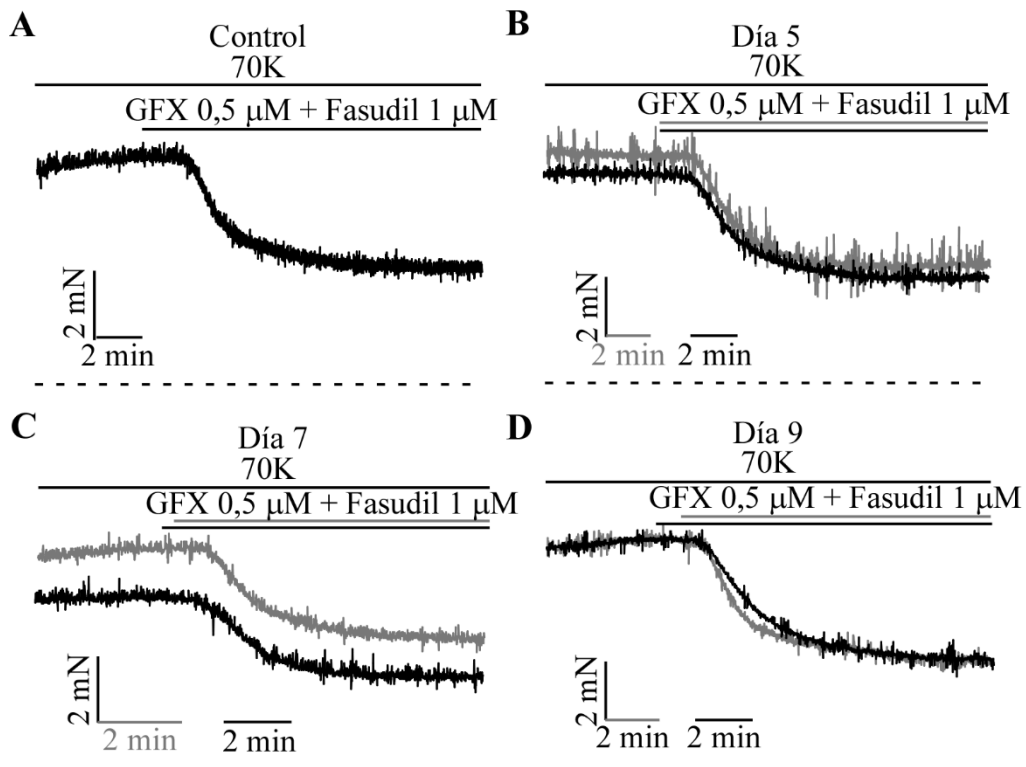


Figura 30. Efecto combinado de GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar. (A-D) Registros representativos. Se observó un menor efecto vasorrelajante entre los anillos Sham7d y los Controles. No hubo diferencias entre el resto de grupos. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (E) Análisis estadístico. $n=31$ anillos Control (10 animales), $n\geq 14$ anillos Sham (7 animales), $n\geq 18$ anillos HSA (9 animales). # $P\leq 0,05$ Sham vs. Control.

También se evaluó el efecto vasorrelajante de la aplicación de ambos compuestos en la contracción producida por una despolarización moderada con 30K (Figura 31). Se encontró que estos tenían un mayor efecto vasorrelajante sobre los anillos arteriales del grupo HSA en el día 7 que en los otros grupos dando lugar a un menor porcentaje de fuerza remanente en este grupo sobre el resto (Control= $41,5\pm 2,63\%$, Sham7d= $44,84\pm 3,13\%$ y HSA7d= $36,34\pm 2\%$) (paneles A-B). Esta diferencia era estadísticamente significativa con respecto al grupo Sham y mostraba una tendencia en comparación con el grupo Control (panel C).

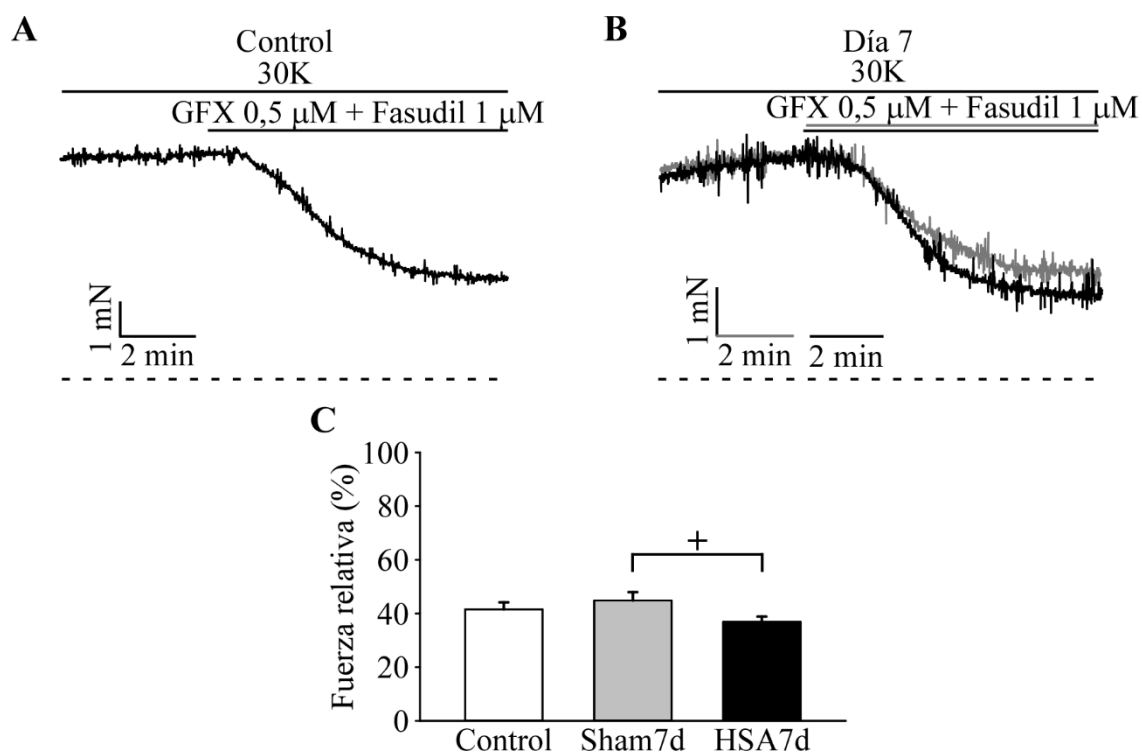


Figura 31. Efecto combinado de GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar. (A-B) Registros representativos. Se apreció un mayor efecto vasorrelajante significativo en anillos del grupo HSA7d con respecto a los Sham7d. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica

correspondientes. (C) Análisis estadístico. n= 12 anillos controles (6 animales), n=14 anillos Sham7d (9 animales) y n=15 anillos HSA7d (9 animales). + P≤ 0,05 HSA7d vs. Sham7d.

Conforme a estos resultados quiso evaluarse si se producía el mismo efecto vasorrelajante al administrar los inhibidores de forma conjunta separada. Para ello se comparó la acción que producía la suma de los efectos por separados de ambos inhibidores con respecto del efecto que produce el uso conjunto de ambos inhibidores (Figura 32). Al inducir una contracción prolongada con 70K se observó que, si se sumaban los efectos aislados de la aplicación separada de los inhibidores, no existían diferencias entre ninguno de los grupos en el efecto vasorrelajante desarrollado. Por el contrario, la aplicación conjunta mostró un menor efecto vasorrelajante en el grupo Sham al día 7 respecto al grupo Control, siendo estadísticamente significativo. La misma tendencia se observó respecto al grupo HSA7d (paneles A y B). Del mismo modo, al inducir la contracción con 30K, no hubo diferencias entre la suma de los efectos vasorrelajantes administrados de forma aislada. Sin embargo, sí existían esas diferencias significativas al aplicar los inhibidores de forma separada (panel C).

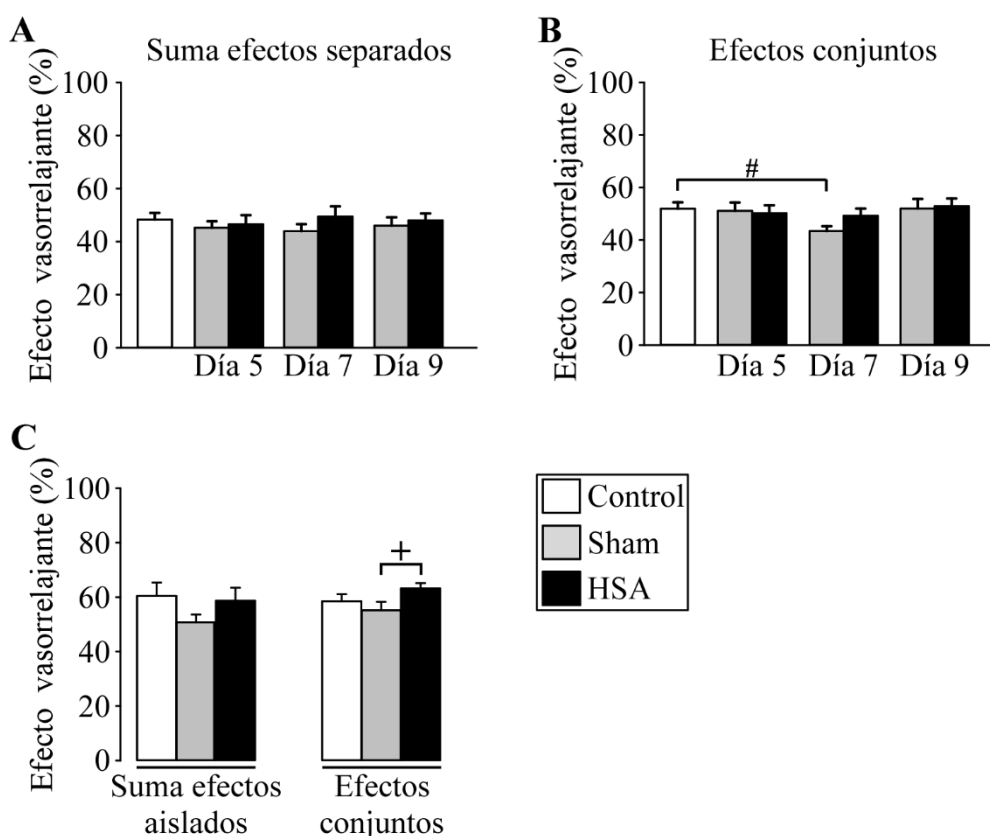


Figura 32. Efectos vasorrelajantes tras la administración separada y conjunta de GFX (0,5 μ M) y Fasudil (1 μ M). (A-B) Análisis estadístico de GFX y Fasudil en anillos precontraídos con 70K sumando los efectos separados y conjuntos, respectivamente. Se observó un menor efecto vasorrelajante significativo

en los anillos Sham7d con respecto a los Controles en la administración conjunta. n= 31 anillos controles (10 animales), n \geq 14 anillos Sham (7 animales) y n \geq 18 anillos HSA (9 animales). # P \leq 0,05 Sham vs. Control. (C) Análisis estadístico de GFX y Fasudil en anillos precontraídos con 30K al 7º día tras la HSA sumando los efectos separados y conjuntos, respectivamente. Se observó un mayor efecto vasorrelajante en los anillos HSA7d con respecto de los Sham7d en la aplicación conjunta. n= 12 anillos Control (6 animales), n= 14 anillos Sham7d (9 animales) y n= 15 anillos7d (9 animales). + P \leq 0,05 HSA7d vs. Sham7d.

3.4. Participación de los LTCCs en la contracción inducida por despolarización prolongada

De forma similar a los apartados anteriores, se evaluó el papel que jugaron los LTCCs en la contracción prolongada inducida por soluciones despolarizantes. Además, estos experimentos continuaron la línea de los desarrollados en los apartados 1 y 2 de Resultados, en los que se caracterizó la respuesta de los VDCCs, la dinámica del Ca²⁺ y su relación con los LTCCs en los miocitos dispersos de arterias del polígono de Willis. Para llevarlos a cabo se aplicó Nifedipina (2,5 nM) sobre la contracción inducida por la aplicación de las soluciones despolarizantes ya que en trabajos previos de nuestro laboratorio se había observado que esta concentración no afectaba a contracciones inducidas por estímulos de duración corta pero sí ejercía un efecto vasorrelajante sobre la fase mantenida de contracciones prolongada (Porrás-González y cols., 2014).

En los anillos arteriales en los que se indujo la despolarización con 70K, se apreció que la respuesta a Nifedipina fue significativamente menor en el grupo Sham en el día 5 (63,77 \pm 3,89 %) que en los grupos Control y Sham en el día 7 (47,85 \pm 3,17 % y 54,06 \pm 2,88 %, respectivamente). Con respecto al grupo HSA5d, no se dieron diferencias significativas con él siendo el efecto vasorrelajante mayor en este segundo grupo (fuerza remanente: 55,06 \pm 6,20 %). Esto pudo ser debido a una mayor magnitud del error asociado a este grupo. No se hallaron diferencias significativas entre las fuerzas remanentes del resto de grupos experimentales (HSA7d= 53,08 \pm 3,18 %, Sham9d= 53,34 \pm 3,92 % y HSA9d= 58,36 \pm 4,22 %) (Figura 33).

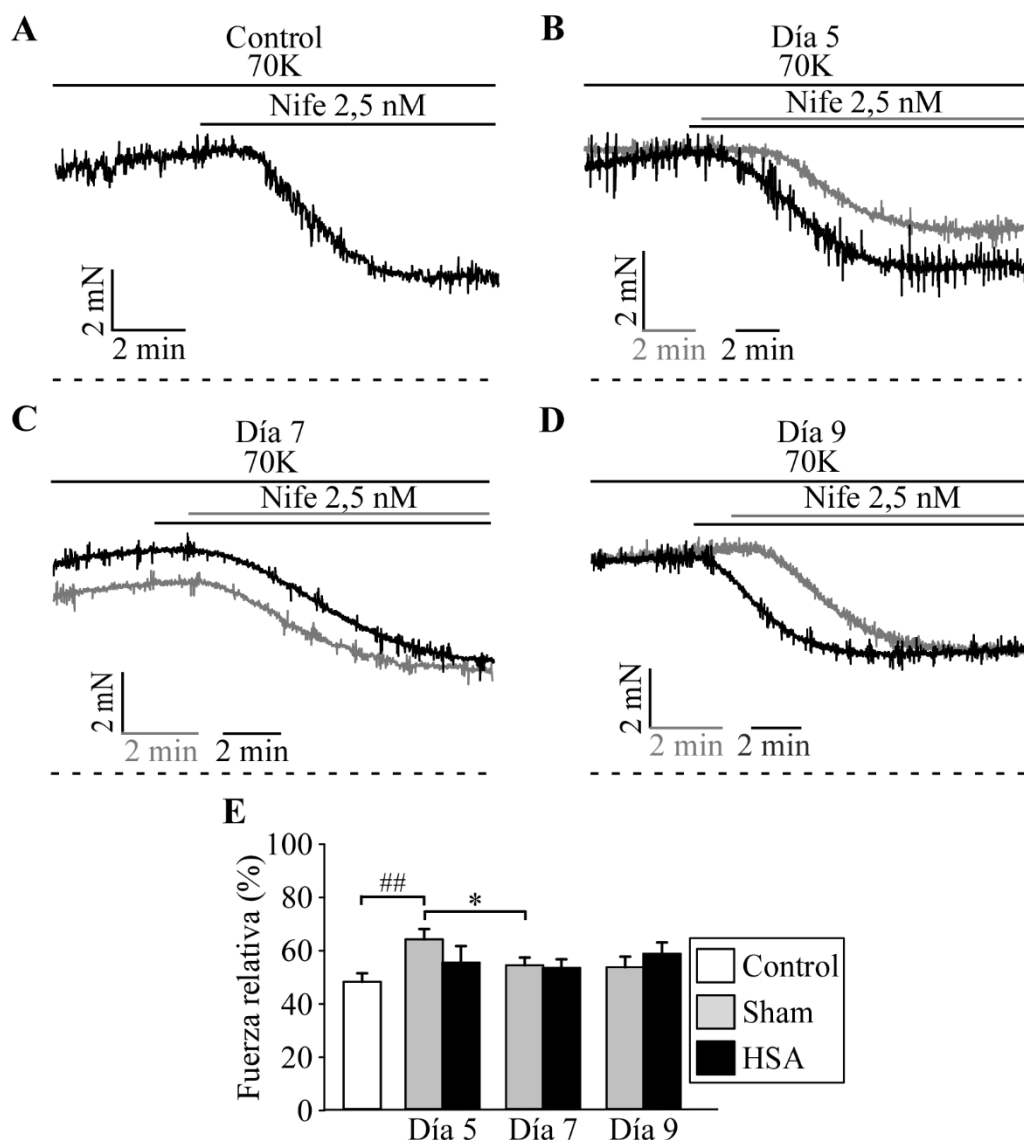


Figura 33. Efecto de Nifedipina (2,5 nM) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar. (A-D) Registros representativos. La aplicación de Nifedipina produjo un menor efecto vasorrelajante significativo en los anillos Sham5d con respecto a los Controles y los Sham7d. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (E) Análisis estadístico. $n=21$ anillos Control (6 animales), $n \geq 17$ anillos Sham (9 animales) y $n \geq 18$ anillos HSA (9 animales). ## $P \leq 0,01$ Sham5d vs. Control; * $P \leq 0,05$ Sham5d vs. Sham7d.

La figura 34 resume los datos de la acción de la Nifedipina sobre los anillos arteriales inducidos a contraerse con 30K. No se observaron diferencias significativas entre las fuerzas remanentes de ninguno de los grupos experimentales (Control= $55,64 \pm 3,13$ %, Sham7d= $61,51 \pm 3,8$ % y HSA7d= $63,22 \pm 2,16$ %).

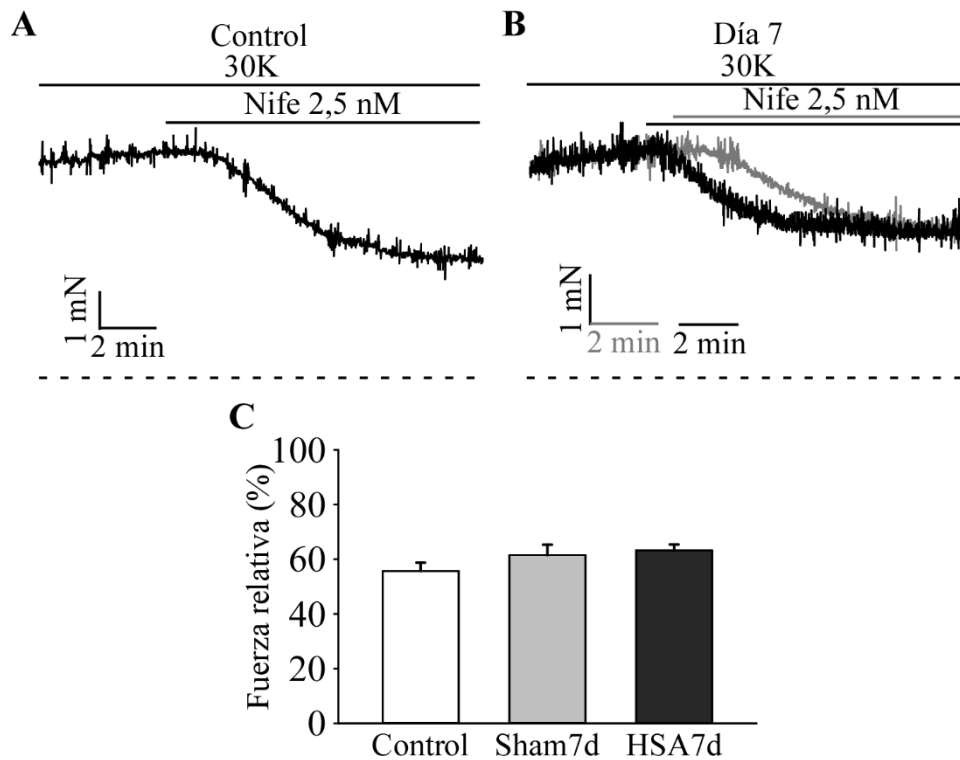


Figura 34. Efecto de Nifedipina (2,5 nM) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar. (A-B) Registros representativos. No se encontraron diferencias en el nivel de fuerza remanente entre los diferentes grupos. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (C) Análisis estadístico. n= 12 anillos controles (6 animales), n=15 anillos Sham7d (9 animales) y n=15 anillos HSA7d (9 animales).

3.5. Relación entre los LTCCs y ruta de RhoA/ROCK en la contracción inducida por despolarización prolongada

En este apartado se estudió el efecto de la administración conjunta de Nifedipina y Fasudil a bajas dosis sobre la contracción inducida por la despolarización prolongada. En resultados previos del laboratorio (Porrás-González y cols., 2014) se había observado que estas dosis producían una gran vasorrelajación sin afectar a la contractilidad en respuesta a estímulos cortos o a la función de otros órganos, pudiendo ser una alternativa terapéutica para tratar el vasoespasmo. Por ello, se quiso comprobar si existían diferencias en este efecto entre los grupos Sham y HSA.

Para ver el efecto de la administración conjunta de Nifedipina y Fasudil, éstos se añadieron a los anillos previamente contraídos con soluciones despolarizantes de forma prolongada. La administración de los inhibidores fue realizada administrando primero la Nifedipina y, una vez ésta hubo alcanzado su máximo efecto, se añadió el Fasudil.

La figura 35 ilustra como la administración conjunta de ambos fármacos sobre la contracción prolongada inducida por una despolarización con 70K provocaba una mayor relajación. Solamente se observaron cambios significativos en el día 5. A este tiempo, los anillos arteriales del grupo Sham presentaban una menor inhibición al aplicar los fármacos, manteniendo un mayor porcentaje de fuerza remanente ($37,32 \pm 4,32\%$) que era estadísticamente significativo con respecto a los grupos Control ($20,31 \pm 3,9\%$), HSA5d ($22,31 \pm 5,23\%$) y Sham9d ($23,03 \pm 3,40\%$). Sin embargo, no se encontró ninguna diferencia significativa entre las fuerzas remanentes del resto de grupos experimentales (Sham7d = $27,37 \pm 2,23\%$, HSA7d = $22,63 \pm 4,27\%$ y HSA9d = $27,12 \pm 3,03\%$).

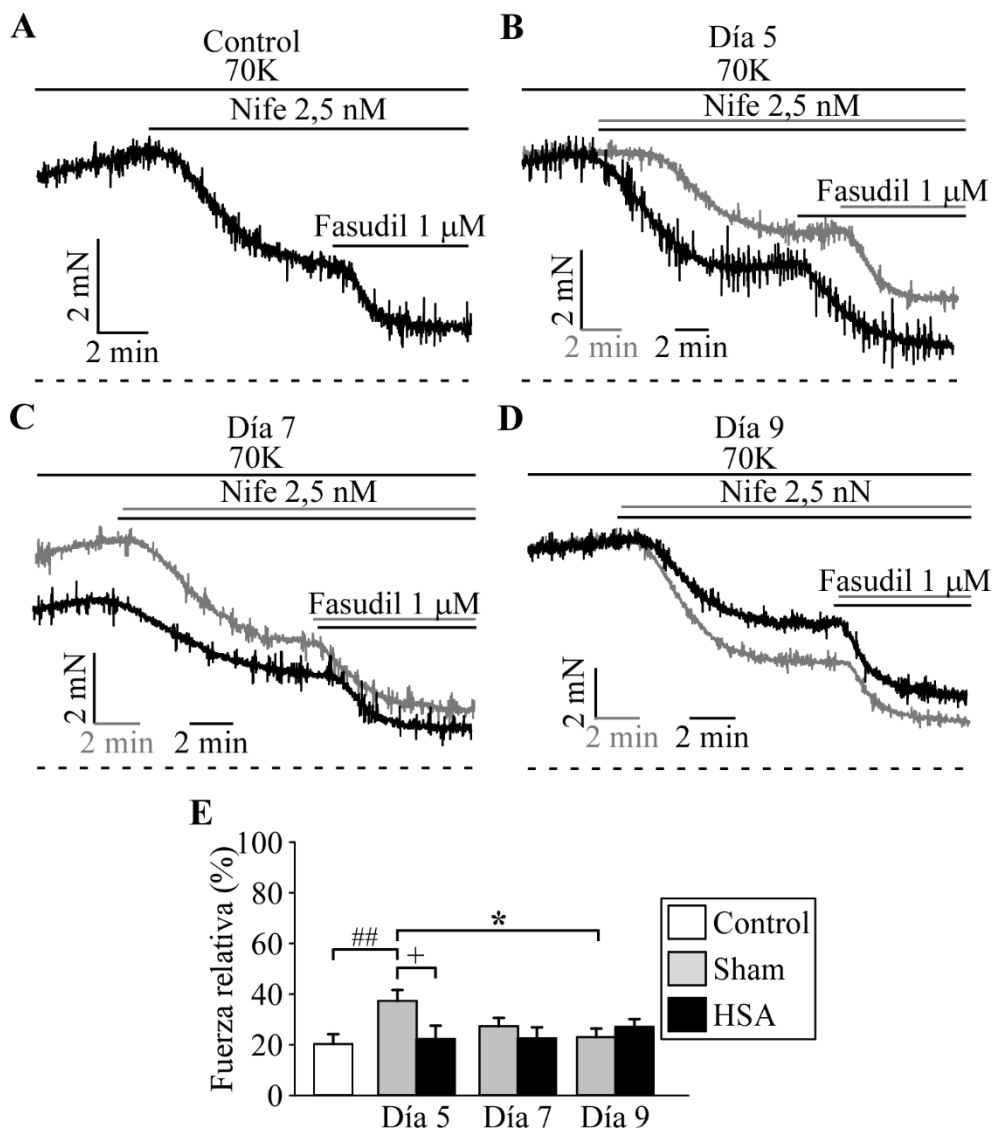


Figura 35. Efecto combinado de Nifedipina (2,5 nM) y Fasudil (1 μM) sobre la contracción inducida por 70K en anillos de arteria basilar. (A-D) Registros representativos. Los anillos Sham5d mostraron un menor efecto vasorrelajante que fue significativo con respecto a los anillos Controles, HSA5d y Sham9d. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los

registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (E) Análisis estadístico. $n=21$ anillos Control (6 animales), $n \geq 17$ anillos Sham (9 animales) y $n \geq 18$ anillos HSA (9 animales). ## $P \leq 0,01$ Sham vs. Control; + $P \leq 0,05$ HSA vs. Sham; * $P \leq 0,05$ Sham9d vs. Sham5d.

Al inducir la despolarización con 30K, el efecto vasorrelajante de la administración conjunta de Nifedipina y Fasudil no produjo ninguna diferencia significativa en el porcentaje de fuerza remanente entre los grupos experimentales (Control= $19,25 \pm 3,35$ %, Sham7d= $23,34 \pm 4,80$ % y HSA7d= $21,19 \pm 3,24$ %) (Figura 36).

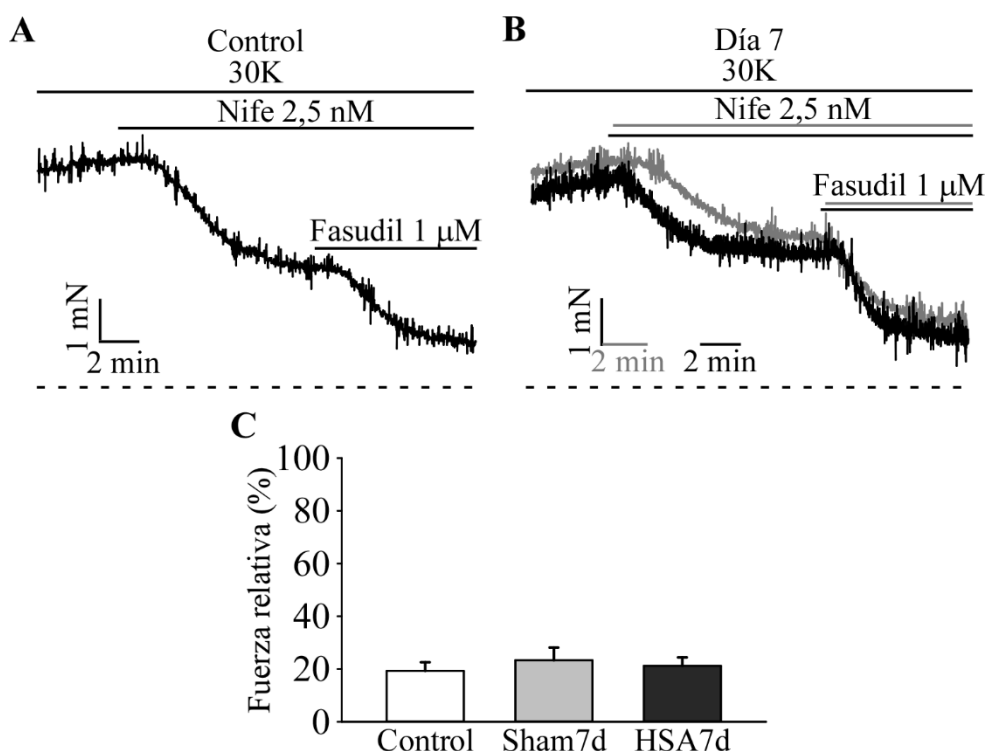


Figura 36. Efecto combinado de Nifedipina (2,5 nM) y Fasudil (1 μM) sobre la contracción inducida por 30K en anillos de arteria basilar. (A-B) Registros representativos. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. La línea discontinua representa el nivel de fuerza basal. En los paneles combinados se representan los registros correspondientes al grupo Sham7d (gris) y HSA7d (negro), junto con sus escalas temporales y dosificación farmacológica correspondientes. (C) Análisis estadístico. $n=12$ anillos Control (6 animales), $n=15$ anillos Sham7d (9 animales) y $n=15$ anillos HSA7d (9 animales).

En conclusión, nuestros resultados mostraron diferencias en el efecto de los distintos inhibidores utilizados. Con respecto a las rutas de sensibilización a Ca^{2+} , ambas rutas participaban en el proceso de contracción arterial pero individualmente su participación no presentó diferencias entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, la inhibición conjunta de ambas rutas provocó un efecto vasorrelajante que cursó con diferencias significativas entre los grupos experimentales al séptimo día y el Control.

Además, el efecto combinado de ambos inhibidores fue superior a la suma de sus efectos aislados. En lo referente al uso de la Nifedipina, nuestros resultados fueron coincidentes con trabajos ya publicados en nuestro laboratorio. El uso de este fármaco a bajas dosis, solo o en conjunto con Fasudil, provocó diferencias significativas en el efecto vasorrelajante entre el grupo Sham5d y los grupos HSA5d y Control. Estas observaciones podrían sugerir el uso farmacológico de ambos abordajes para el tratamiento de la HSA.

4. Estudio de la expresión proteica de PKC α y RhoA en arterias cerebrales de modelo animal de HSA

Dado que se había descrito en Egea-Guerrero y cols., 2015 que la ruta de RhoA/ROCK en el día 5 tras la HSA estaba alterada y que en González-Montelongo y cols., 2019 se había reseñado la regulación de RhoA por PKC α , se decidió estudiar la expresión de ambas proteínas. Para este cometido se extrajeron las arterias cerebrales de la superficie del cerebro y a partir de ellas se obtuvieron los extractos proteicos con los que se realizaron los experimentos (ver apartado 6.1 de Material y Métodos).

La figura 37 recoge en los paneles A y B el curso temporal de la expresión proteica de PKC α y de RhoA. En el caso de PKC α (panel A), se observó que la intervención de los animales producía un incremento de su expresión en los primeros días que tendía a decrecer conforme avanzaba el tiempo. En el caso del grupo Sham, se daba un repunte de la expresión en el día 7, pero posteriormente su tendencia proseguía a la baja siendo la expresión similar al grupo Control en el día 9. De otro modo, la expresión en el grupo HSA decrecía llegando al nivel del grupo Control en el día 7, pero posteriormente se incrementaba en el día 9. No se observan diferencias significativas entre ninguno de los grupos en el nivel de expresión en los diferentes días de comparación. Entre los grupos Sham y HSA en los días 7 y 9 se observaron diferencias, aunque sin poseer significación estadística.

Con respecto al panel B, este ilustra el nivel de expresión de RhoA en los distintos grupos experimentales durante el curso temporal tras la HSA, donde se apreciaron diferencias significativas. En el caso del día 5, el nivel de expresión de RhoA en el grupo HSA fue superior y significativamente distinto con respecto al grupo Control y se marcó la misma tendencia con su respectivo Sham, aunque sin significación. En el día 7, el grupo Sham marcó una diferencia significativa con respecto del grupo Control. El resto de grupos no mostraron diferencias significativas entre sí. La mayor expresión de RhoA en el día 5 y el descenso de esta en el día 7 tras la HSA en el grupo patológico podría estar

conectada con el resultado del efecto de Fasudil, descrito en el apartado anterior. Ello se revisará en profundidad en la discusión.

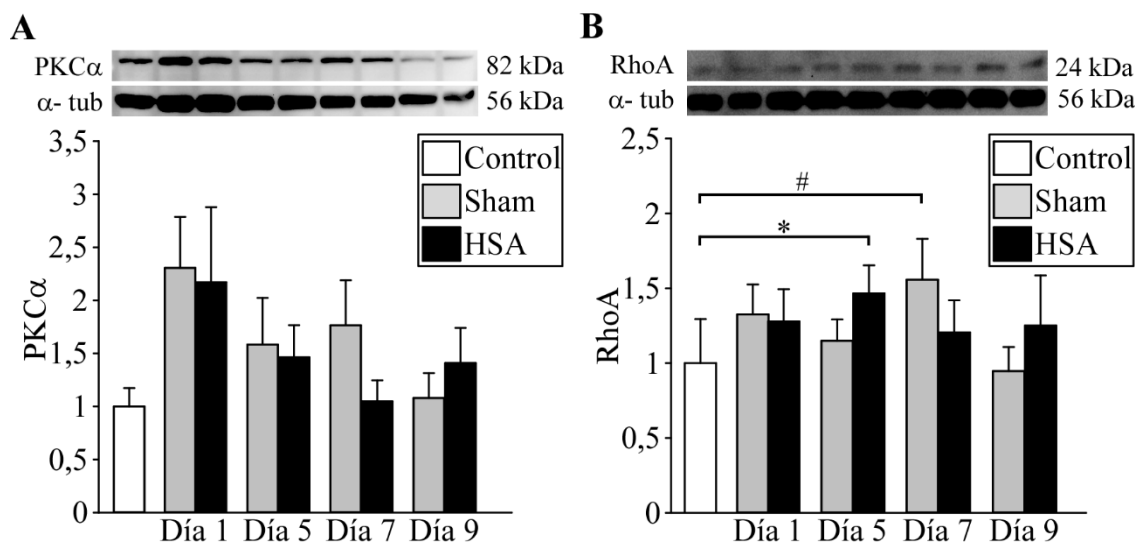


Figura 37. Expresión de PKC α y RhoA analizada mediante western blot. (A) Análisis estadístico acompañado de imagen representativa para PKC α . n=16 animales controles, n \geq 11 animales Sham y n \geq 11 animales HSA. No se encontraron diferencias significativas en la expresión entre los diferentes grupos. (B) Análisis estadístico acompañado de imagen representativa para RhoA. Los animales HSA5d y Sham7d mostraban niveles incrementados de RhoA con respecto al grupo Control. n= 15 animales controles, n \geq 10 animales Sham y n \geq 10 animales HSA. * P \leq 0,05 HSA5d vs. Control; # P \leq 0,05 Sham7d vs. Control.

5. Caracterización de la expresión génica mediante análisis por microarray de arterias de modelo animal de HSA

De los resultados mostrados anteriormente se concluyó que varios mecanismos implicados en la vasoconstricción podrían estar alterados, aunque no se pudo concretar un agente causal concreto. Para identificar los mecanismos génicos que podrían estar implicados, se llevó a cabo un estudio de expresión mediante microarray. Se utilizó el ARNm obtenido de las arterias de la superficie del cerebro con la finalidad de aumentar la cantidad de material biológico, asumiendo que estaban en contacto con la sangre inyectada. Se emplearon animales Controles y del día 7 tras la operación siguiendo los protocolos descritos en los apartados 6.2 y 6.3 de Material y Métodos. Posteriormente, el análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo a dos niveles. El primero de ellos consistió en el análisis del perfil transcripcional de los distintos grupos experimentales, mientras que el segundo abordó el análisis de enriquecimiento de genes para ver qué rutas estaban en conjunto expresadas al alza o a la baja.

5.1. Análisis del perfil transcripcional de las arterias de modelo animal de HSA

Una vez que se hubo realizado el microarray, a partir de los datos crudos se verificó la calidad experimental de estos. Para ello, se utilizó el programa TAC 4.0 (Thermo Fisher).

En primer lugar, se realizó un análisis de componentes principales para determinar cuánta similitud existía entre los distintos grupos experimentales y a su vez cómo se distribuían las muestras individuales dentro de cada grupo experimental (Figura 38). Se observó que los perfiles transcripcionales de los tres grupos se encontraban separados, dando a entender la existencia de diferencias entre ellos. Los grupos Control y HSA7d son los que presentaron mayor separación entre sí. Por otra parte, el grupo Sham7d adoptó una posición intermedia entre los otros dos grupos, llegando a ser uno de sus componentes muy parecido al grupo Control.

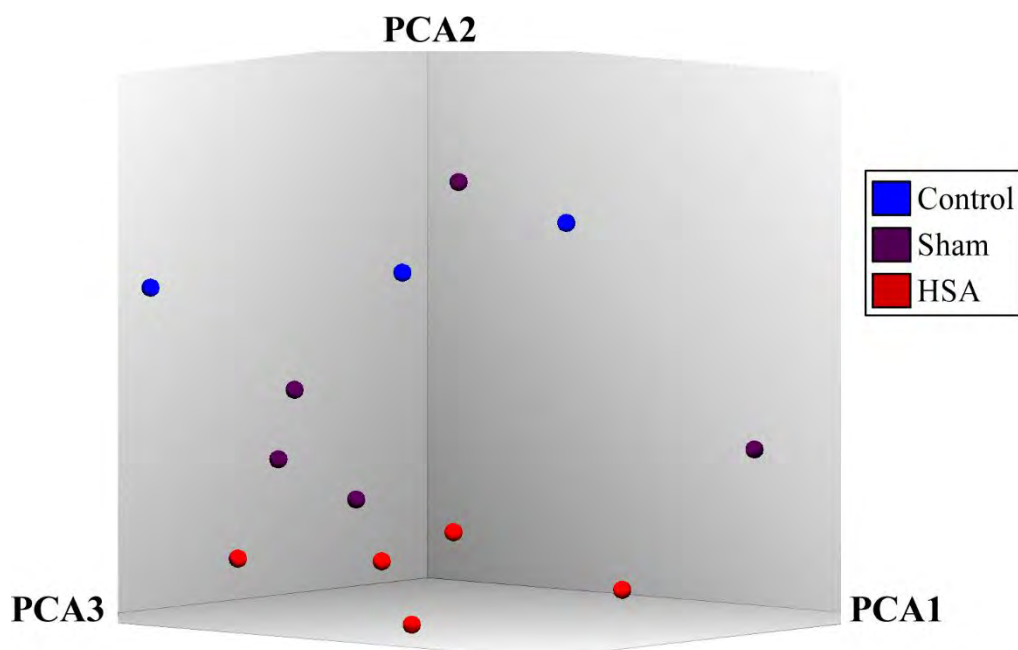


Figura 38. Análisis de componentes principales de muestras de microarray. Se muestra la separación de los perfiles transcripcionales de las muestras Control (n= 3), Sham7d (n= 5) y HSA7d (n= 5).

En segundo lugar, se contabilizaron los genes que estaban sobreexpresados o infraexpresados en las diferentes condiciones. Se determinó un Fold Change < -1,3 y > 1,3 y un *P*-value < 0,05 como puntos de corte para determinar lo expresado diferencialmente y con significación estadística (Figura 39). Se muestran los gráficos de volcán en los que cualitativamente se puede ver la distribución de los genes diferencialmente expresados (paneles A y B). Se determinó que en la comparación de los grupos HSA7d vs. Control hubo 1.706 genes expresados diferencialmente, de los que 905 estaban expresados al alza en la condición patológica y 801 lo estaban a la baja. De forma

análoga en la comparación de los grupos HSA7d vs. Sham7d se contabilizaron 817 genes expresados diferencialmente, de los que 438 eran expresados al alza en el grupo HSA7d y 379 a la baja. Por último, la comparación Sham7d vs. Control mostró 1.246 genes diferencialmente expresados, siendo 724 expresados al alza en el grupo Sham y 522 expresados a la baja (panel C). Estos resultados pusieron de manifiesto la gran diferencia que existía entre los grupos HSA7d y Control y cómo el grupo Sham7d poseía un fenotipo transcripcional intermedio a los otros dos grupos. Se muestra un diagrama de Venn de las distintas comparaciones, en el que aparecen los números de genes que eran expresados diferencialmente de forma específica en cada comparación individual y cuáles eran comunes entre las distintas comparaciones. De esta forma, se muestra que la población de genes diana a estudiar de forma individual se corresponde con el grupo AB (panel D). Esto se debe a que son los genes diferencialmente expresados tanto en la comparación HSA7d vs. Control como HSA7d vs. Sham7d, por lo que se interpreta como aquellos genes expresados diferencialmente asociados a la hemorragia. Se excluye el conjunto ABC, al ser genes que están expresados diferencialmente también en la comparación Sham7d vs. Control, donde no hay sangrado y se asocia con los efectos de la intervención.

Del listado de genes diferencialmente expresados desprendido del grupo AB se han identificado genes que podrían estar implicados en el aumento de la vasorreactividad arterial. Con respecto a los canales iónicos se encontró que los genes *KCND2* y *KCNJ10*, que codifican los canales $K_v4.2$ y $K_i4.1$, estaban infraexpresados en la condición patológica en ambas comparaciones. Sin embargo, *END1* (gen correspondiente a la endotelina) estaba sobreexpresado en la condición patológica. Más allá de estos genes implicados en la vasorreactividad, también resultó interesante la expresión diferencial de genes relacionados con las GTPasas de la familia de Rho (*ARAP3*, *ARHGAP4*, *ARHGEF4*, *RAC2* y *RHOG*) y de genes implicados en la activación y funcionamiento del sistema inmune (*C3*, *IL10RA*, *IL10RB*, *IL5RA*, *IRF8*, *LAG3*, *LCP2* y *LILRB4*). Los detalles relativos al nivel de expresión y a la significación se recogen en la tabla 4.

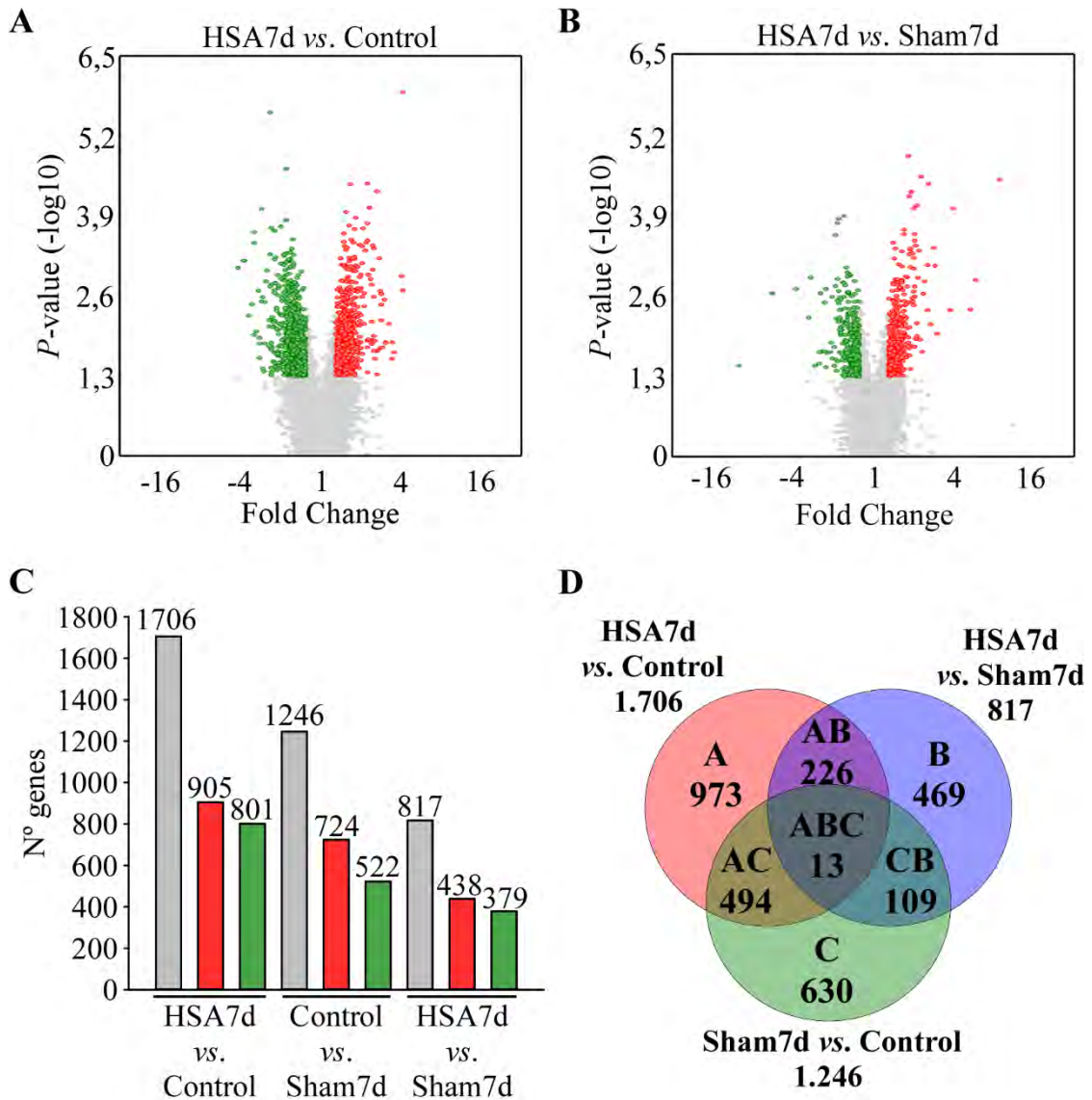


Figura 39. Análisis de microarray de los genes sobreexpresados e infraexpresados en comparaciones de grupos Control, Sham7d y HSA7d. (A y B) Gráficos de volcán indicando las diferencias de expresión entre los grupos estudiados. Fold Change < -1,3 y > 1,3 y P-value < 0,05. (C) Genes diferencialmente expresados en las distintas comparaciones. Las barras grises representan el total de genes expresados diferencialmente (barras: las rojas, los genes sobreexpresados; verdes, los genes infraexpresados, respectivamente). El número sobre cada barra indica los genes diferencialmente expresados. (D) Diagrama de Venn de las distintas comparaciones mostrando el número de genes diferencialmente expresados específicos de cada comparación y comunes entre distintas comparaciones.

Relación	Gene symbol	HSA7d vs. Control		HSA7d vs. Sham7d	
		FC	P-value	FC	P-value
Vasorreactividad arterial	<i>KCND2</i>	-1,41	0,0102	-1,35	0,0063
	<i>KCNJ10</i>	-1,86	0,0005	-1,78	0,0097
	<i>END1</i>	1,41	0,0398	1,75	0,0012
Familia de las GTPasas y su regulación	<i>ARAP3</i>	1,48	0,0494	1,32	0,0135
	<i>ARHGAP4</i>	1,55	0,0217	1,53	0,0312
	<i>ARHGEF4</i>	-1,54	0,0032	-1,49	0,0048
	<i>RAC2</i>	2,71	0,0006	2,14	0,0013
	<i>RHOG</i>	1,53	0,0004	1,35	0,0084
Activación y regulación de la respuesta inmunitaria	<i>C3</i>	3,01	0,0028	2,12	0,0113
	<i>IL10RA</i>	1,57	0,0166	1,57	0,035
	<i>IL10RB</i>	1,55	0,0234	1,31	0,0463
	<i>IL5RA</i>	1,34	0,0099	1,31	0,008
	<i>IRF8</i>	1,65	0,0105	1,46	0,023
	<i>LAG3</i>	-1,67	0,0078	-1,41	0,0104
	<i>LCP2</i>	1,74	0,0264	1,84	0,0234
	<i>LILRB4</i>	1,34	0,0194	1,48	0,0043

Tabla 4. Genes de interés expresados diferencialmente en las comparaciones HSA7d vs. Control y HSA7d vs. Sham7d.

5.2. Análisis de enriquecimiento de genes en arterias de modelo animal de HSA

Una vez realizado el anterior análisis de genes específicos diferencialmente expresados en cada comparación, se decidió llevar a cabo un análisis de enriquecimiento de genes (GSEA). La finalidad del mismo fue estudiar cómo se encontraban de enriquecidas las distintas categorías de genes, dado que se estimó importante no solo conocer cómo se alteraba la expresión de genes concretos, sino también entender cómo se alteraba la expresión global de rutas o genes implicados en funciones iguales o similares. Estos estudios se abordaron desde dos perspectivas. La primera de ellas, se centró en el análisis de enriquecimiento de categorías de genes que estaban relacionadas con la dinámica del Ca^{2+} y el K^+ ; por otro lado, la segunda exploró las categorías de genes más enriquecidas en las librerías *Molecular Function* y *KEGG*.

5.2.1. Enriquecimiento o empobrecimiento de genes implicados en la dinámica de Ca^{2+}

Con respecto a la dinámica del Ca^{2+} , el análisis del enriquecimiento de genes mostró que tanto en la comparación HS7dA vs. Control, como HSA7d vs. Sham7d, había categorías de genes de la librería “*Molecular function*” asociadas a este catión que estaban comúnmente enriquecidas en ambos grupos mientras que otras estaban empobrecidas en ambas comparaciones. Las categorías de genes enriquecidas en ambos grupos fueron “*Ligand gated calcium channel activity*” y “*Calcium release channel activity*”. Ambas hacen referencia al movimiento de Ca^{2+} no ligadas a canales iónicos dependientes de voltaje. Por otro lado, encontramos empobrecidas en ambas comparaciones las categorías “*Calcium ion transmembrane transporter activity*”, “*Calcium channel regulatory activity*” y “*Voltage gated calcium channel activity*”. Solo “*Calcium release channel activity*” alcanzó significación estadística en HSA7d vs. Sham7d ($p= 0,014$). En las tablas 5 y 6 se detallan los datos concernientes a la estadística. A su vez, en la figura 40 se observan los datos más representativos con respecto a este apartado. Estos gráficos muestran el “*enrichment score*” (ES) de cada categoría, que refleja el grado de representación de los genes de la categoría observada sobre los expresados globalmente. El ES de una categoría es el valor más alejado de cero, representando el pico de la gráfica. Los valores positivos se corresponden con categorías cuyos genes se encuentran mayormente expresados en el primer fenotipo, mientras que los valores negativos se corresponden con genes cuya expresión está disminuida en dicho fenotipo.

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR	FWER	Rank at max	Leading edge
Ligand gated calcium channel activity	25	0,38	1,14	0,168	0,616	1	5514	tags=44% list= 25% signal= 58%
Calcium release channel activity	16	0,36	1,08	0,307	0,682	1	5514	tags=50% list=25% signal=66%
Calcium ion transmembrane transporter activity	127	-0,24	-0,88	0,701	0,880	1	4128	tags=23% list=18% signal=28%
Calcium activated cation channel activity	24	-0,28	-0,83	0,74	0,945	1	3058	tags=17% list=14% signal=19%
Calcium channel regulatory activity	39	-0,25	-0,81	0,778	0,937	1	3720	tags=21% list=17% signal=25%
Voltage gated calcium channel activity	41	-0,23	-0,68	0,995	0,972	1	3923	tags=22% list=18% signal=27%

Tabla 5. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de Ca^{2+} (HSA7d vs. Control).

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR	FWER	Rank at max	Leading edge
Calcium release channel activity	16	0,55	1,64	0,014 *	0,308	0,846	4817	tags=38% list=22% signal=48%
Ligand gated calcium channel	25	0,35	1,08	0,303	0,959	1	6428	tags=48% list=29% signal=67%
Calcium activated cation channel activity	24	0,30	0,84	0,745	0,939	1	4522	tags=38% list=20% signal=47%
Calcium channel regulatory activity	39	-0,4	-1,23	0,1	0,661	1	3635	tags=28% list=16% signal=34%
Voltage gated calcium channel activity	41	-0,49	-1,17	0,220	0,753	1	4531	tags=44% list=20% signal=55%
Calcium channel transmembrane transporter activity	127	-0,33	-1,07	0,323	0,775	1	4732	tags=30% list=21% signal=38%

Tabla 6. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de Ca²⁺ (HSA7d vs. Sham7d).

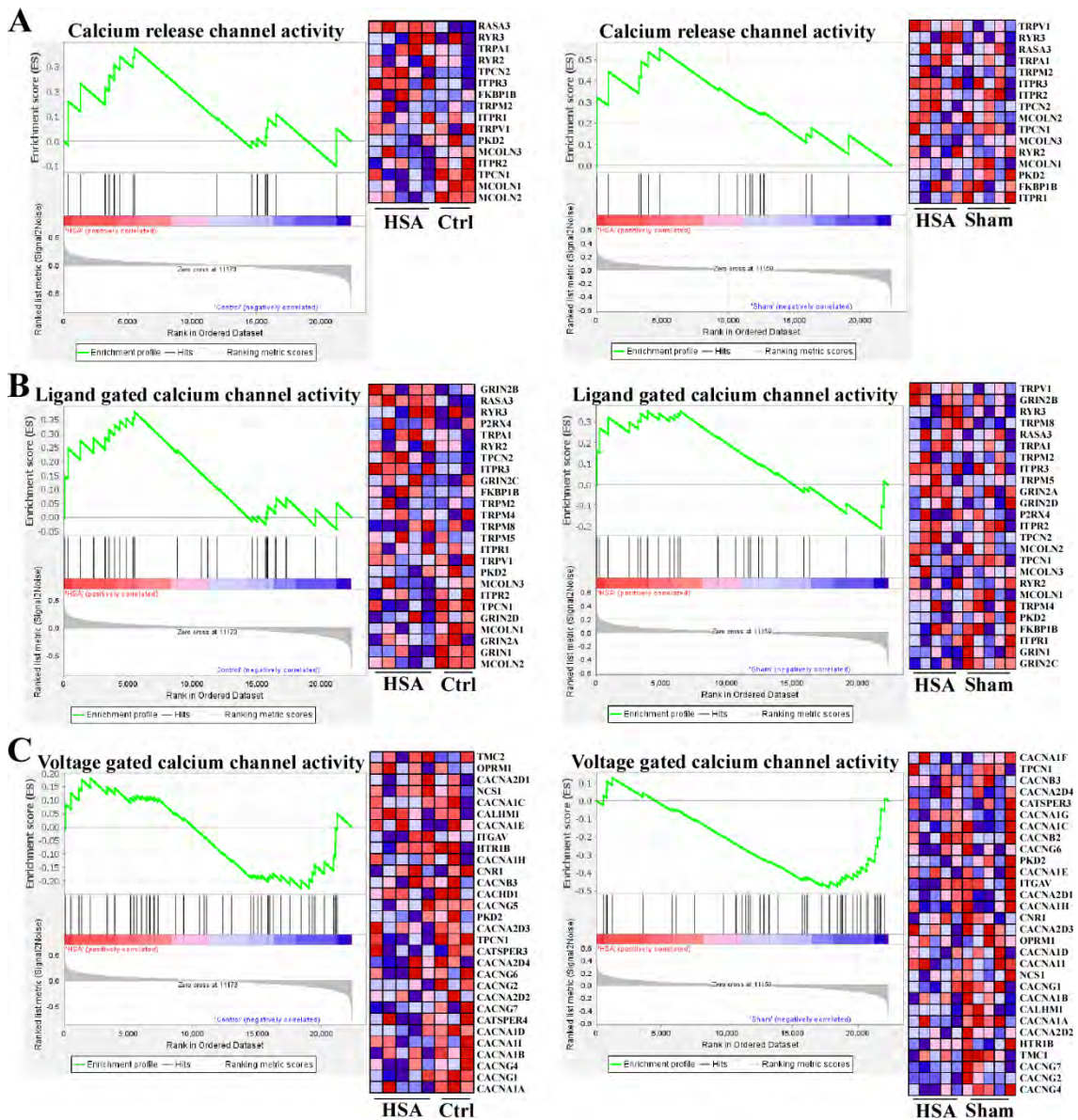


Figura 40. Cambios en el patrón de expresión de genes implicados en la dinámica del Ca^{2+} . Los gráficos muestran a su izquierda el enriquecimiento o empobrecimiento de la categoría de la librería Molecular Function y a su derecha el heat map correspondiente con los genes más o menos expresados según corresponda a enriquecimiento o empobrecimiento, respectivamente. El color rojo simboliza el incremento de la expresión y el azul su disminución. GSEA de las categorías “Calcium release channel activity” (A), “Ligand gated calcium channel activity” (B) y “Voltage gated calcium channel activity” (C) en las comparaciones HSA7d vs. Control (izquierda) y HSA7d vs. Sham7d (derecha).

5.2.2. Empobrecimiento de genes implicados en la dinámica de K⁺

Con respecto a la dinámica de K⁺, en el análisis se encontró que todas las categorías relacionadas con el paso de este ion a través de la membrana se encontraban empobrecidas en ambas comparaciones. Las categorías encontradas en la librería “*Molecular Function*” fueron: “*Inward rectifier potassium channel activity*”, “*Potassium ion antiporter activity*”, “*Potassium ion transmembrane transporter activity*”, “*Potassium ion leak channel activity*”, “*Voltage gated potassium channel activity*”, “*Potassium channel activity*”, “*Potassium channel regulatory activity*” y “*Delayed rectifier potassium channel activity*”.

De todas estas, solo la categoría “*Potassium ion transmembrane transporter activity*” mostró diferencias significativas en la comparación HSA7d vs. Control ($p < 0,000$). Sin embargo, otras cuatro lo fueron en la comparación HSA7d vs. Sham7d ($p < 0,04$). Estas son: “*Inward rectifier potassium channel activity*”, “*Potassium channel activity*”, “*Voltage gated potassium channel activity*” y “*Potassium ion transmembrane transporter activity*”. Estos resultados pueden observarse en las tablas 7 y 8:

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR	FWER	Rank at max	Leading edge
Inward rectifier potassium channel activity	21	-0,66	-1,35	0,102	0,645	1	3802	tags=43% list=17% signal=52%
Potassium ion antiporter activity	16	-0,52	-1,32	0,057	0,635	1	925	tags=25% list=4% signal=26%
Potassium ion transmembrane transporter activity	147	-0,42	-1,30	0,000 ***	0,622	1	3336	tags=29% list=15% signal=33%
Potassium ion leak channel activity	15	-0,54	-1,29	0,137	0,625	1	5381	tags=60% list=24% signal=79%
Voltage gated potassium channel activity	85	-0,44	-1,23	0,108	0,662	1	3336	tags=29% list=15% signal=34%
Potassium channel activity	116	-0,41	-1,23	0,144	0,649	1	3802	tags=31% list=17% signal=37%
Potassium channel regulator activity	51	-0,34	-1,16	0,221	0,634	1	4181	tags=25% list=19% signal=31%
Delayed rectifier potassium channel activity	32	-0,33	-0,92	0,479	0,837	1	5433	tags=41% list=24% signal=54%

Tabla 7. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de K⁺ (HSA7d vs. Control).

GS	Size	ES	NES	NOM p-val	FDR	FWER	Rank at max	Leading edge
Inward rectifier potassium channel activity	21	-0,61	-1,46	0,024 *	0,896	1	2085	tags=28% list=19% signal=34%
Potassium channel activity	116	-0,43	-1,38	0,000 ***	0,872	1	2561	tags=24% list=11% signal=27%
Voltage gated potassium channel activity	85	-0,44	-1,37	0,000 ***	0,831	1	2561	tags=26% list=11% signal=29%
Potassium ion transmembrane transporter activity	147	-0,42	-1,34	0,040 *	0,780	1	2561	tags=22% list=11% signal=25%
Potassium channel regulator activity	51	-0,42	-1,26	0,148	0,644	1	3211	tags=27% list=14% signal=32%
Potassium ion leak channel activity	15	-0,39	-0,95	0,567	0,621	1	4390	tags=20% list=20% signal=25%
Potassium ion antiporter activity	16	-0,39	-0,83	0,736	0,954	1	4633	tags=38% list=21% signal=47%
Delayed rectifier potassium channel activity	32	-0,28	-0,75	0,946	0,973	1	3211	tags=22% list=14% signal=26%

Tabla 8. Estadística de las categorías relacionados con la dinámica de K⁺ (HSA7d vs. Sham7d).

Además de lo representado en las tablas anteriores, en la figura 41 se mostraron los paneles del análisis de GSEA que tienen relación con cuatro categorías diferentes de canales de K⁺ dependientes de voltaje. Debido a la sospecha de que podría estar ocurriendo algún evento a este nivel se ha precisado mostrar gráficamente los niveles de expresión de los genes correspondientes en cada categoría en función de las comparaciones entre los distintos grupos experimentales. Estos datos confirmaban que los genes implicados en la dinámica de K⁺ presentaban una disminución de su expresión en las arterias procedentes de animales HSA7d con respecto al resto de grupos. Este hecho podría ser una de las causas del fenómeno de despolarización que se encuentran en los miocitos procedente las arterias de estos animales.

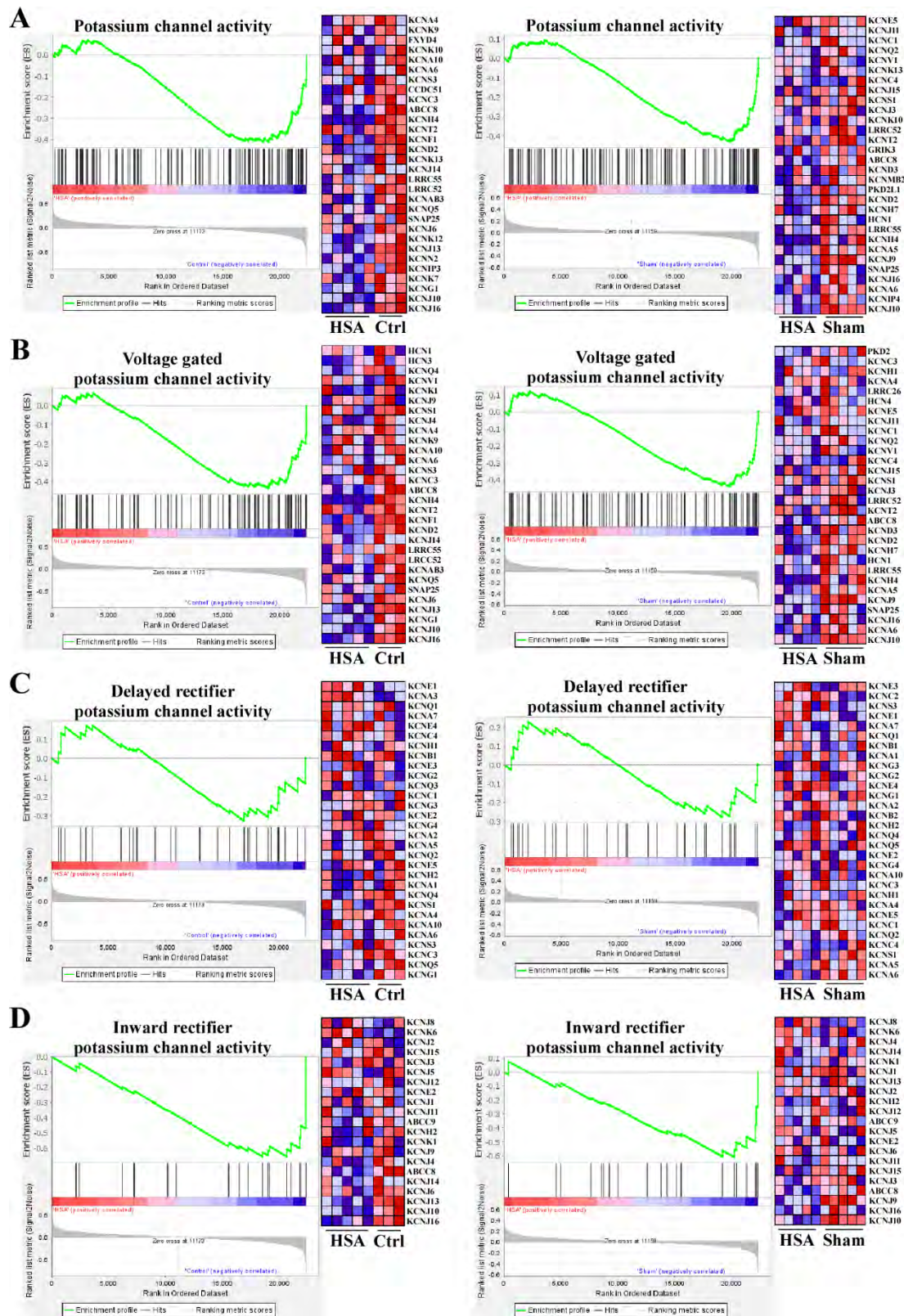


Figura 41. Empobrecimiento en la expresión de genes relacionados con la dinámica de K^+ . Los gráficos muestran a su izquierda el empobrecimiento de la categoría de la librería Molecular Function y a su derecha el heat map correspondiente con los genes menos expresados. El color rojo simboliza el incremento de la expresión y el azul su disminución. GSEA de las categorías “Potassium channel activity” (A), “Voltage gated potassium channel activity” (B), “Delayed rectifier potassium channel activity” (C) y “Inward

rectifier potassium channel activity” (D) en las comparaciones HSA7d vs. Control (izquierda) y HSA7d vs. Sham7d (derecha).

5.2.3. Análisis global de GSEA en muestras de modelo animal de HSA

En el siguiente apartado se detallan las categorías de genes más enriquecidas y empobrecidas en las comparaciones HSA7d vs. Control y HSA7d vs. Sham7d. Se utilizaron como librerías de referencias los repositorios *Molecular Function* y *KEGG* y se tomaron las 20 primeras categorías de genes más enriquecidas para cada comparación. Los listados de dichas categorías acompañados de sus correspondientes estadísticos se detallaron en el anexo 1.

Con respecto a la librería *Molecular Function* se encontraron los siguientes resultados cuando se comparó con respecto a la condición patológica. En esta condición se observó que se enriquecían categorías de genes relacionadas con la modificación, reparación e interacción de ácidos nucleicos, reparación del ADN, liberación de Ca^{2+} mediada por canales y activadores de la transcripción. Sin embargo, se veían empobrecidas rutas que mediaban el paso de iones a través de la membrana mediante transportadores y simportadores (tanto de cationes como de aniones) y rutas que median el paso de biomoléculas a través de la membrana.

Con respecto a la librería *KEGG*, en la condición patológica se veían enriquecidas categorías relacionadas con la respuesta inmune, degradación de proteínas y respuesta a daños en ácidos nucleicos. Además, también se enriquecían categorías relacionadas con cáncer y ciclo celular, adhesión, reorganización del citoesqueleto y de la vía lisosomal. Por el contrario, en la condición patológica se encontraban empobrecidas categorías implicadas en ciclo celular, síntesis de lípidos, derivados y biomoléculas, transporte a través de la membrana y la respuesta a ácidos nucleicos no propios.

Dentro de las categorías enunciadas en los párrafos anteriores, y detalladas en el anexo 1, se interpretaron de especial interés las relacionadas con la activación del sistema inmunitario y con el daño y reparación del ADN. Estos conjuntos de categorías enriquecidas enfatizan y confirman que la HSA inducida en el modelo animal da lugar a alteraciones más allá de las producidas a nivel de la maquinaria contráctil. El enriquecimiento de estas categorías se muestra en las figuras 42 y 43.

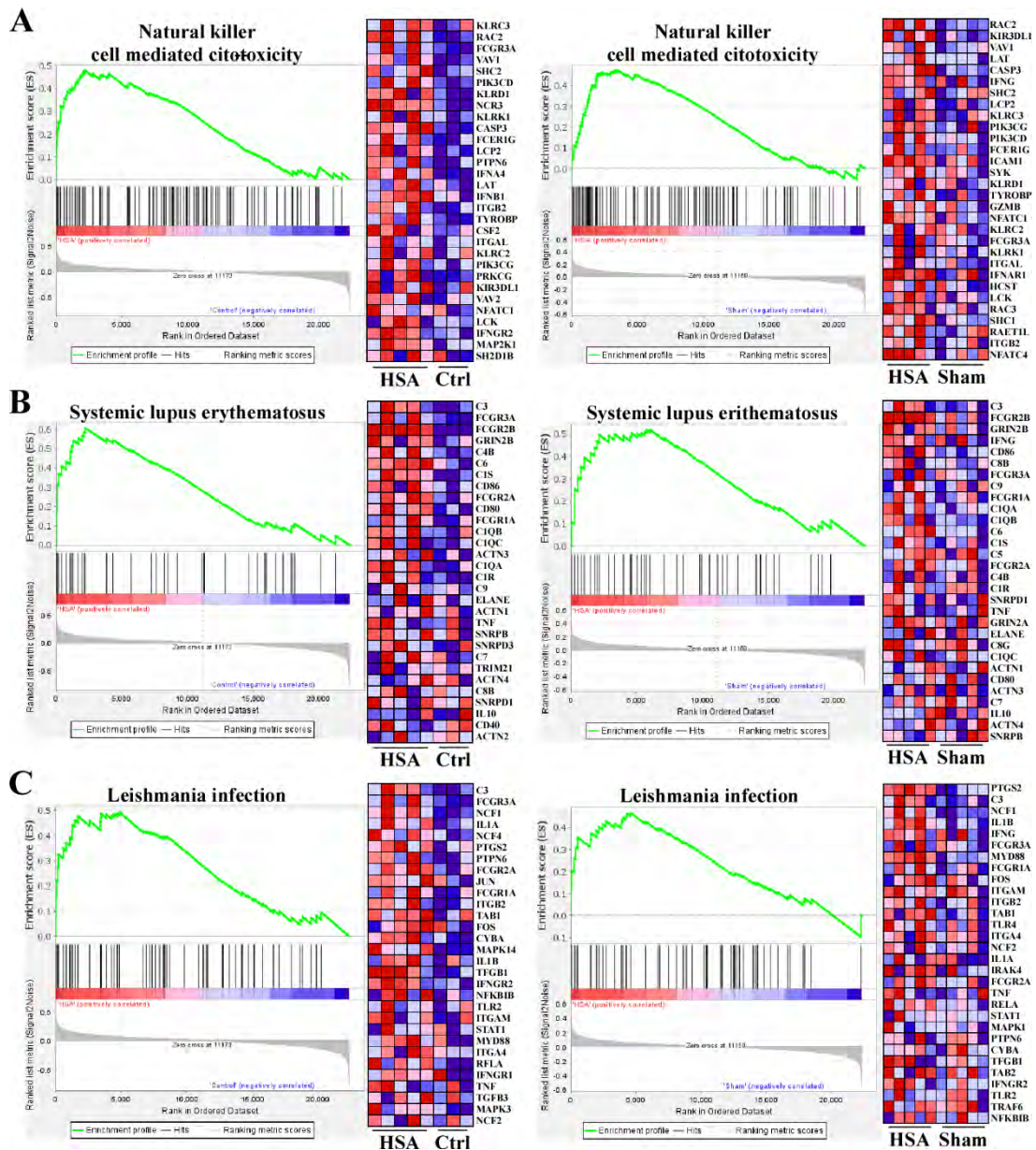


Figura 42. Enriquecimiento de genes implicados en la activación de la respuesta inmune. Los gráficos muestran a la izquierda el enriquecimiento de la categoría de la librería KEGG y a la derecha el heat map correspondiente a los genes más enriquecidos. El color rojo simboliza el incremento de la expresión y el azul su disminución. GSEA de las categorías “Natural killer cell mediated cytotoxicity” (A), “Systemic lupus erithematosus” (B) y “Leishmania infection” (C) en las comparaciones HSA7d vs. Control (izquierda) y HSA7d vs. Sham7d (derecha).

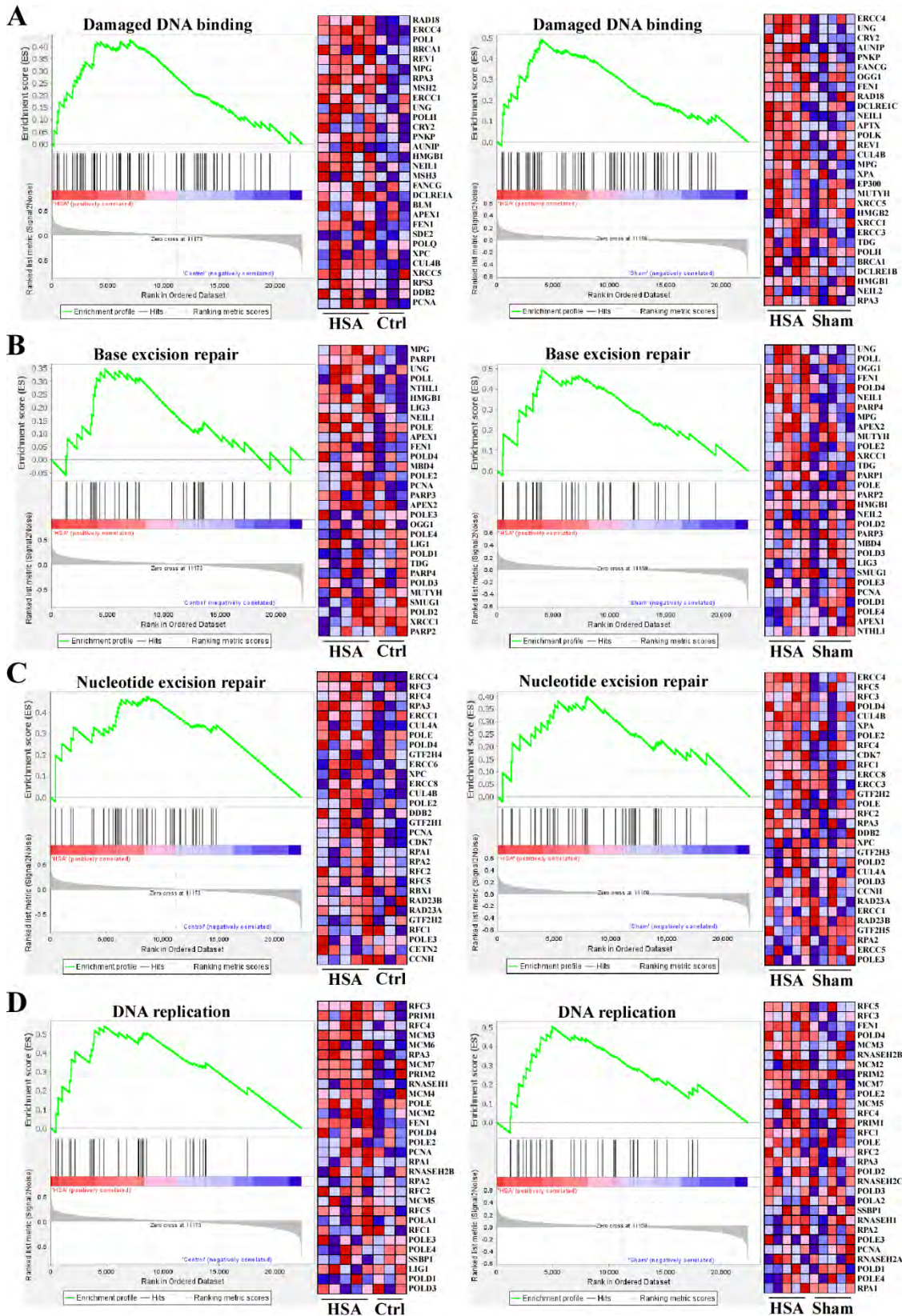


Figura 43. Enriquecimiento de procesos relacionados con daño y reparación del ADN. Los gráficos muestran a la izquierda el enriquecimiento de la categoría y a la derecha el heat map correspondiente de los genes más enriquecidos. El color rojo simboliza el incremento de la expresión y el azul su disminución. GSEA de las categorías “Damaged DNA binding” (A) de la librería Molecular Function y “Base excision

repair” (B), “Nucleotide excision repair” (C) y “DNA replication” (D) de la librería KEGG en las comparaciones HSA7d vs. Control (izquierda) y HSA7d vs. Sham7d (derecha).

En conclusión, nuestros datos mostraron que debido al proceso quirúrgico y a la HSA se indujeron cambios en el perfil transcripcional de los tres grupos experimentales observados donde el grupo Sham7d presentó un perfil intermedio a los grupos Control y HSA7d. Centrándonos en las diferencias con respecto al grupo patológico, nuestros resultados reflejaron un enriquecimiento de la expresión de genes implicados en movimiento de Ca^{2+} independientes a canales dependientes de voltaje que ocurría de forma paralela al empobrecimiento de estos últimos. Así mismo, se encontró un empobrecimiento en las categorías génicas relacionadas con la dinámica del K^+ . En conjunto, estos datos respaldarían el fenómeno de despolarización observado anteriormente, con incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ junto con una disminución de las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Por último, nuestros resultados también indicaron que como consecuencia a la HSA se producía un proceso de activación inflamatoria y de estrés. Esto sirvió como preámbulo para estudiar fenómenos relacionados con la inflamación en PBMCs de pacientes que había sufrido una HSA.

6. Curso temporal de los cambios histológicos de la arteria basilar en modelo animal de HSA

El objetivo de este apartado fue determinar si posteriormente a la inducción de la HSA sucedían cambios histológicos en las arterias cerebrales que pudieran ser relevantes en el contexto fisiopatológico de la HSA. El estudio se focalizó en la arteria basilar ya que era de fácil acceso y comparación. Se realizó una tinción tricrómica de Masson para poder distinguir los tejidos muscular y conjuntivo que conforman la pared arterial en las preparaciones histológicas obtenidas. Con respecto a los parámetros histológicos estudiados, se evaluó el área de las capas muscular y del área de fibrosis, además del área de la luz arterial. Las imágenes representativas de los distintos cortes histológicos, así como el análisis estadístico de los parámetros estudiados se representa en la figura 44.

El estudio del área de la capa muscular determinó que tanto en el modelo HSA como en el Sham se producía un aumento del mismo (panel B). Sin embargo, solo se encontró significancia estadística en el área de los anillos arteriales del grupo HSA en el día 5 ($13.954,81 \pm 683,51 \mu\text{m}^2$) con respecto del grupo Control ($10.905,58 \pm 692,65 \mu\text{m}^2$). Además, se observó un comportamiento similar al grupo Sham5d ($11.885,62 \pm 1.032,01$

μm^2) aunque no alcanzó significación. No se detectó ninguna otra diferencia significativa con el resto de grupos.

Se encontró un gran incremento significativo del área tejido conjuntivo de la capa adventicia en el grupo HSA en el día 5 ($3.002,81 \pm 314,8 \mu\text{m}^2$) con respecto al grupo Control ($1.412,16 \pm 352,91 \mu\text{m}^2$) y su correspondiente grupo Sham en el día 5 ($1.528,44 \pm 293,52 \mu\text{m}^2$) (panel C). No se produjo ninguna otra diferencia con ningún otro grupo ni entre estos, aunque la expresión de ARNm de diferentes subtipos de colágeno en las arterias HSA en el día 7 se encontraba significativamente incrementada con respecto al grupo Control y su correspondiente Sham. Se advirtió un incremento del área de la capa adventicia en los grupos Sham y HSA en el día 9.

Los parámetros estudiados anteriormente fueron analizados de nuevo a modo de ratio para distinguir que el aumento de un área u otra no estuviera asociado al incremento de ambas. Para ello se realizó el cociente del área de fibrosis entre el área muscular. Se observó que pese a haber un incremento del área muscular en el grupo HSA en el día 5, el incremento de su área adventicia era de tal magnitud que se daba lugar a una ratio elevada ($0,21 \pm 0,02$), significativamente mayor al grupo Control ($0,12 \pm 0,03$) y a su correspondiente grupo Sham en el día 5 ($0,14 \pm 0,02$). Sin embargo, como se observaba en las otras gráficas el resto de grupos no mostró diferencias estadísticas (panel D). Sí es de destacar que, en este cociente ambos grupos en el día 9 tenían unos valores incrementados con respecto al resto de grupos, salvo el HSA en el día 5, pero sin ser estadísticamente significativos.

Por último, se analizó la luz de las arterias con la finalidad de ver si tras la HSA se producía un estrechamiento de estas (panel E). Únicamente se observaron diferencias significativas entre las arterias de los grupos Sham y HSA a día 1 ($25.876,38 \pm 2.388,17 \mu\text{m}^2$ y $18.404 \pm 933,03 \mu\text{m}^2$, respectivamente), sin que el resto de grupos las generase. En estas medidas se encontró una alta dispersión de los valores, con errores de gran amplitud.

En conjunto, los resultados de este apartado sugirieron que paralelamente a las alteraciones funcionales expuestas se producían alteraciones histológicas de los vasos afectados por la HSA. Estas cursaron con un incremento del tejido conjuntivo del vaso, que alcanzó su pico a los 7 días tras la HSA y un estrechamiento de su luz, que fue significativo dentro de las primeras 24 horas tras el evento hemorrágico.

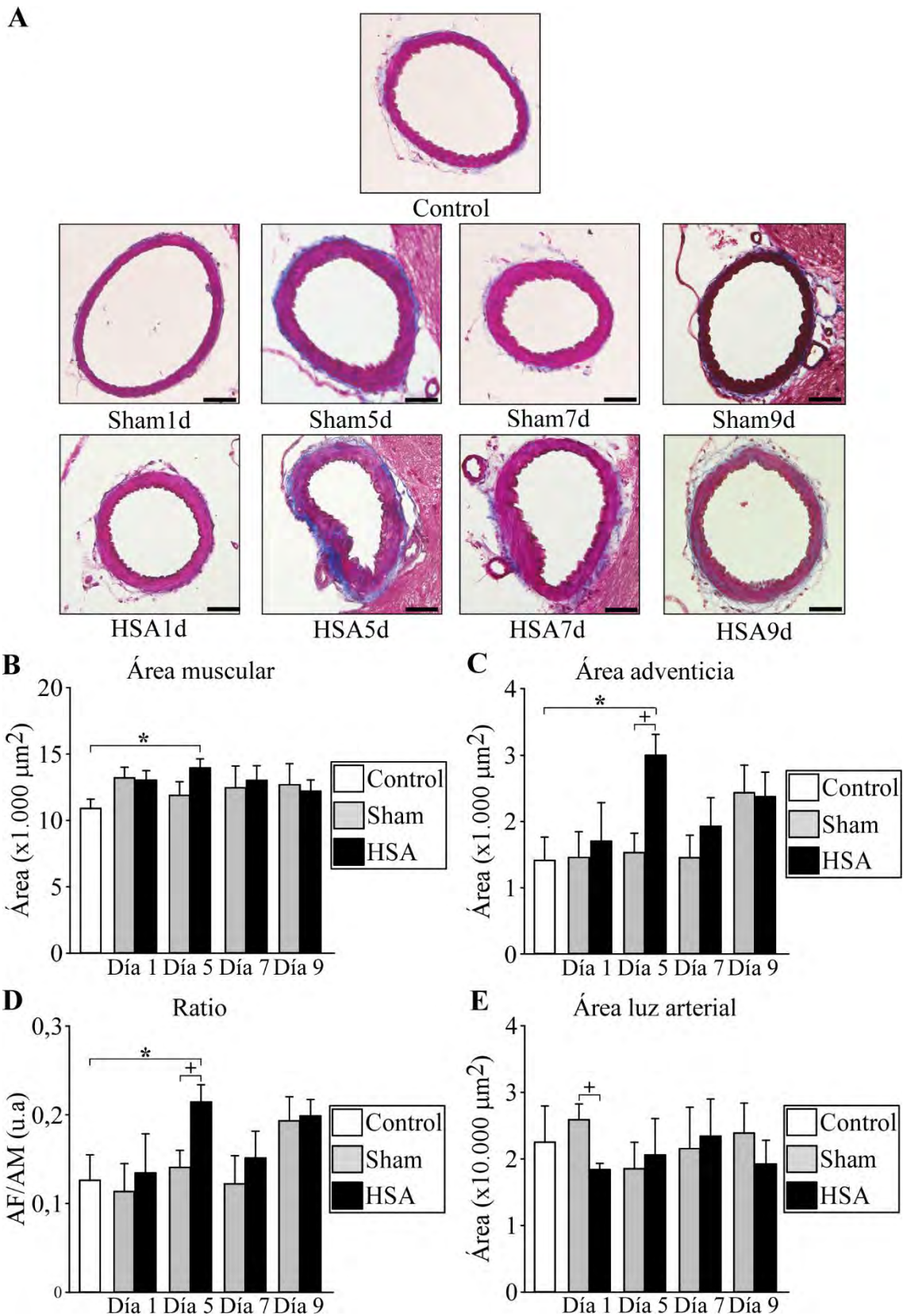


Figura 44. Remodelado vascular tras la HSA. Detalle mediante tinción tricrómica de Masson de la evolución de la fibrosis en la capa adventicia de los animales HSA tras la inducción de la HSA. (A) Imágenes representativas de secciones transversales de arteria basilar. Aumento: 40X. Barra de escala= 50 μ m. (B-D) Análisis estadístico de las áreas de la capa muscular, la adventicia y de la ratio entre ambas,

respectivamente. En los animales HSA5d se produjo un aumento significativo de estos valores con respecto a los de los grupos Control y Sham5d. $n = 54$ cortes histológicos Controles (5 animales), $n \geq 44$ cortes histológicos Sham (5 animales) y $n \geq 34$ cortes histológicos HSA (5 animales). * $P \leq 0,05$ HSA5d vs. Control; + $P \leq 0,05$ HSA5d vs. Sham5d. (E) Análisis estadístico del área de la luz de las arterias. Se produjo una disminución significativa de la luz de HSA1d con respecto de Sham1d $n = 43$ cortes histológicos controles (5 animales), $n \geq 18$ cortes histológicos Sham (4 animales) y $n \geq 32$ cortes histológicos HSA (4 animales). + $P \leq 0,05$ HSA1d vs. Sham1d.

CAPÍTULO II: Estudio de los cambios de las PBMCs procedentes de pacientes con aHSA

1. Estudio de muestras sanguíneas de pacientes de aHSA

En el presente apartado se comienza el segundo bloque de resultados, que se centró en los cambios que pueden desarrollar las PBMCs procedentes de pacientes con aHSA. Para estudiar la participación de estas células en el desarrollo de la HSA se llevaron a cabo experimentos de adhesión *in vitro* sobre una monocapa de células HUVEC en cultivo (apartado 8) y su inmunofenotipado mediante citometría de flujo (apartado 9). Los pacientes incluidos en estos experimentos cumplían con los criterios de inclusión especificados en el apartado 2.1. de Material y Métodos.

1.1. Características demográficas y clínicas de los pacientes y controles

Se muestran los datos demográficos y clínicos de los pacientes y controles que se incluyeron en los experimentos (tabla 9). Estos datos se utilizaron posteriormente para realizar las correlaciones con los grados de adhesión que mostraron las PBMCs en los estudios *in vitro*.

Descriptivos		Controles (n=18)	HSA (n=18)
Edad, media (ES)		42,61 (2,18)	56,11 (2,75)
Sexo, n (%)	Hombre	9 (50)	6 (33,3)
	Mujer	9 (50)	12 (66,6)
Fumador, n (%)	No	16 (88,9)	8 (44,4)
	Sí	2 (11,1)	10 (56,6)
Bebedor, n (%)	No	13 (72,2)	17 (94,4)
	Sí	5 (27,8)	1 (5,6)
Hipertenso, n (%)	No	17 (94,4)	9 (50)
	Sí	1 (5,6)	9 (50)

Tabla 9. Datos demográficos de los individuos controles y los pacientes con aHSA.

A los pacientes incluidos además se les realizó un estudio clínico para evaluar su estado y pronóstico en el momento del ingreso. Se utilizaron las escalas de: coma de Glasgow (GCS), para evaluar la consciencia 24 horas tras la resucitación del paciente; de Hunt y Hess y WFNS, para evaluar la severidad clínica de la aHSA; y de Fisher modificada, para evaluar el riesgo de isquemia cerebral tardía. La clasificación de los pacientes según las diferentes escalas se recogió en la tabla 10.

Escala Glasgow a las 24 horas tras resucitación		
Grado	Frecuencia	Porcentaje
3	2	11,1
4	1	5,6
7	1	5,6
12	1	5,6
13	3	16,7
14	3	16,7
15	7	38,9
Escala Hunt y Hess al ingreso hospitalario		
Grado	Frecuencia	Porcentaje
II	11	61,1
III	3	16,7
IV	1	5,6
V	3	16,7
Escala WFNS al ingreso hospitalario		
Grado	Frecuencia	Porcentaje
I	6	33,3
II	6	33,3
III	2	11,1
IV	1	5,6
V	3	16,7
Escala Fisher modificada en TAC de ingreso hospitalario		
Grado	Frecuencia	Porcentaje
III	2	11,1
IV	16	88,9

Tabla 10. Clasificación de pacientes según escalas de consciencia (GCS), severidad tras aHSA (Hunt y Hess y WFNS) y riesgo de isquemia cerebral tardía (Fisher modificada).

Como se observa en la tabla anterior, la mayoría de los pacientes que ingresaron con HSA tenían niveles de consciencia elevados, al agruparse la mayoría de ellos en valores altos de la GCS (grados 13–15 GCS, 72,3 % pacientes). En este sentido, también se encontró un alto porcentaje de pacientes en grados bajos de las escalas de Hunt y Hess y WFNS (grados II-III, 77,8 % pacientes; y grados I-III, 77,7 % de pacientes, respectivamente). Sin embargo, como recoge la escala Fisher modificada, un alto porcentaje de estos pacientes resultó en alto riesgo de desarrollar una isquemia cerebral tardía (grado IV, 88,9 % pacientes). La tabla 11 recoge el porcentaje de pacientes que desarrollaron vasoespasmó según los diferentes métodos diagnósticos del mismo:

Vasoespasma sonográfico		
	Frecuencia	Porcentaje
No	9	50
Sí	9	50
Vasoespasma clínico		
	Frecuencia	Porcentaje
No	14	77,8
Sí	4	22,2
Vasoespasma arteriográfico		
	Frecuencia	Porcentaje
No	10	55,6
Sí	8	44,4

Tabla 11. Frecuencia de vasoespasma según diferentes métodos diagnósticos.

2. Interacción de PBMCs-endotelio

Una vez expuestos los antecedentes y características clínicas de los controles y pacientes cuyas células se van a utilizar en los experimentos, se continúa con los resultados obtenidos en los experimentos de adhesión. En primer lugar, se realizaron una serie de experimentos destinados a evaluar la capacidad de adhesión de PBMCs, en condiciones basales, aisladas de sangre periférica de pacientes con aHSA y de Controles. En segundo lugar, se evaluó el efecto que pudiera generar el plasma procedente de estos pacientes en la adhesión sobre células HUVEC.

2.1. Estudio de la adhesión *in vitro* de PBMCs en condición basal sobre células HUVEC

Estos experimentos de adhesión *in vitro* se realizaron utilizando la metodología de cocultivo celular sobre una monocapa de células HUVEC. El grado de adhesión basal de las PBMCs, las cuales no fueron estimuladas, se evaluó en condiciones de células HUVEC sin estimular o estimuladas con TNF α (50 ng/mL, 12 horas). Estos experimentos se realizaron de esta forma para evaluar si, además del estado de las PBMCs, la activación de las células HUVEC pudiera tener efectos sobre la adhesión.

La figura 45 refleja los resultados de estos experimentos. Se encontró un aumento estadísticamente significativo de la adhesión basal de las PBMCs, de pacientes con respecto de las de Controles (panel A). Este aumento se observó en ambos días de seguimiento (Control= 98.788,74 \pm 13.946,32 u.a., P24h= 134.685,42 \pm 20.954,44 u.a. y P5d= 143.669 \pm 19.866,9 u.a.). Sin embargo, cuando las células HUVEC fueron estimuladas con TNF α (panel B), solo las PBMCs de los pacientes a las 24 horas

presentaron un aumento de su adhesión con respecto de las de Controles (Control= 168.837,44±13.504,12 u.a. y P24h= 229.625,53±20.697,65 u.a.). Las PBMCs de los pacientes a los 5 días de la aHSA no presentaron tal incremento en su adhesión (P5d= 195.107,78±15.783,42 u.a.), siendo su diferencia con respecto al grupo P24h próxima a la significación estadística ($P= 0,053$). Este resultado confirmó que el $TNF\alpha$ induce cambios en la expresión de las moléculas que participan en la adhesión y que están situadas en la superficie de las células HUVEC.

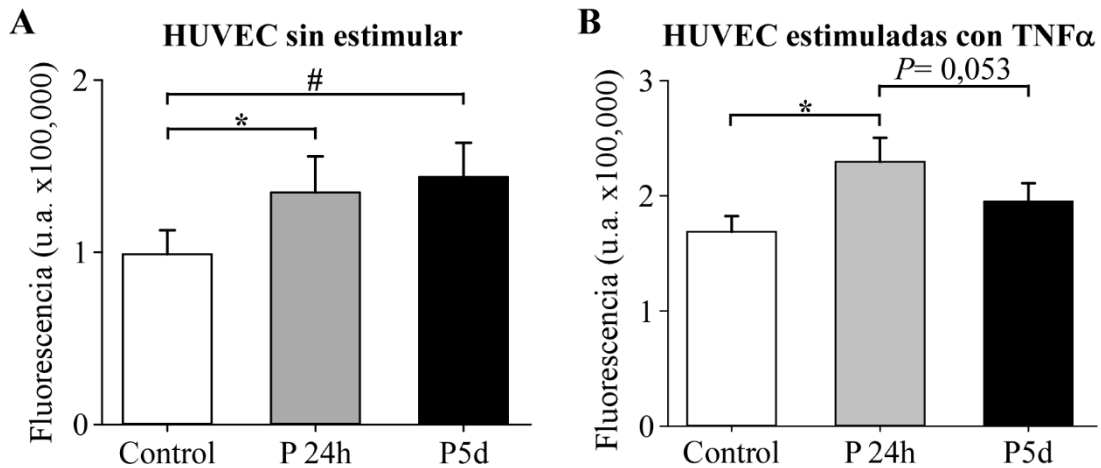


Figura 45. Adhesión de PBMCs en condiciones basales sobre células HUVEC. Las PBMCs fueron marcadas con un marcador fluorescente. La fluorescencia generada por el marcador se midió en unidades arbitrarias de fluorescencia (u.a.). Análisis estadístico de: (A) adhesión de PBMCs sobre células HUVEC sin estimular. Se produjo un incremento significativo de la adhesión de PBMCs de pacientes a las 24 horas y 5 días; y (B) adhesión de PBMCs sobre células HUVEC estimuladas con $TNF\alpha$ (50 ng/mL, 12 horas). Se produjo un incremento de la adhesión de PBMCs a las 24 horas. $n \geq 16$ parejas control/paciente. * $P \leq 0,05$ P24h vs. Control; # $P \leq 0,05$ P5d vs. Control.

Tras estudiar la adhesión de forma global se llevaron a cabo estudios estadísticos para evaluar la relación de esta con las distintas características de pacientes y con los controles. Se estudió la correlación con las escalas de valoración de la aHSA y si existían diferencias en el grado de adhesión con respecto a la presencia vasoespasmo. Para estudiar el grado de correlación con las escalas clínicas se utilizó el estadístico Rho de Spearman, que era más adecuado debido a que las variables tenían categorías ordenadas, mientras que para las variables continuas se usó la correlación de Pearson.

La figura 46 muestra los resultados de los análisis de correlación de la adhesión de las PBMCs procedentes de pacientes en las primeras 24 horas tras la aHSA con respecto a las diferentes escalas de evaluación clínicas. En estos análisis se produjeron discrepancias entre la correlación de la adhesión sobre células HUVEC basales y estimuladas que

podieron ser debidas a la pérdida de dos pacientes de alto grado de severidad en el análisis de la adhesión con TNF α . No se encontró ninguna correlación significativa entre las diferentes escalas de severidad clínica y la adhesión sobre células endoteliales.

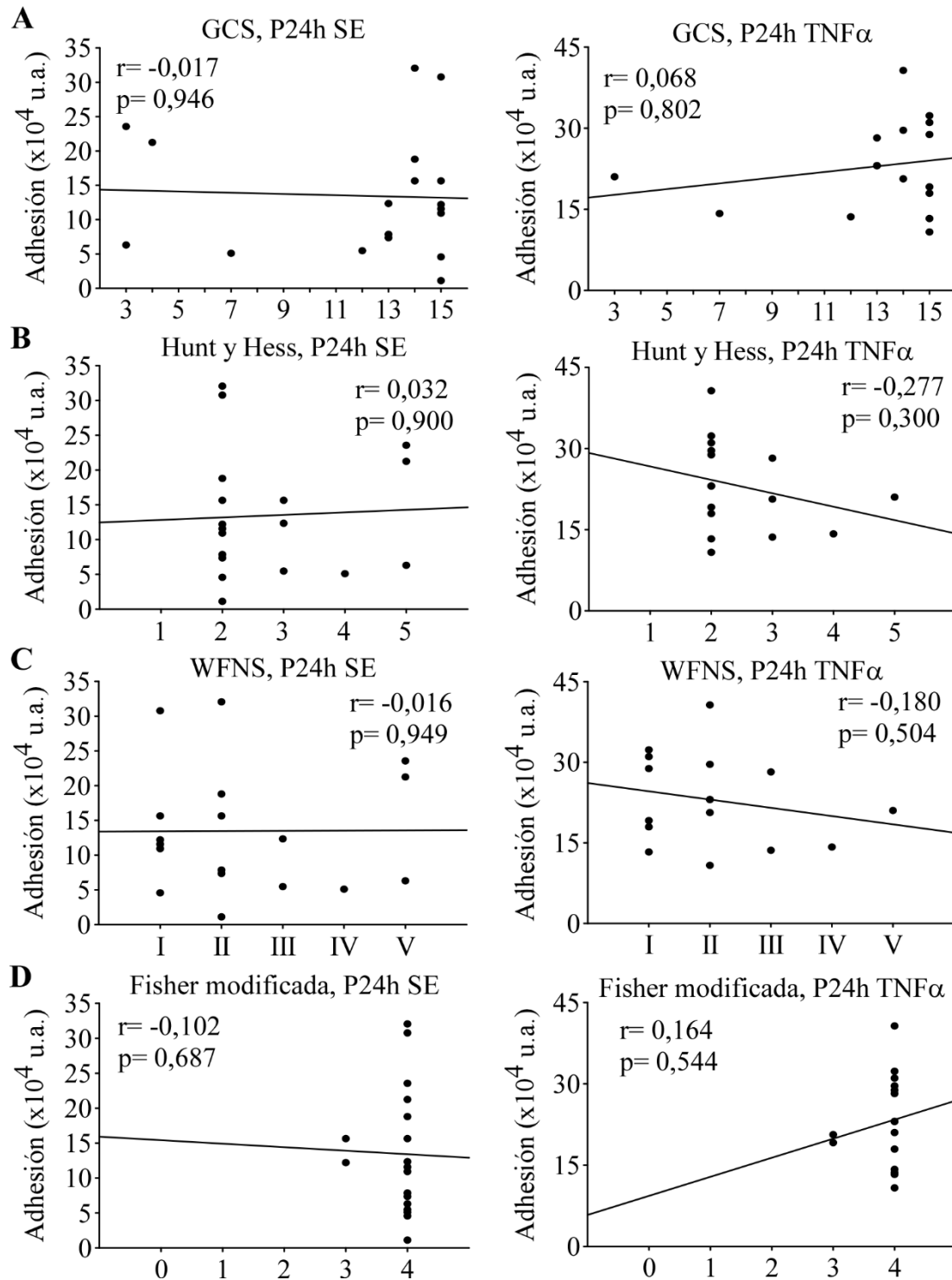


Figura 46. Correlación de la adhesión de PBMCs de pacientes a las 24 horas con las diferentes escalas de valoración de la aHSA. Correspondencia con datos sin estimulación de células HUVEC (SE) y con estimulación con TNF α (50 ng/mL, 12 horas). (A) GCS, (B) escala Hunt y Hess, (C) escala de WFNS y

(D) escala de Fisher modificada. No se produjo ninguna correlación significativa entre la adhesión de PBMCs y las escalas de valoración. n= 18 pacientes SE y n= 16 pacientes TNF α . r, Rho de Spearman.

La figura 47 muestra los resultados de la correlación entre el grado de adhesión de las PBMCs de los pacientes al 5 día tras la aHSA y los estadios de severidad de las diferentes escalas de valoración aplicadas tras una aHSA. No se observaron correlaciones significativas entre el grado de adhesión de las PBMCs y el estadio de los pacientes evaluados según las diferentes escalas de severidad.

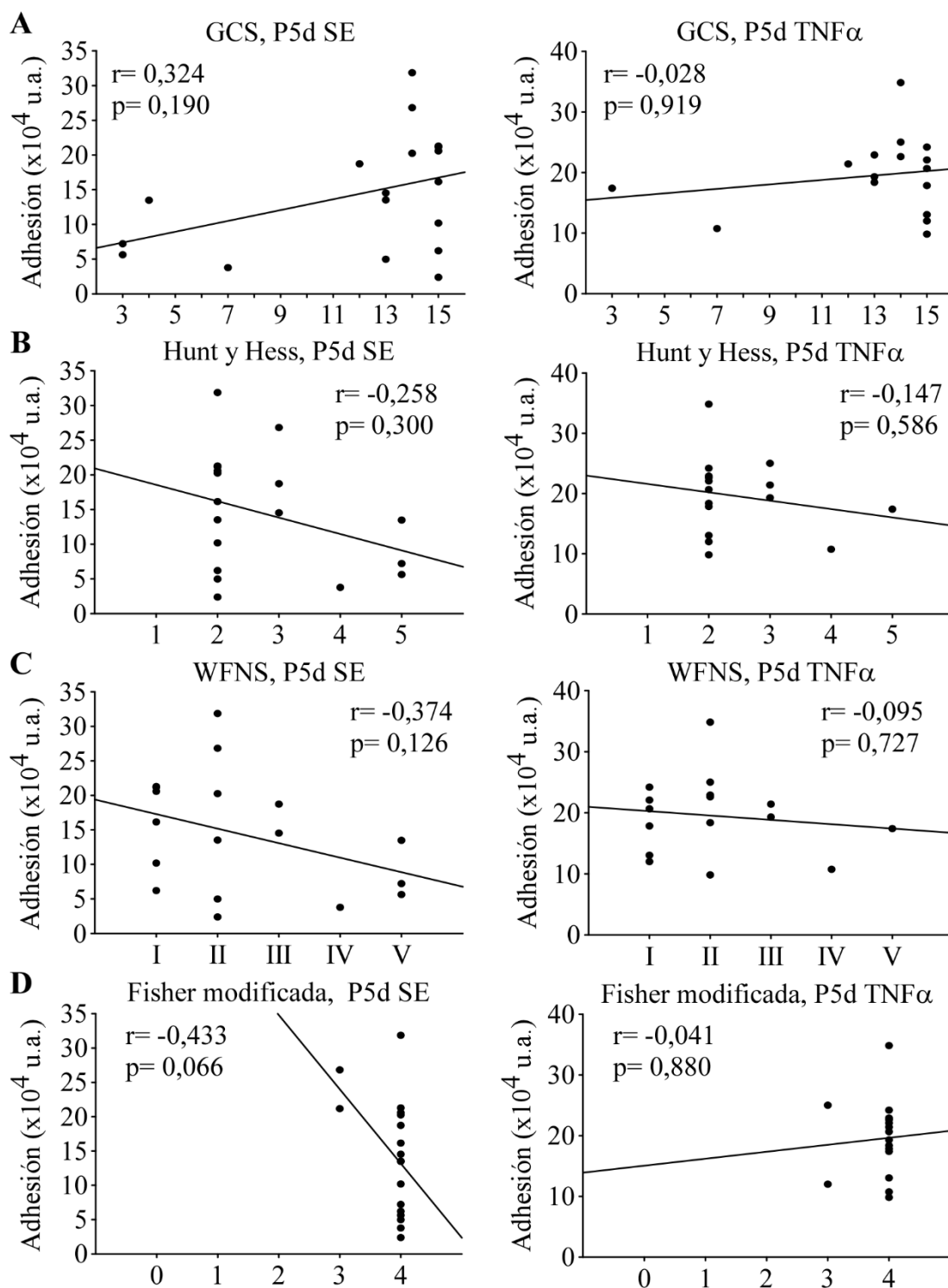


Figura 47. Correlación de la adhesión de PBMCs de pacientes a los 5 días con las diferentes escalas de valoración de la aHSA. Correspondencia con datos sin estimulación de células HUVEC (SE) y con estimulación con TNF α (50 ng/mL, 12 horas). (A) GCS, (B) escala Hunt y Hess, (C) escala de WFNS y (D) escala de Fisher modificada. No se produjo ninguna correlación significativa entre la adhesión de PBMCs y las escalas de valoración. n= 18 pacientes SE y n= 16 pacientes TNF α . r, Rho de Spearman.

Las figuras 48 y 49, presentadas a continuación, muestran la relación entre el vasoespasmo y el grado adhesión de las PBMCs pertenecientes a pacientes tanto a las 24 horas como a los 5 días tras la HSA. En ambos casos, las PBMCs procedentes de pacientes sin vasoespasmo tenían una mayor capacidad de adhesión con respecto a las de los pacientes que sí lo presentaban. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Esta situación se mantuvo tanto en la situación de vasoespasmo global como en las diferentes categorías de vasoespasmo medido por las distintas técnicas disponibles, tanto cuando la adhesión tenía lugar sobre células HUVEC sin estimular como cuando se estimulaban.

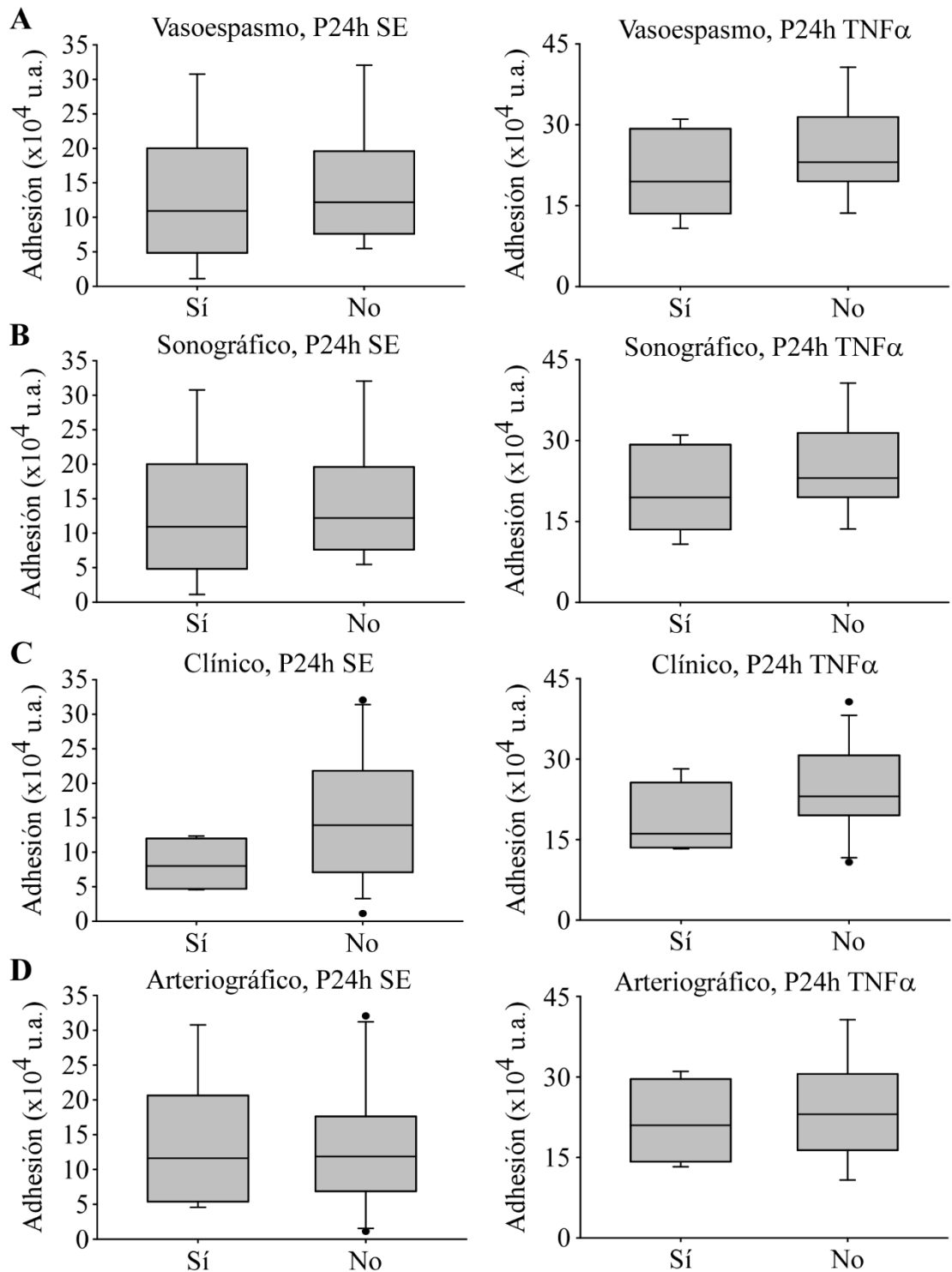


Figura 48. Análisis estadístico de la adhesión de PBMCs de pacientes a las 24 horas en función de las diferentes categorías de vasoespasmo. Correspondencia con datos sin estimulación de células HUVEC (SE) y con estimulación con TNF α (50 ng/mL, 12 horas). (A) Vasoespasmo, (B) sonográfico, (C) clínico y (D) arteriográfico. No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de monocitos en PBMCs de pacientes a las 24 horas con vasoespasmo con respecto a los que no lo presentan. Los puntos observados en los paneles C y D representan valores extremos n= 18 pacientes SE y n= 16 pacientes TNF α .

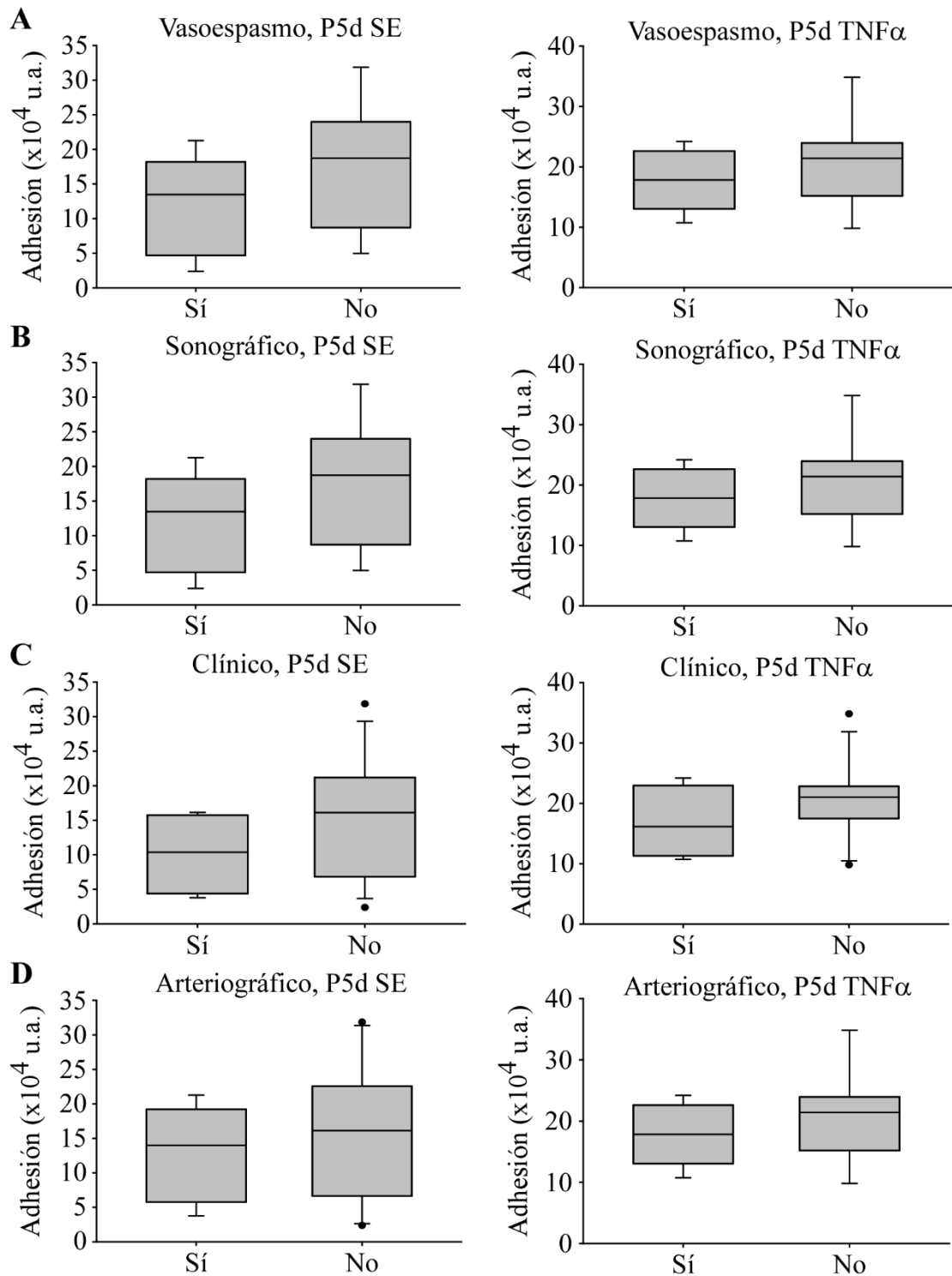


Figura 49. Análisis estadístico de la adhesión de PBMCs de pacientes a los 5 días en función de las diferentes categorías de vasoespasmo. Correspondencia con datos sin estimulación de células HUVEC (SE) y con estimulación con TNF α (50 ng/mL, 12 horas). (A) Vasoespasmo, (B) sonográfico, (C) clínico y (D) arteriográfico. No hubo diferencias significativas entre el porcentaje de monocitos en PBMCs de pacientes a las 24 horas con vasoespasmo con respecto a los que no lo presentan. Los puntos representados en los paneles C y D representan valores extremos. n= 18 pacientes SE y n= 16 pacientes TNF α .

En conclusión, se observó que las PBMCs procedentes de pacientes mostraban una mayor capacidad de adhesión sobre células endoteliales que las células de individuos controles. Este aumento fue significativamente mayor en ambos días para la adhesión sobre células endoteliales sin estimular y solo para las PBMCs obtenidas a las 24h para la adhesión sobre células endoteliales estimuladas. Pese a esto, no se encontró correlación entre el grado de adhesión global de las PBMCs y el estadio según las escalas clínicas. Tampoco se encontró que el grado de adhesión de PBMCs procedentes de pacientes con vasoespasmó mostrara diferencias significativas con el de PBMCs de pacientes sin él.

2.2. Efecto del plasma procedente de pacientes sobre la adhesión al endotelio

El objetivo de este apartado fue determinar si el plasma de los pacientes era capaz de inducir algún efecto sobre la adhesión de las PBMCs a células HUVEC. Dado que tras la aHSA se produce una liberación de citoquinas y un estado de inflamación en el cerebro, este experimento trató de identificar en un primer abordaje el efecto que dicho cóctel de moléculas pudiera tener sobre la integridad del endotelio. Para eliminar la variabilidad asociada a las PBMCs de cada individuo, que podría afectar a los experimentos enmascarando el efecto del plasma, se utilizaron las líneas celulares Jurkat y THP-1, que son líneas celulares estables de linfocitos T y de monocitos, respectivamente. Para estos experimentos se siguió el protocolo de cocultivo celular que había sido expuesto en el apartado 7.2. de Material y Métodos con la modificación señalada en el apartado 7.2.2. Esta modificación consistió en incubar las células HUVEC durante las 12 horas previas al experimento con el plasma de controles y pacientes, respectivamente, antes de cocultivar sobre ellas las células Jurkat y THP-1. Justo antes de añadir dichas células sobre las células endoteliales el plasma fue sustituido por RPMI 1640 + 0,5 % BSA, que también se usó como medio para resuspender las células Jurkat y THP-1.

Los resultados obtenidos de estos experimentos mostraron que tras la aplicación de los plasmas de Controles y pacientes sobre las células HUVEC se producían diferentes efectos según sea la línea celular con la que se hubiera cocultivado (Figura 50). En el caso de las células Jurkat se produjo un descenso significativo de la adhesión a las células endoteliales que habían sido tratadas con plasma de pacientes a las 24 horas y a los 5 días tras la aHSA con respecto a las tratadas con plasma de controles (Control= 127.708±17.199 u.a., P24h= 98.205±15.122 u.a. y P5d= 105.775±19.276 u.a.) (panel A). Sin embargo, la adhesión de las células THP-1 sobre las células que habían sido tratadas con plasma de pacientes a las 24 horas no disminuyó significativamente con respecto a la

de las células tratadas con plasma de los Controles. Tampoco hubo diferencias en la adhesión de las células THP-1 sobre las células tratadas con plasma de pacientes a los 5 días con respecto a las tratadas con plasma de Controles (Control= 169.656±21.021 u.a., P24h= 151.105±19.309 u.a. y P5d= 170.542±22.324 u.a.) (panel B).

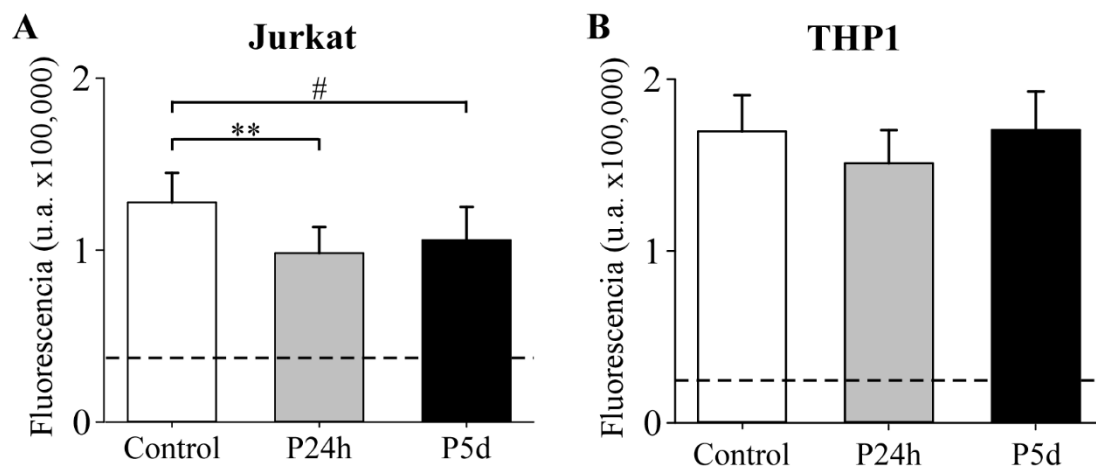


Figura 50. Efecto del plasma sobre las células HUVEC en el proceso de adhesión. (A) Análisis estadístico del efecto del plasma en la adhesión de células Jurkat sobre células HUVEC. Se produjo un descenso significativo de la adhesión a las células HUVEC tratadas con plasma de pacientes de ambos días tras la aHSA con respecto a las tratadas con plasma de controles (B) Análisis estadístico del efecto del plasma en la adhesión de células THP-1 sobre células HUVEC. No hubo diferencias significativas en la adhesión a las células HUVEC tratadas con plasma de pacientes con respecto a las tratadas con plasma de controles. n= 14 parejas Control/paciente. ** $P \leq 0,01$ P24h vs. Control; # $P \leq 0,05$ P5d vs. Control. La línea discontinua representa el nivel de adhesión basal de cada línea celular.

3. Inmunofenotipado de PBMCs

Dados los resultados del apartado anterior, que confirmaron un aumento de la adhesión de PBMCs de pacientes sobre una monocapa de células endoteliales (HUVEC) en comparación con las PBMCs procedentes de controles, se trató de identificar inmunofenotípicamente qué subpoblación era la responsable del aumento de la adhesión. Además, también se trató de cuantificar el nivel y la dinámica de expresión de algunas de las proteínas de superficie implicadas en la adhesión. Para realizar estos experimentos se siguió el protocolo descrito en el apartado 8 de Material y Métodos. Este capítulo de resultados comprende dos secciones. En la primera sección se muestran los datos del inmunofenotipado de las PBMCs procedentes de pacientes y Controles en su estado basal, sin haber sido sometidos a ningún proceso de adhesión. La finalidad de esta sección fue la identificación de las subpoblaciones de PBMCs circulantes en sangre periférica tras ocurrir una aHSA y la expresión de moléculas de adhesión en estado basal. En el segundo apartado se muestran los datos del inmunofenotipado de PBMCs adheridas a células

HUVEC tras el ensayo *in vitro*. El objetivo de esta segunda parte fue identificar qué PBMCs en concreto se adherían a las células HUVEC y cuál era la expresión de algunas de las moléculas de superficie implicadas en este proceso.

Para llevar a cabo el inmunofenotipado se siguió el mismo protocolo de jerarquía de “*gates*” en ambas secciones, resumido en la figura 51. En primer lugar, se llevó a cabo una identificación de las células de interés mediante complejidad (SSC-A) y tamaño (FSC-A). Tras ello, se realizó un paso intermedio en el que se filtraron los singletes mediante FSC-A y FSC-H, donde solo se seleccionaron aquellos eventos que correspondían al paso de una célula única. En tercer lugar, se llevó a cabo una selección de células vivas mediante la exclusión de células marcadas por la inclusión de 7-AAD (marcador de viabilidad celular). Una vez obtenidas estas células, se realizó una selección de las células endoteliales y de las PBMCs mediante SSC-A y el marcaje por CD45 (marcador ubicuo expresado en leucocitos). Posteriormente, de las células que resultaron ser CD45⁺ se llevó a cabo la identificación de linfocitos y monocitos por medio de SSC-A y CD11b (marcador expresado en monocitos, pero ausente en linfocitos). En último lugar, se identificaron las subpoblaciones de linfocitos, mediante CD3 y CD19; y de monocitos, utilizando CD14 y CD16.

De forma paralela a la inmunocaracterización de las PBMCs, se llevó también a cabo el estudio de expresión de las siguientes moléculas de adhesión: CD162, una glicoproteína ligando de P-selectina; CD49d, subunidad $\alpha 4$ de VLA-4; CD62, L-selectina; CD43, sialoglicoproteína leucocitaria; y CD11a, subunidad $\alpha 1$ de LFA-1. De todos estos marcadores se midió la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI), expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia.

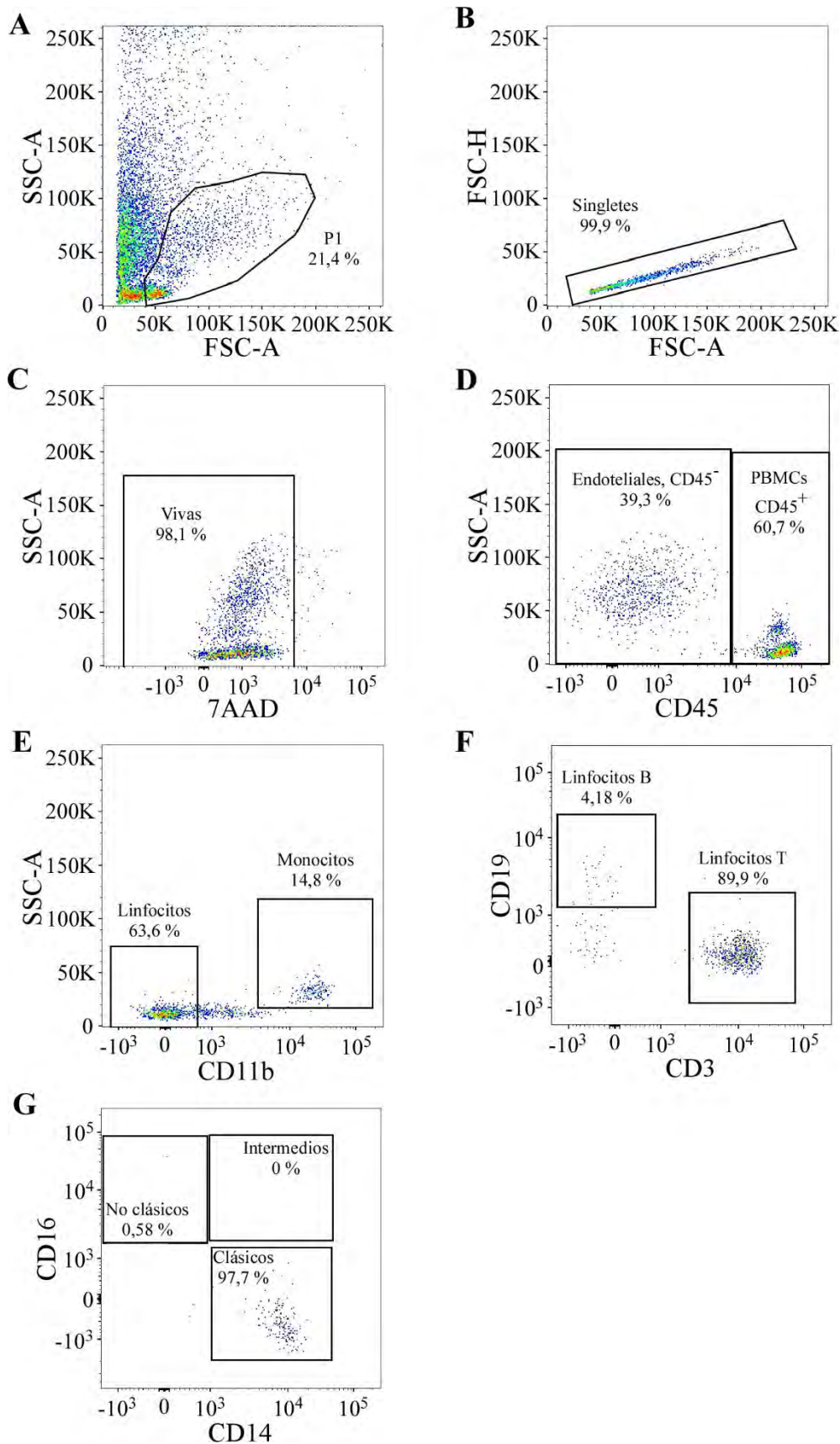


Figura 51. Estrategia y jerarquía de gates para el inmunofenotipo de PBMCs. (A) Selección de células de interés mediante FSC-A y SSC-A. (B) Filtrado de singletes mediante FSC-A y FSC-H. (C) Selección de células vivas mediante exclusión por 7-AAD. (D) Identificación de células HUVEC y PBMCs

mediante SSC-A y exclusión por CD45. (E) Identificación de linfocitos y monocitos mediante SSC-A y exclusión por CD11b. (F) Identificación de linfocitos T y B mediante exclusión por CD3 y CD19. (G) Identificación de subfamilia de monocitos mediante exclusión por CD14 y CD16.

3.1. Caracterización inmunofenotípica de PBMCs aisladas en estado basal

Tal y como se ha descrito al comienzo de este capítulo de resultados, la finalidad de esta sección fue identificar las subpoblaciones de PBMCs circulantes procedentes de pacientes que habían sufrido una aHSA y las diferencias con respecto a las de sujetos Controles. Además, también se realizó el estudio de la expresión de proteínas de superficie implicadas en la adhesión celular.

La figura 52 resume los resultados correspondientes al estudio y cuantificación mediante citometría de las subpoblaciones de PBMCs. Se observó que los pacientes en las primeras 24 horas tras la aHSA cursaban con un descenso no significativo del porcentaje global de linfocitos con respecto a los individuos controles y a los pacientes al 5º día tras el evento (Control= 79,7 % [70,53-83,63], P24h= 71,8 % [63,25-80,58] y P5d= 77,1 % [73,37-85,4]) (panel A). Con respecto a los porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos B y T, dentro de la población global de linfocitos se observó la ausencia de diferencias entre los recuentos celulares de las distintas subpoblaciones (linfocitos B: Control= 7,26 % [5,35-10,22], P24h= 6,73 % [4,9-12,15] y P5d= 8 % [4,36-12,48]; y linfocitos T: Control= 84,85 % [82,25-89,18], P24h= 87,2 % [78,7-90,55] y P5d= 87,7 % [81,05-91,13]) (panel B). La población de monocitos de los pacientes a las 24 horas sufrió un incremento significativo con respecto a los de los sujetos controles. Los pacientes al quinto día presentaron también un incremento significativo en esta población frente a los sujetos controles, aunque en descenso al respecto de los pacientes al primer día (Controles= 1,77% [1,44-2,21], P24h= 7,77 % [3,91-12,68] y P5d= 3,41 % [1,9-6,93]) (panel C). Por último, cuantificaron y analizaron las distintas subpoblaciones de monocitos. Con respecto de los monocitos clásicos encontramos, en paralelo al aumento global de monocitos, un incremento significativo en su recuento en los pacientes a las 24 horas con respecto a los sujetos Controles y en el de los pacientes a los 5 días con respecto a los controles, aunque menor en comparación a los pacientes a las 24h (Control= 51,85 % [35,6-62,07], P24h= 90,55 % [71,2-92,35] y P5d= 78,7 % [57,63-88,03]). No se encontraron diferencias entre los recuentos de los monocitos intermedios de las tres condiciones experimentales (Control= 2,01 % [0,33-6,28], P24h= 0,63 % [0,36-1,62] y P5d= 0,55 % [0-2,58]). En último lugar, sí se encontraron diferencias significativas entre los monocitos no clásicos encontrándose un descenso significativo de los pertenecientes

a los pacientes a las 24 horas frente a los controles. También se produjo un descenso de los de los pacientes a 5 días con respecto de los sujetos Controles, pero este no fue significativo (Control= 5,97 % [1,2-12,1], P24h= 1,12 % [0,35-1,85] y P5d= 1,22 % [0-10,45]).

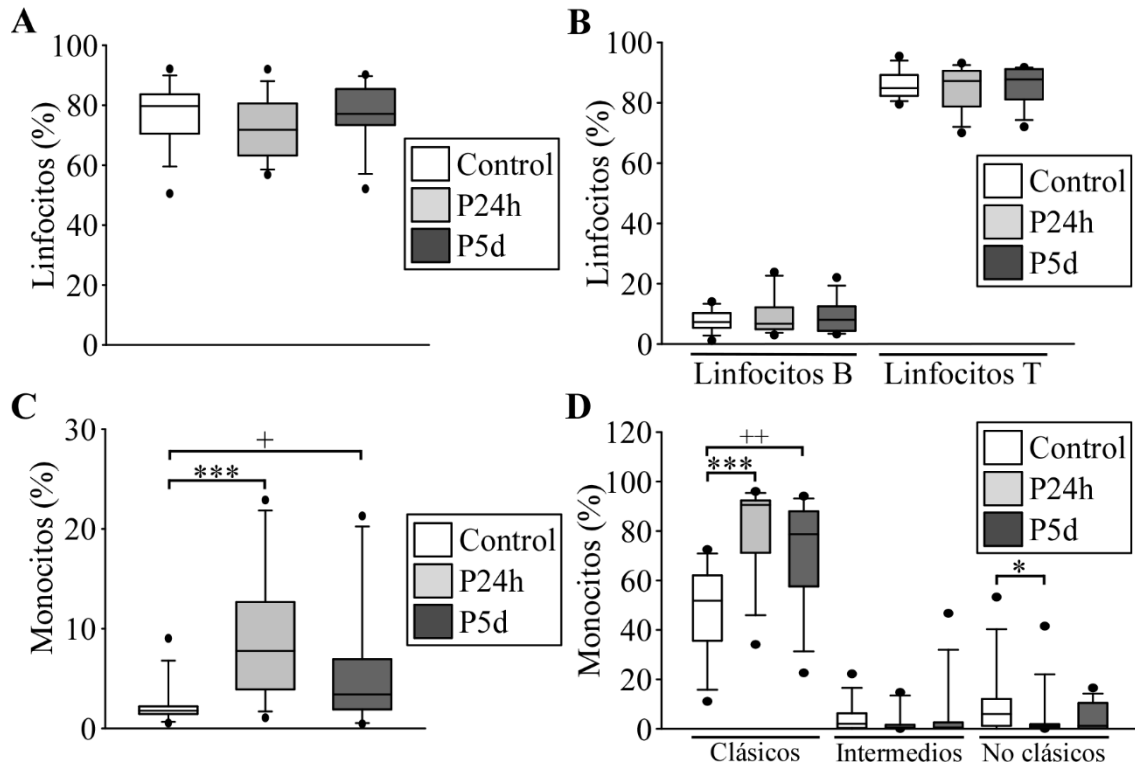


Figura 52. Cuantificación y análisis estadístico de linfocitos y monocitos procedentes de muestras de PBMCs de controles y pacientes en estado basal. (A) y (C), cuantificación de poblaciones globales de linfocitos y monocitos. El porcentaje de monocitos circulantes de los pacientes con aHSA aumentó significativamente con respecto a los Controles. (B) y (D), cuantificación de las distintas subpoblaciones de las estirpes anteriores. Se produjeron un aumento de la población de monocitos clásicos y un descenso en la de monocitos no clásicos significativos en los pacientes con HSA con respecto de los Controles. n= 14 Controles y 14 pacientes. *, *** P≤ 0,05, 0,001 P24h vs. Control; +, ++ P≤ 0,05, 0,01 P5d vs. Control.

Seguidamente, la figura 53 muestra *gates* representativos de citometría de flujo de los cambios en las poblaciones de monocitos y de sus correspondientes subpoblaciones, que tienen lugar en los controles (paneles A y B), pacientes a las 24 horas (paneles C y D) y pacientes en el quinto día (paneles E y F), y que acaban de ser analizados en la figura 52.

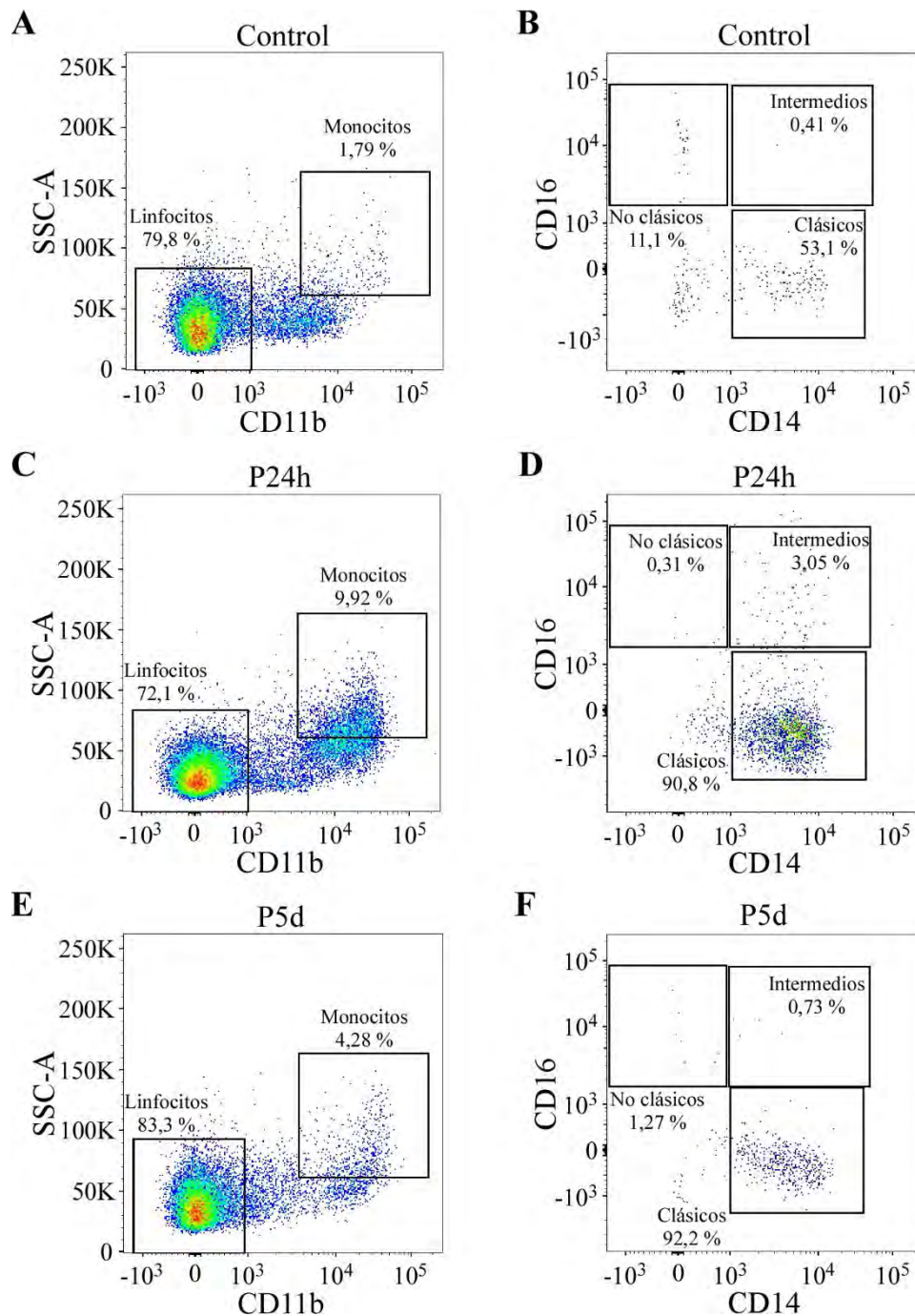


Figura 53. Jerarquía de gates representativos mediante citometría de flujo. (A), (C) y (E), selección y cuantificación de poblaciones de linfocitos y monocitos mediante exclusión por SSC-A y CD11b; y (B), (D) y (F), selección y cuantificación de subpoblaciones de monocitos mediante exclusión por CD14 y CD16 en individuo control, paciente a 24 horas y paciente a 5 días, respectivamente.

A partir de los datos anteriores se analizaron las correlaciones entre los porcentajes de las distintas poblaciones monocitarias de pacientes a las 24 horas y a los 5 días y de controles con respecto a las escalas de severidad y a los datos de adhesión (medidos con el kit CytoSelect™ Leukocyte-Endothelium Adhesion Assay, ver apartado 8). También se analizaron las diferencias entre estos porcentajes en función de las clasificaciones de

vasoespasmos. La tabla 12 y la figura 54 muestran la correlación existente entre el recuento de la población de monocitos no clásicos de PBMCs extraídas en las 24h tras las aHSA y la escala Fisher modificada. De este análisis se desprende que el recuento de esta población celular se encontraba disminuido en los pacientes con mayor riesgo de generar vasoespasmos.

	Pacientes a 24 horas			Pacientes a 5 días		
	Monocitos	Clásicos	No Clásicos	Monocitos	Clásicos	No clásicos
GCS	-0,343 (0,252)	-0,096 (0,756)	0,450 (0,123)	-0,199 (0,513)	-0,076 (0,805)	0,390 (0,187)
Hunt y Hess	0,239 (0,431)	-0,006 (0,985)	-0,269 (0,375)	0,164 (0,591)	0,254 (0,403)	-0,303 (0,315)
WFNS	0,221 (0,467)	-0,048 (0,877)	-0,418 (0,155)	0,148 (0,628)	0,011 (0,971)	-0,335 (0,263)
Fisher mod.	0,228 (0,454)	0,114 (0,711)	-0,599 (0,030) *	0,000 (1)	-0,399 (0,177)	-0,289 (0,338)

Tabla 12. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los pacientes a 24 horas y 5 días tras la aHSA y las escalas de severidad. n= 13 pacientes. * $P \leq 0,05$. Significación indicada entre paréntesis.

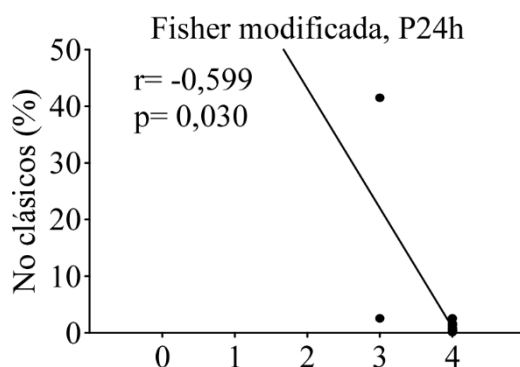


Figura 54. Correlación entre el descenso de monocitos no clásicos de pacientes a las 24 horas con respecto al riesgo de vasoespasmos de los pacientes según la escala Fisher modificada. n= 13 pacientes.

El análisis de la correlación entre la cantidad de monocitos y la adhesión se recoge en la tabla 13 y en la figura 55. Se encontró una correlación lineal entre el porcentaje de monocitos y el fenómeno de adhesión en sujetos controles, en la que la adhesión se incrementaba a medida que aumentaba el porcentaje de monocitos circulantes (panel A). Sin embargo, esta correlación lineal no fue observada en el caso de los monocitos procedentes de pacientes a las 24 horas y 5 días tras la aHSA (paneles B y C). Esta pérdida de correlación podría deberse a que las PBMCs de los pacientes podrían ser más adherentes al endotelio, indistintamente del número de monocitos circulantes. Esto podría

poner en relevancia una mayor capacidad de adhesión de estas células, y que no es necesario que aumente su número para que aumente la cantidad de células adheridas.

	Controles					
	Monocitos		Clásicos		No clásicos	
AdhSE	0,830 (0,003) **		0,352 (0,319)		-0,221 (0,540)	
AdhTNF	0,507 (0,134)		0,193 (0,593)		0,020 (0,957)	
	Pacientes a 24 horas			Pacientes a 5 días		
	Monocitos	Clásicos	No Clásicos	Monocitos	Clásicos	No clásicos
Adh24h SE	0,007 (0,987)	0,111 (0,776)	0,319 (0,402)	0,287 (0,454)	0,598 (0,089)	-0,113 (0,771)
Adh24h TNF	-0,062 (0,884)	0,228 (0,587)	0,149 (0,725)	0,849 (0,008) **	0,106 (0,803)	0,010 (0,981)
Adh5d SE	0,085 (0,828)	-0,399 (0,287)	0,640 (0,063)	0,042 (0,916)	0,446 (0,229)	0,546 (0,129)
Adh5d TNF	0,398 (0,329)	-0,113 (0,789)	0,437 (0,279)	-0,001 (0,999)	0,194 (0,646)	0,564 (0,146)

Tabla 13. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los sujetos controles y los datos demográficos y de adhesión. ** $P \leq 0,01$. Significación indicada entre paréntesis. $n=10$ Controles y 9 pacientes.

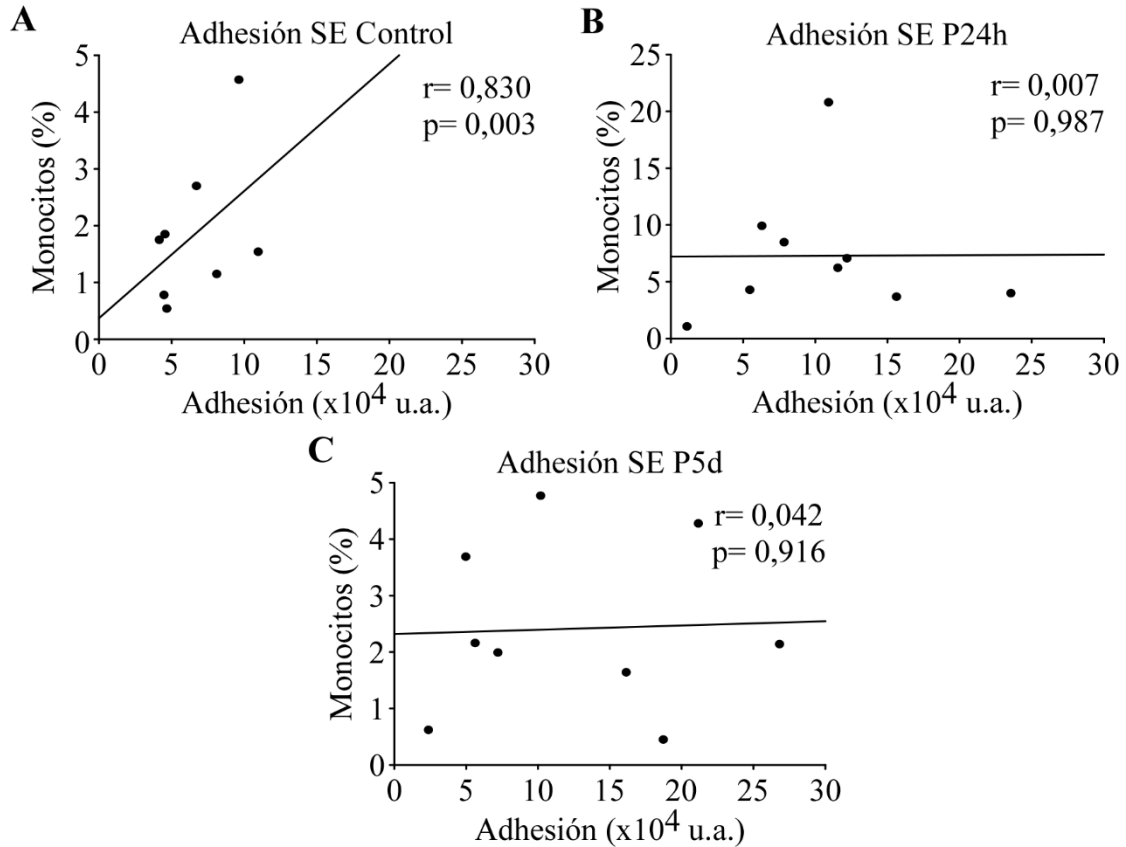


Figura 55. Análisis de correlación entre el porcentaje de monocitos y la adhesión sobre células HUVEC sin estimular. Correlación entre el porcentaje de monocitos en PBMCs con la adhesión sobre células HUVEC sin estimular en Controles y pacientes a las 24 horas y a los 5 días, respectivamente. Se produjo una correlación lineal entre el porcentaje de monocitos y el fenómeno de adhesión en sujetos controles que desapareció en el caso de los monocitos procedentes de pacientes con HSA. n= 10 controles y 9 pacientes.

También se observó una correlación entre la cantidad de monocitos en pacientes en el día 5 tras la HSA y la adhesión de las PBMCs obtenidas a las 24 horas sobre células HUVEC estimuladas (tabla 12). Esto podría inferir que un aumento en la adhesión de las células en las primeras 24 horas pudiera estar relacionado con un posterior incremento de la población monocitaria a los 5 días tras la HSA.

En la tabla 14 se recogen las significaciones estadísticas encontrada en las diferencias entre el porcentaje de monocitos de pacientes según la presencia o ausencia de vasoespasmo, medido para sus distintas categorías. Se observó que el porcentaje de monocitos circulantes en pacientes a las 24 horas tras la aHSA era significativamente mayor en aquellos que sufrían vasoespasmo (Figura 56). Estos datos podrían suponer un hallazgo de importancia ya que con la cuantificación de esta población celular se podría vaticinar la posibilidad de que generasen vasoespasmo.

	Pacientes a 24 horas			Pacientes a 5 días		
	Monocitos	Clásicos	No Clásicos	Monocitos	Clásicos	No clásicos
Vasoespasmo	0,046 *	0,668	0,086	0,568	0,709	0,828
Sonográfico	0,046 *	0,668	0,086	0,568	0,709	0,828
Clínico	0,009 **	0,280	0,216	0,123	0,806	0,938
Arteriográfico	0,003 **	0,242	0,057	0,188	0,661	0,941

Tabla 14. Significaciones estadísticas entre de la diferencia en porcentaje de poblaciones monocitarias en función de la presencia o ausencia de vasoespasmo. n= 13 pacientes. *, ** P≤ 0,05, 0,01.

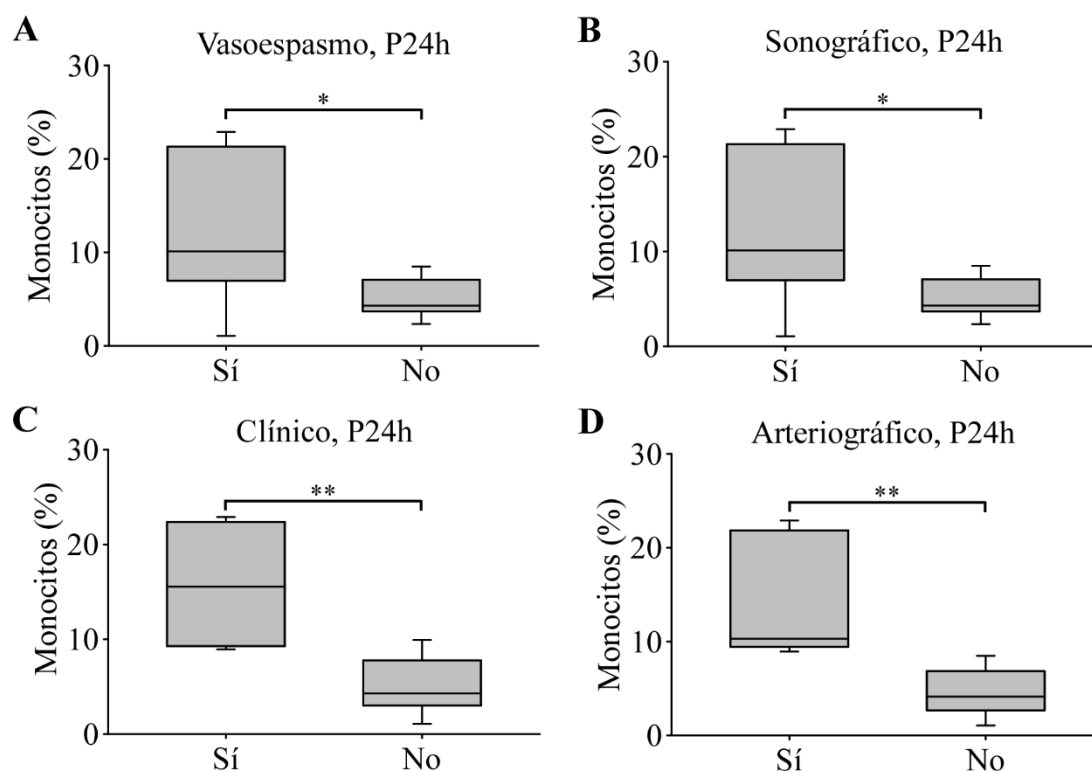


Figura 56. Análisis estadístico entre el porcentaje de monocitos en función a las categorías de vasoespasmo. Se produjo un aumento significativo del porcentaje de monocitos en PBMCs de pacientes a las 24 horas con vasoespasmo con respecto a los que no lo presentan. n= 13 pacientes.

Una vez llevada a cabo la cuantificación de las subpoblaciones de PBMCs en sangre periférica de controles y pacientes, se realizó el análisis de la expresión de moléculas de superficie relacionadas con la adhesión. La cuantificación de la expresión se llevó a cabo midiendo MFI del fluoróforo conjugado al anticuerpo dirigido contra cada marcador. En el análisis posterior se realizó el promedio de las MFI. El análisis estadístico de los valores promedios de MFI se recoge en la figura 57.

En este análisis se observaron cambios significativos en la expresión de algunas moléculas de adhesión de las PBMCs de pacientes con respecto a las de los controles. En la subpoblación de linfocitos B se encontró un aumento significativo de la expresión de CD49d en los pacientes al quinto día tras la aHSA con respecto a los Controles (Figura 57, panel A). En linfocitos T también se detectó un aumento significativo del nivel de expresión de CD49d en PBMCs de pacientes a las 24 horas con respecto a los Controles (panel B). Además, en la subpoblación de monocitos clásicos se observó un descenso significativo del nivel de expresión de CD11a en las PBMCs procedentes de pacientes en ambos días de observación tras la aHSA con respecto a los Controles (panel C).

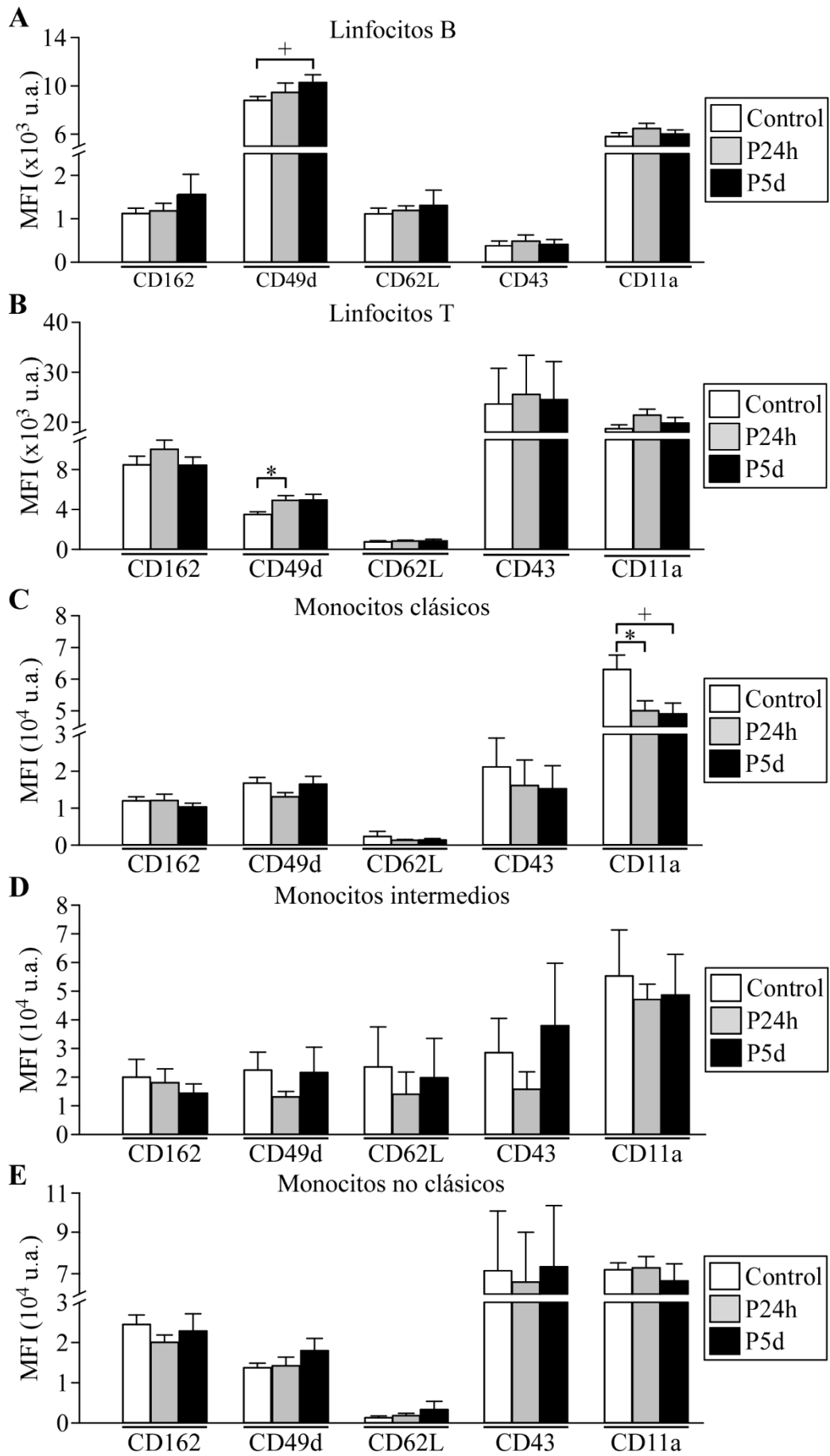


Figura 57. Expresión de moléculas de superficie relacionadas con adhesión en subpoblaciones linfocitarias y monocitarias. Análisis del inmunomarcaje de moléculas relacionadas con la adhesión medido en MFI mediante citometría de flujo en (A) linfocitos B, (B) linfocitos T, (C) monocitos clásicos, (D) monocitos intermedios y (E) monocitos no clásicos. Se produjo un incremento significativo de la expresión de CD49d en linfocitos B de pacientes en el día 5 y en linfocitos T a las 24 horas tras la aHSA con respecto a los Controles y un descenso significativo de la expresión de CD11b en monocitos clásicos de pacientes en ambos días de observación con respecto a los Controles. Linfocitos B, n= 14 sujetos; linfocitos T, n= 14 sujetos; monocitos clásicos, n= 14 sujetos; monocitos intermedios, n≥ 9 sujetos; y monocitos no clásicos, n≥ 10 sujetos. * P≤ 0,05 P24h vs. Control; + P≤ 0,05 P5d vs. Control.

Dados los resultados anteriores, se realizó un análisis de correlación con las escalas de evaluación de la aHSA y los fenómenos de adhesión de PBMCs sobre células HUVEC (tabla 15). También se analizaron las diferencias en la expresión de estas moléculas en pacientes que sufrían vasoespasmo frente a los que no lo padecían (tabla 16).

	Linfocito B – CD49 (5 días)	Linfocito T – CD49d (24 horas)	M. Clásico – CD11a (24 horas)	M. Clásico – CD11a (5 días)
GCS	-0,199 (0,513)	-0,090 (0,770)	0,449 (0,124)	0,229 (0,451)
Hunt y Hess	0,009 (0,978)	-0,043 (0,888)	-0,578 (0,039) *	-0,199 (0,514)
WFNS	0,174 (0,570)	-0,022 (0,942)	-0,492 (0,087)	-0,185 (0,545)
Fisher	0,399 (0,177)	0,342 (0,253)	0,143 (0,642)	0,342 (0,252)
Adh24h SE	-	-0,463 (0,210)	-0,806 (0,009) **	-
Adh24h	-	-0,021 (0,960)	-0,612 (0,107)	-
Adh5d SE	-0,505 (0,165)	-	-	-0,002 (0,996)
Adh5d TNF	-0,442 (0,272)	-	-	0,484 (0,224)

Tabla 15. Correlación de la expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T y monocitos con las escalas de evaluación de la aHSA y el grado de adhesión global de PBMCs a células HUVEC estimuladas. n= 13 pacientes, escalas de evaluación. n≥ 8 pacientes, adhesión. *, ** P≤ 0,05, 0,01.

	Linfocito B – CD49 (5 días)	Linfocito T – CD49d (24 horas)	M. Clásico – CD11a (24 horas)	M. Clásico – CD11a (5 días)
Vasoespasmo	0,204	0,318	0,886	0,818
Sonográfico	0,204	0,318	0,886	0,818
Clínico	0,342	0,338	0,446	0,440
Arteriográfico	0,202	0,190	0,565	0,986

Tabla 16. Significaciones estadísticas entre de la expresión de moléculas de adhesión en función de la presencia o ausencia de vasoespasmo. n= 13 pacientes.

Con respecto de la expresión de CD49d en linfocitos B de pacientes a 5 días y en linfocitos T de pacientes a 24 horas no se observó ninguna correlación estadísticamente significativa con las escalas de evaluación de las aHSA ni con los fenómenos de adhesión.

Tampoco se hallaron diferencias significativas en el nivel de expresión de CD49d entre células de pacientes con vasoespasma frente a los que no lo tenían.

En lo referente a la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a 24 horas se observó que la disminución de su expresión se correlacionaba significativamente con el aumento de la gravedad de los pacientes, medido según la escala de Hunt y Hess (Figura 58, panel A). También se halló que el descenso de la expresión de CD11a en monocitos clásicos estaba correlacionado significativamente con un aumento de la adhesión de PBMCs sobre células HUVEC sin estimular (Figura 58, panel B). Con respecto a la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a 5 días, se daban las mismas tendencias con respecto a las escalas de gravedad que las ocurridas con células a las 24 horas, aunque ninguna alcanzó la significación estadística.

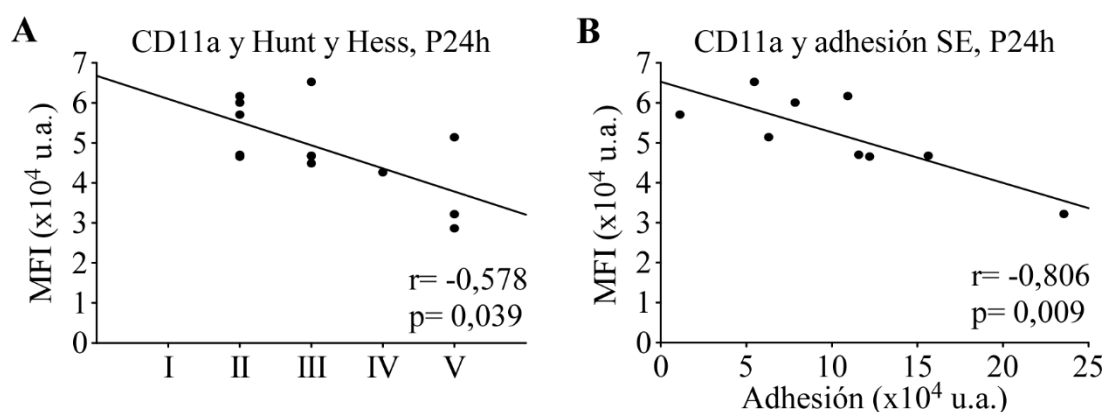


Figura 58. Análisis de correlaciones de la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a 24h. (A) Correlación de la expresión de CD11a con la severidad de la aHSA medida mediante la escala de Hunt y Hess. Se observó una disminución de la expresión de CD11a en los monocitos clásicos de los pacientes a medida que aumentaba su gravedad. n= 13 pacientes. (B) Correlación de la expresión de CD11a con la capacidad de adhesión de PBMCs de pacientes a 24 horas sobre células HUVEC sin estimular. Se encontró que el descenso de la expresión de CD11a en monocitos clásicos estaba correlacionado significativamente con un aumento de la adhesión. n= 9 pacientes.

En resumen, el inmunofenotipado de las PBMCs circulantes de pacientes mostró que el porcentaje de monocitos circulantes aumentó significativamente en pacientes que habían sufrido una aHSA. Ello cursó con un incremento significativo del porcentaje de monocitos clásicos y disminución del de no clásicos, también significativo. En este sentido, se encontró una correlación significativa entre el agravamiento de los pacientes con una disminución de su porcentaje de monocitos no clásicos. En relación al fenómeno de adhesión sobre células endoteliales sin estimular, se identificó la existencia de una correlación lineal entre el porcentaje de monocitos de sujetos Controles y la capacidad de

adhesión de las PBMCs, que desapareció en el caso de los monocitos procedentes de pacientes. Esto se interpretó como un aumento de la capacidad de adhesión de las PBMCs de los pacientes, independientemente del recuento celular. En este sentido, se observó una correlación significativa entre el aumento de la capacidad de adhesión de las PBMCs de pacientes con respecto al aumento del porcentaje de monocitos al 5º día tras la aHSA, pudiendo establecerse como una observación predictiva del estado del paciente. Con respecto al vasoespasmó, se halló que los pacientes que lo sufrían contaban con recuentos significativamente elevados de monocitos con respecto a los que no lo padecían. Por último, con respecto a las moléculas de adhesión, se encontró un incremento significativo de CD49d en linfocitos y una disminución, también significativa, de CD11a en monocitos clásicos de pacientes tras la HSA. Esta última además se correlacionaba con la gravedad del paciente y la capacidad de adhesión de PBMCs a las 24 horas tras la aHSA.

3.2. Caracterización inmunofenotípica de PBMCs adheridos al endotelio

De manera complementaria al apartado anterior, el objetivo de esta sección fue identificar qué PBMCs de controles y de pacientes se unían a células HUVEC con la intención de caracterizar el perfil de células. Para ello se aplicó el protocolo de disociación celular de células adherentes descrito en el apartado 8 de Material y Métodos, seguido del marcaje para citometría. Al igual que en el apartado anterior también se realizó un estudio de moléculas de adhesión en la superficie celular.

La figura 59 recoge la cuantificación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y monocitarias que han participado en el proceso de adhesión. Se produjo un descenso de la población global de linfocitos en los pacientes a las 24 horas tras la aHSA que no alcanzó la significación estadística y que posteriormente era recuperado al quinto día tras la aHSA (Control= 70,55 % [63,05-76,03], P24h= 65,95 % [56,93-71,85] y P5d= 71,55 % [61,13-79,7]) (panel A). No se observaron diferencias entre los diferentes grupos de cada subpoblación (Linfocitos B: Control= 4,84 % [3,7-7,75], P24h= 4,87 % [3,8-6,41] y P5d= 5,34 % [2,73-7,78]; y Linfocitos T: Control= 89,1 % [8,58-92,1], P24h= 91,1 % [82,93-92,63] y P5d= 89,85 % [85,03-94,55]) (panel B). Como ocurría en las PBMCs circulantes, se detectó un incremento significativo del recuento de monocitos en los pacientes a las 24h con respecto a los Controles. Este recuento siguió significativamente incrementado al quinto día con respecto del Control, pero en descenso en comparación al recuento de pacientes a las 24 horas (Control= 4,32 % [2,26-6,21], P24h= 14,95 % [9,92-22,58] y P5d= 8,66 % [4,77-13,55]) (panel C). Se observaron también las cuantificaciones

de las diferentes subpoblaciones de monocitos. Se detectó un aumento significativo de los monocitos clásicos de los pacientes en las 24 horas y 5 días con respecto de los Controles, dándose un descenso también significativo del recuento de pacientes en el día 5 con respecto de los de 24 horas (Control=68,3 % [55,98-82,9], P24h= 90,25 % [87,03-94,13] y P5d= 87 % [78,4-89,15]). En el caso de los monocitos intermedios, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de sus grupos correspondientes (Control= 0,5 % [0-4,09], P24h= 0,52 % [0,35-1,18] y P5d= 0,86 % [0,39-1,44]). En los monocitos no clásicos, los pertenecientes a pacientes en las primeras 24 horas descendieron significativamente con respecto a los procedentes de Controles. Estos se reestablecieron de forma significativa en los pacientes al quinto día sin que hubiese diferencias entre los pacientes en el quinto día y los Controles (Control= 6,26 % [2,32-15,05], P24h= 2,18 % [0,51-2,04] y P5d= 2,9 % [1,26-5,76]) (panel D).

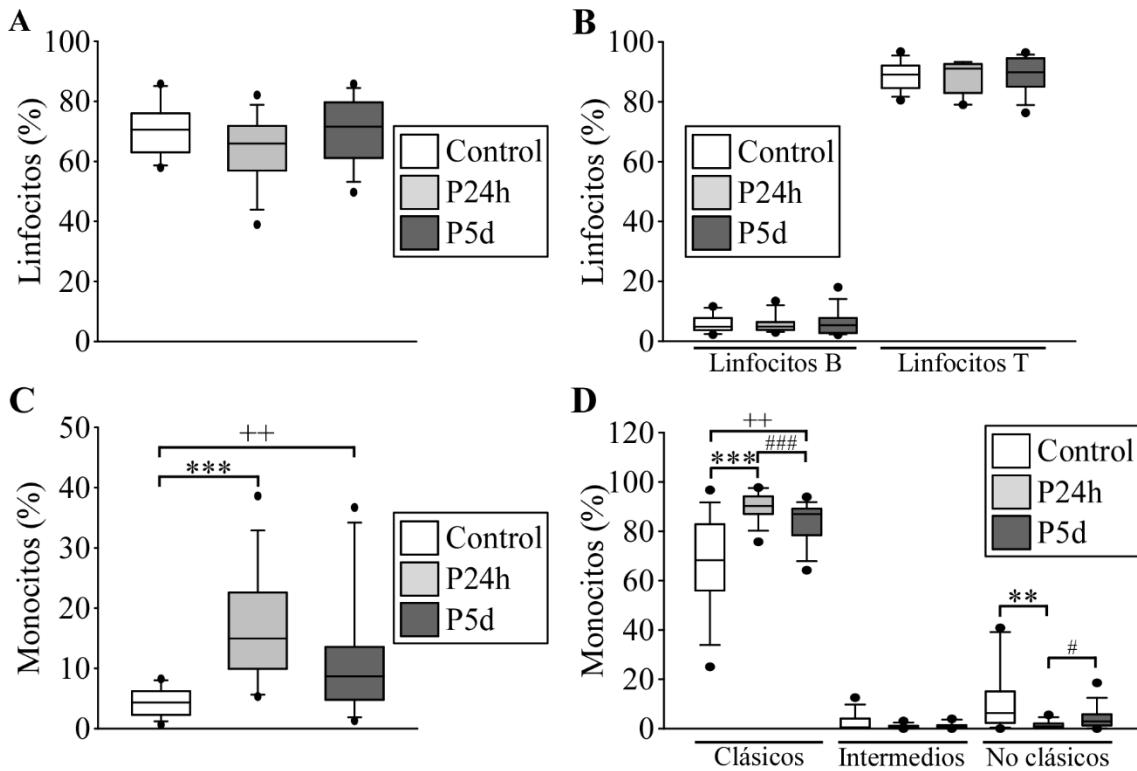


Figura 59. Cuantificación y análisis estadístico de linfocitos y monocitos procedentes de muestras de PBMCs de controles y pacientes adheridos. (A) y (C), cuantificación de poblaciones globales de linfocitos y monocitos. Los monocitos de pacientes en ambos días de observación aumentaron significativamente con respecto a los Controles. (B) y (D), cuantificación de las distintas subpoblaciones de las estirpes anteriores. Los monocitos clásicos en ambos días de observación aumentaron significativamente con respecto a los Controles, siendo significativamente mayor el aumento a las 24 horas. Los monocitos no clásicos en los pacientes a las 24 horas descendieron significativamente con respecto a los Controles y a los pacientes al quinto día tras la HSA. n= 14 Controles y 14 pacientes. **, *** $P \leq 0,01$, 0,001 P24h vs. Control; ++, +++ $P \leq 0,01$, 0,001 P5d vs. Control; #, ### $P \leq 0,05$, 0,001 P24h vs. P5d.

En la tabla 17 se observaron diferencias con el recuento llevado a cabo en las PBMCs circulantes analizadas en la sección anterior (capítulo II, apartado 3.1, figura 52). Se observó un descenso no significativo del recuento global de los linfocitos adherentes con respecto a los basales. Se produjo una disminución de los linfocitos B en las PBMCs adherentes, donde solo fue significativo el descenso de las PBMCs de los pacientes a 24 horas, y también un aumento no significativo de todos los grupos de linfocitos T adherentes con respecto a los que se encontraban en PBMCs basales. Con respecto al recuento global de monocitos adherentes, aumentó significativamente el porcentaje sobre los que se encontraban en PBMCs basales tanto en Controles como en las muestras de los pacientes en los días 1 y 5 tras la aHSA. Los monocitos clásicos adheridos del grupo control aumentaron significativamente con respecto a los basales. En los monocitos intermedios hubo un descenso no significativo de los adheridos con respecto a los basales. En los monocitos no clásicos solo se detectó un descenso no significativo de los adherentes con respecto de los controles en pacientes a las 24 horas.

	PBMCs basales (%)	PBMCs adhesión (%)	Significación
Linfocitos globales ctrl	79,7 [70,53 83,63]	70,55 [63,05 76,03]	0,077
Linfocitos B ctrl	7,27 [5,35 10,22]	4,84 [3,7 7,75]	0,103
Linfocitos T ctrl	84,85 [82,25 89,18]	89,05 [84,58 92,1]	0,125
Monocitos globales ctrl	1,77 [1,44 2,21]	4,32 [2,26 6,21]	0,008 **
Clásicos ctrl	51,85 [35,6 62,08]	68,3 [55,98 82,9]	0,014 *
Intermedios ctrl	2,01 [0,33 6,28]	0,5 [0 4,09]	0,278
No clásicos ctrl	5,97 [1,2 12,1]	6,29 [2,32 15,05]	0,747
Linfocitos globales P24h	71,8 [63,5 80,58]	65,95 [56,93 71,85]	0,054
Linfocitos B P24h	6,73 [4,9 12,15]	4,87 [3,8 6,41]	0,043 *
Linfocitos T P24h	87,2 [78,7 90,55]	91,1 [82,93 92,63]	0,077
Monocitos globales P24h	7,77 [3,91 12,68]	14,95 [9,92 22,58]	0,022 *
Clásicos P24h	90,55 [71,2 92,35]	90,25 [87,03 94,13]	0,566
Intermedios P24h	0,63 [0,36 1,62]	0,52 [0,35 1,18]	0,581
No clásicos P24h	1,12 [0,35 1,85]	2,18 [0,51 2,04]	0,696
Linfocitos globales P5d	77,1 [73,38 85,4]	71,55 [61,13 79,7]	0,117
Linfocitos B P5d	8 [4,36 12,48]	5,34 [2,73 7,78]	0,066
Linfocitos T P5d	87,7 [81,05 91,13]	89,85 [85,03 94,55]	0,215
Monocitos globales P5d	3,41 [1,9 6,93]	8,66 [4,77 13,55]	0,035 *
Clásicos P5d	78,7 [57,63 88,03]	87 [78,4 89,15]	0,175
Intermedios P5d	0,56 [0 2,58]	0,86 [0,39 1,44]	0,564
No clásicos P5d	1,21 [0 10,45]	2,91 [1,26 5,76]	0,519

Tabla 17. Análisis estadístico de los recuentos de poblaciones celulares de PBMCs adheridas con respecto de los hallados en PBMCs en condición basal. n= 14 Controles y 14 pacientes. *, ** $P \leq 0,05$ y $0,01$.

La figura 60 recoge *gates* representativos de citometría de flujo de los cambios que ocurren en las poblaciones de monocitos de controles (paneles A y B), pacientes a las 24 horas (paneles C y D) en el día 5 (paneles E y F) analizados en la figura anterior.

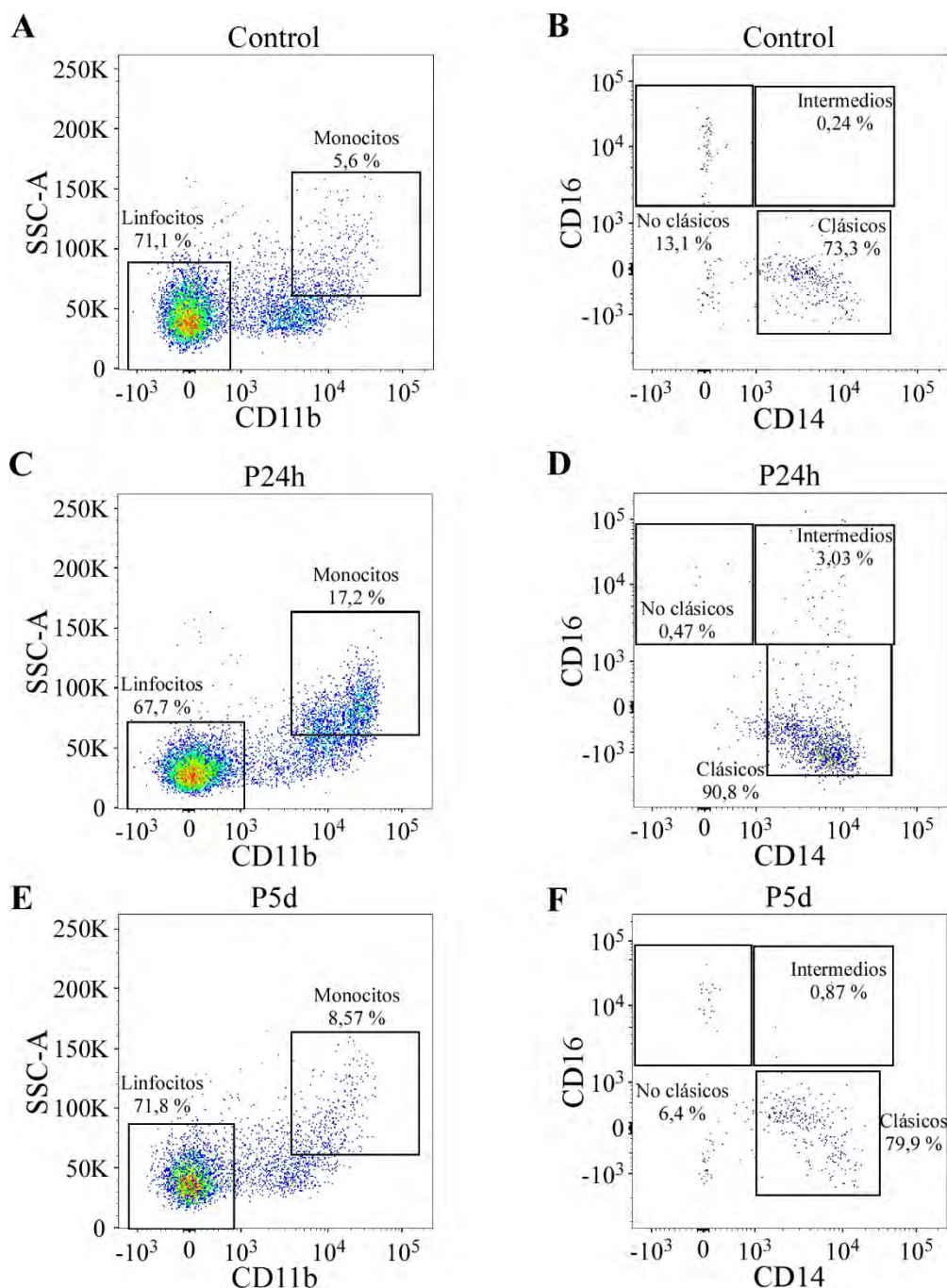


Figura 60. Registros representativos mediante citometría de flujo. (A), (C) y (E), selección y cuantificación de poblaciones de linfocitos y monocitos adheridos mediante exclusión por SSC-A y CD11b en individuo Control, paciente a 24 horas y paciente a 5 días, respectivamente. (B), (D) y (F), selección y

cuantificación de subpoblaciones de monocitos adherentes mediante exclusión por CD14 y CD16 en individuo control, paciente a 24 horas y paciente a 5 días.

En la tabla 18 se detalla el estudio de correlaciones entre los porcentajes de las distintas poblaciones monocitarias de pacientes a las 24 horas y a los 5 días con respecto a las escalas de severidad. Se encontró que el aumento de monocitos clásicos en pacientes en el día 5 se correlacionaba significativamente con la GCS (Figura 61). Se halló esta misma tendencia con la escala WFNS, aunque sin alcanzar significación estadística.

	Pacientes a 24 horas			Pacientes a 5 días		
	Monocitos	Clásicos	No Clásicos	Monocitos	Clásicos	No clásicos
GCS	0,006 (0,985)	0,188 (0,538)	-0,024 (0,938)	-0,124 (0,687)	-0,576 (0,039) *	0,388 (0,191)
Hunt y Hess	-0,074 (0,811)	-0,239 (0,431)	0,103 (0,739)	0,185 (0,546)	0,447 (0,125)	-0,450 (0,123)
WFNS	-0,035 (0,909)	-0,317 (0,292)	-0,080 (0,795)	0,188 (0,539)	0,535 (0,060)	-0,479 (0,098)
Fisher mod.	-0,057 (0,853)	-0,057 (0,853)	-0,399 (0,176)	-0,171 (0,577)	0,285 (0,345)	0,057 (0,853)

Tabla 18. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los pacientes y las escalas de severidad. n= 13 pacientes. * P≤ 0,05. Significación indicada entre paréntesis.

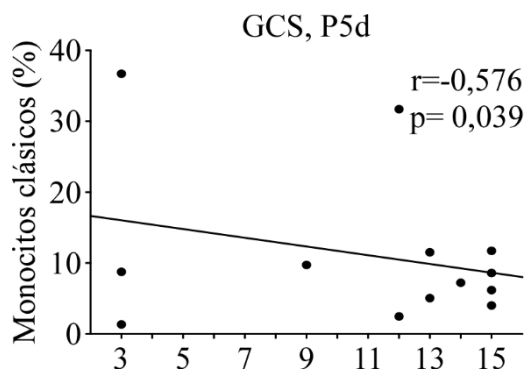


Figura 61. Correlación del recuento de monocitos clásicos adherentes de pacientes en el día 5 con la GCS. Su aumento se correlacionó con la gravedad de los pacientes según GCS. n= 13 pacientes.

En lo relativo al fenómeno de adhesión, se estudiaron las correlaciones solo con los experimentos de adhesión llevados a cabo sobre endotelio estimulado con TNF α . No se observó que ninguna de las correlaciones analizadas alcanzara significación estadística (tabla 19).

	Controles		
	Monocitos	Clásicos	No clásicos
AdhTNF	0,517 (0,126)	0,320 (0,367)	0,009 (0,979)

	Pacientes a 24 horas			Pacientes a 5 días		
	Monocitos	Clásicos	No Clásicos	Monocitos	Clásicos	No clásicos
Adh24h TNF	0,338 (0,413)	0,594 (0,120)	0,191 (0,650)	0,487 (0,221)	0,424 (0,295)	-0,174 (0,681)
Adh5d TNF	0,046 (0,913)	0,641 (0,087)	0,016 (0,971)	-0,417 (0,304)	-0,213 (0,613)	0,608 (0,110)

Tabla 19. Análisis de correlaciones entre los porcentajes de las poblaciones monocitarias de los sujetos controles y de adhesión. n= 10 controles y 8 pacientes. Significación indicada entre paréntesis.

De forma similar, se llevaron a cabo los análisis de las correlaciones del recuento de monocitos adherentes y sus subpoblaciones en los distintos grupos con respecto de las diferentes categorías de vasoespasmo. A diferencia de lo observado en la sección anterior (ver capítulo II, apartado 3.1), no hubo significaciones estadísticas entre el porcentaje de monocitos y la presencia o ausencia de vasoespasmo, medido para las distintas categorías (tabla 20).

	Pacientes a 24 horas			Pacientes a 5 días		
	Monocitos	Clásicos	No Clásicos	Monocitos	Clásicos	No clásicos
Vasoespasmo	0,352	0,560	0,283	0,253	0,638	0,253
Sonográfico	0,352	0,560	0,283	0,253	0,638	0,253
Clínico	0,279	0,535	0,757	0,165	0,440	0,877
Arteriográfico	0,121	0,487	0,608	0,143	0,464	0,380

Tabla 20. Significaciones estadísticas entre de la diferencia en porcentaje de poblaciones monocitarias en función de la presencia o ausencia de vasoespasmo. n= 13 pacientes.

Tras llevar a cabo la cuantificación de las subpoblaciones de PBMCs de Controles y pacientes adheridas a células HUVEC, se realizó el análisis de la expresión de moléculas de superficie relacionadas con la adhesión. La cuantificación de la expresión se llevó a cabo midiendo la MFI del fluoróforo conjugado al anticuerpo dirigido contra cada marcador. En el análisis posterior se realizó el promedio de las MFI. El análisis estadístico de los valores promedios de MFI se recoge en la figura 62.

En la subpoblación de linfocitos T hubo un aumento significativo de la expresión de CD49d en los pacientes en las primeras 24 horas tras la aHSA con respecto a los Controles (Figura 62, panel B). Se detectó un incremento de CD62L en linfocitos T de pacientes a las 24 horas tras la aHSA con respecto a los Controles ($p= 0,057$) (panel B). Además, en la subpoblación de monocitos clásicos se observó un descenso del nivel de expresión de CD11a en los procedentes de pacientes en el quinto día tras la aHSA con respecto a los Controles muy próximo a la significación ($p= 0,053$) (panel C).

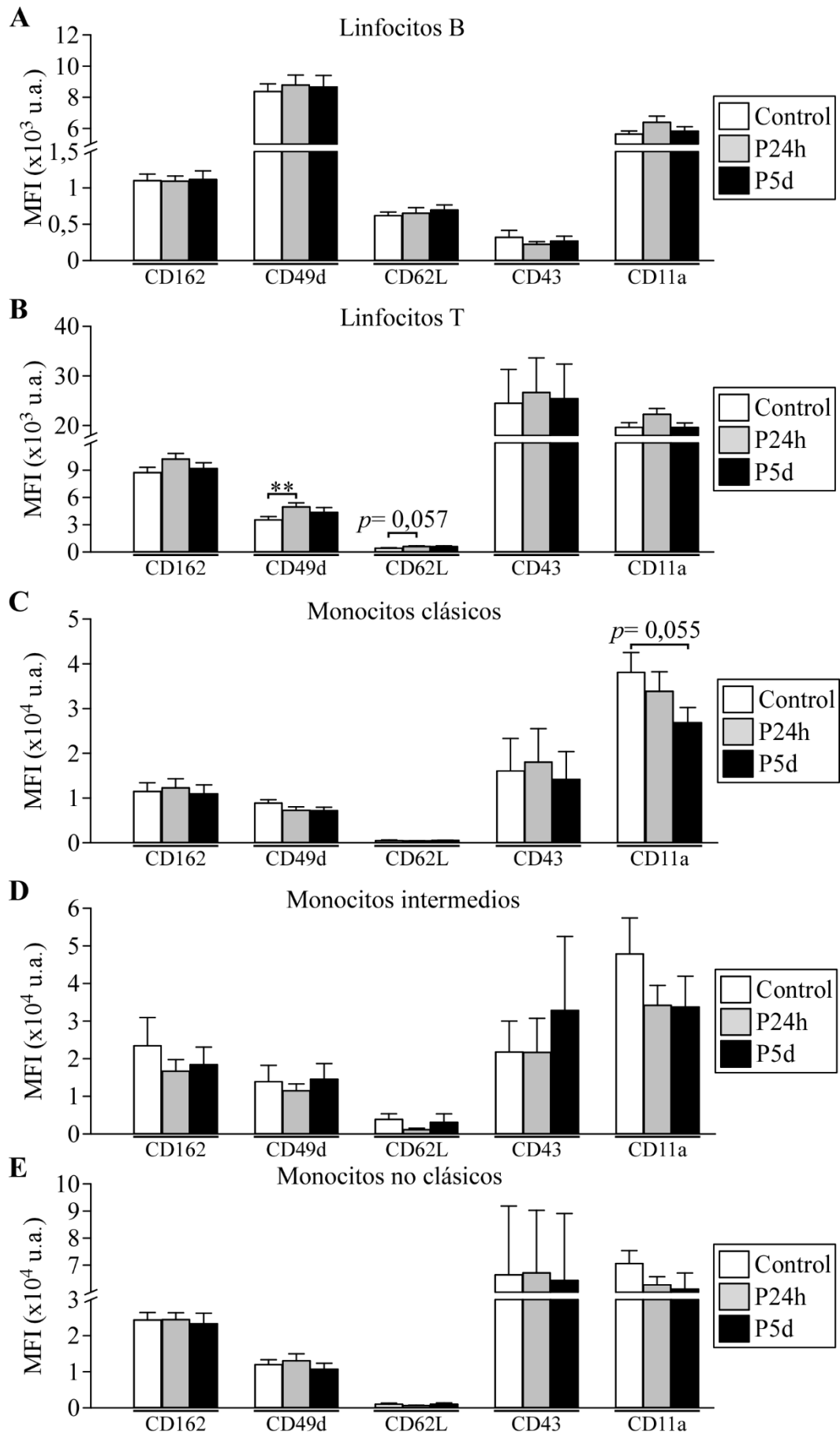


Figura 62. Expresión de moléculas de adhesión en subpoblaciones linfocitarias y monocitarias adherentes. Análisis del inmunomarcaje de moléculas de adhesión medido en MFI mediante citometría de flujo en (A) linfocitos B, (B) linfocitos T, (C) monocitos clásicos, (D) monocitos intermedios y (E) monocitos no clásicos. Se produjo significativo de la expresión de CD49d en linfocitos T de pacientes a las 24 horas tras la aHSA con respecto a los Controles. Linfocitos B, n= 14 sujetos; linfocitos T, n= 14 sujetos; monocitos clásicos, n= 14 sujetos; monocitos intermedios, n≥ 10 sujetos; y monocitos no clásicos, n≥ 13 sujetos. ** P≤0,01 P24h vs. Control.

Tras llevar a cabo este análisis de expresión de las diferentes moléculas de adhesión, se llevó a cabo un análisis de correlación con las escalas de evaluación de la aHSA y los fenómenos de adhesión global de PBMCs sobre células HUVEC estimuladas con TNF α . También se analizó si existían diferencias significativas en la expresión de estas moléculas en pacientes que sufrían vasoespasmos en comparación a los que no lo padecían. Se analizó tanto la correlación de la expresión de CD49d en linfocitos T de pacientes a las 24 horas, que habían resultado significativamente incrementada en estos, como la correlación de la expresión de CD62L en estos mismos linfocitos y la de CD11a en monocitos clásicos al quinto día, que pese a no alcanzar significación estadística se encontraron muy cerca de esta (tablas 21 y 22).

	Linfocito T – CD49d (24 horas)	Linfocito T – CD62L (24 horas)	M. Clásico – CD11a (5 días)
GCS	-0,247 (0,415)	-0,157 (0,608)	0,497 (0,084)
Hunt y Hess	0,173 (0,572)	0,185 (0,546)	-0,493 (0,087)
WFNS	0,227 (0,456)	0,244 (0,422)	-0,586 (0,036) *
Fisher	0,285 (0,345)	-0,057 (0,853)	-0,057 (0,853)
Adh24h TNF (Pearson)	-0,301 (0,431)	-0,567 (0,112)	-
Adh5d TNF (Pearson)	-	-	0,615 (0,104)

Tabla 21. Correlación de la expresión de moléculas de adhesión en linfocitos T y monocitos con las escalas de evaluación de la aHSA y la adhesión de PBMCs a células HUVEC estimuladas. n= 13 pacientes.

	Linfocito T – CD49d (24 horas)	Linfocito T – CD62L (24 horas)	M. Clásico – CD11a (5 días)
Vasoespasmos	0,983	0,668	0,483
Sonográfico	0,983	0,668	0,483
Clínico	0,392	0,217	0,372
Arteriográfico	0,884	0,700	0,382

Tabla 22. Significaciones estadísticas entre de la expresión de moléculas de adhesión en función de la presencia o ausencia de vasoespasmos. n= 13 pacientes.

Con respecto a la expresión de CD49d y de CD62L en linfocitos T no se observaron tendencias significativas con las escalas de evaluación de la HSA ni con el fenómeno de

adhesión sobre células HUVEC estimuladas. Tampoco existieron diferencias significativas en el nivel de expresión de estas moléculas entre las células de los pacientes que cursaban con vasoespasmo con respecto a los que no.

Por el contrario, se observó que el descenso en la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes al 5° día tras la aHSA se encontraba correlacionado de forma significativa con el incremento en la severidad de la aHSA medido mediante la escala WFNS (Figura 63). No se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de este marcador entre las células de los pacientes con vasoespasmo frente a los que no. Tampoco se encontró una correlación significativa con la adhesión global de PBMCs sobre células endoteliales tratadas con $TNF\alpha$.

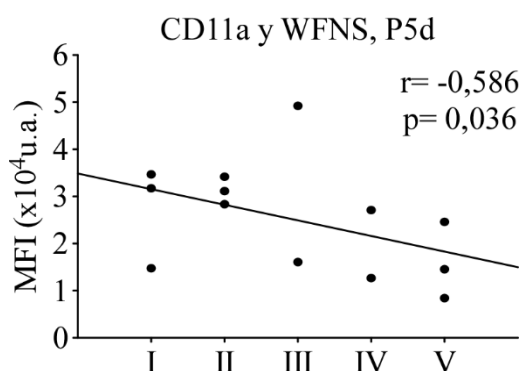


Figura 63. Análisis de correlación de la expresión de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a 5 días tras la aHSA. El descenso en la expresión de CD11a en se correlacionaba con el incremento de la severidad de la aHSA medida mediante la escala de WFNS. n= 13 pacientes.

En conclusión, el inmunofenotipado de las PBMCs adherentes señaló un incremento significativo del porcentaje de monocitos en ambos días de observación con respecto a los Controles. También de forma global el porcentaje de monocitos adherentes aumentó de forma significativa con respecto a los circulantes en todos los grupos de observación. Dentro de las subpoblaciones, se produjo un aumento significativo del porcentaje de monocitos clásicos de pacientes sobre los Controles en ambos días de observación siendo mayor el aumento de los monocitos de pacientes a las 24 horas. Se detectó un incremento significativo del porcentaje de monocitos clásicos adherentes del grupo Control frente a los circulantes. Así mismo hubo un descenso significativo de los monocitos no clásicos en pacientes a las 24 horas con respecto a los Controles. Con respecto a las escalas de evaluación, el aumento de monocitos clásicos se correlacionó con el agravamiento del paciente según GCS. Por último, se encontró un incremento significativo en la expresión de CD49d en linfocitos de pacientes a las 24 horas con respecto a los Controles. Además,

se encontraron muy próximos a la significación el incremento de la expresión de CD62L en linfocitos T a las 24 horas con respecto a los Controles y el descenso de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a los 5 días también de nuevo con respecto a los Controles. El descenso en la expresión de CD11a en monocitos clásicos en el día 5 se correlacionó con la gravedad del paciente según la escala WFNS.

Discusión

La liberación de sangre al espacio subaracnoideo a causa de una HSA tiene como consecuencia diversos efectos que resultan deletéreos para los individuos que la sufren. De forma clásica se ha descrito que el fenómeno del vasoespasmio circunscrito a las arterias que conforman el polígono de Willis o las grandes arterias del cerebro está asociado a pronósticos de gran severidad. Este es secundario a esta patología y presenta altas tasas de morbimortalidad (Brami y cols., 2020; Crowley y cols., 2011). Recientemente, también dentro del ámbito vascular, son crecientes los hallazgos que apuntan a la implicación de la microvasculatura y su alteración en los daños secundarios producidos tras la HSA (Anzabi y cols., 2019; Göllitz y cols., 2018). Sin embargo, en los últimos años son cada vez mayores los indicios por los que no solo las alteraciones vasculares *per se* son las responsables de la morbimortalidad, sino que alteraciones del sistema inmunitario pueden también serlo. A este nivel se han descrito cambios, tanto a nivel celular como humoral, que apuntan a que la activación del sistema inmune también podría desencadenar daños secundarios en esta patología e incluso guardar relación con el fenómeno del vasoespasmio (Gris y cols., 2019; Ridwan y cols., 2021; Savarraj y cols., 2018; Zhang y cols., 2020).

En esta línea, la presente tesis doctoral ha abordado los mecanismos que pueden estar detrás de ambos fenómenos patológicos estudiando los efectos sobre los vasos sanguíneos y su reactividad, así como también en el papel que pueden tener las PBMCs de los pacientes en este proceso patológico.

Con respecto al modelo animal, se estudiaron tres grupos experimentales: Control, Sham y HSA. Debido a las características quirúrgicas del modelo experimental, fue necesaria la presencia de un grupo experimental que mimetizase la operación sin la presencia de sangre. Pero también fue necesario un grupo experimental Control que representase a la población sana que no ha sufrido esta patología, ya que de forma traslacional a la patología no existen fenotipos intermedios entre individuos sanos y patológicos. Ha de señalarse que dada la gran variedad de modelos experimentales para HSA, los resultados experimentales de los diferentes estudios son comparables entre sí, aunque la presencia o severidad de los efectos de la HSA puede variar entre ellos debido a la falta de estandarización de los procedimientos. Los modelos de inyección directa, como el utilizado en esta tesis, son más benignos que los de punción endovascular, aunque

inducen menos cambios, presentan riesgo de hemorragia intracraneal y son técnicamente complejos y difíciles de reproducir (Leclerc y cols., 2018; Prunell y cols., 2004).

La discusión se ha organizado en los siguientes cuatro apartados:

1. Alteraciones de las dinámicas iónicas en el fenómeno de vasoespasmo secundario a HSA.
2. Participación de las rutas de PKC y RhoA/ROCK en el vasoespasmo secundario a HSA.
3. Cambios histológicos en arterias tras la HSA.
4. Cambios en las PBMCs tras la HSA. Posibles implicaciones fisiopatológicas.

1. Alteraciones de las dinámicas iónicas en el fenómeno de vasoespasmo secundario a HSA

Como se ha descrito en los párrafos superiores, uno de los principales efectos de la HSA es el desarrollo de vasoespasmo secundario que tiene lugar con posterioridad al sangrado. Dado que el tono vascular está determinado, en parte, por el potencial de membrana de los miocitos se determinó si en nuestro modelo experimental también se producía la despolarización observada por otros autores en miocitos arteriales de animales con HSA. Los resultados obtenidos en estos experimentos, como continuación de resultados previos de nuestro laboratorio (Revilla-González, 2016), mostraron que existía una despolarización del potencial de membrana en reposo de los miocitos procedentes de ratas HSA, que era significativamente mayor al de los miocitos de las ratas Control y Sham para los días 5 y 7. Sin embargo, no hubo diferencias entre en los animales en el día 9 entre sí ni con respecto al grupo Control. Estas observaciones pusieron de manifiesto la existencia de ventanas temporales en las que se producen los efectos patológicos, coincidiendo con lo observado en la fisiopatología humana. Estos resultados se encontraron en la misma línea que los obtenidos en otros trabajos (F. Wang y cols., 2015; Waters & Harder, 1985; D. Zhao y cols., 2020). No obstante, se encontraron con ciertas diferencias en la amplitud de la despolarización. Estas pueden ser debidas al uso de modelos animales diferentes, ya que en Waters y Harder (1985) se utilizó un modelo felino; al uso de regiones arteriales diferentes, dado que en Zhao y cols. (2020) y en Wang y cols. (2015) el V_m se registró en miocitos de arterias penetrantes completa o de cerebral media de rata, respectivamente, mientras que en nuestro modelo se usaron miocitos dispersos de arteria basilar; o a la observación de un periodo temporal diferente, dado que en Wang y cols. (2015) se mide el V_m al tercer día tras la inducción de la HSA.

Debido a que se observó que en miocitos procedentes de animales del grupo HSA se producía la máxima despolarización al séptimo día, se estudiaron en primer lugar las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje en este día. Se comparó la amplitud de esta corriente en nuestros miocitos controles con resultados previos de nuestro laboratorio en modelo de rata (Fernández-Tenorio, 2009; Porrás-González, 2017) y con resultados de otros autores en conejo (Sharma y cols., 2012) observándose que estas eran similares y aportando validez metodológica a los resultados obtenidos. Nuestros resultados señalaron que en un rango temporal prolongado tras la HSA (7 días) la amplitud de la corriente de Ca^{2+} en los miocitos del grupo HSA en un rango de despolarización desde -40 a +40 mV era menor a la encontrada en los miocitos de los grupos Control y Sham. Estas observaciones se mostraron contrarias a las determinadas por otros autores describieron previamente que en estadios tempranos tras la HSA (3-5 días) se producía un incremento de las corrientes de Ca^{2+} en los miocitos procedentes de animales con HSA con respecto de los respectivos individuos Sham o controles (Ishiguro y cols., 2005; Shi y cols., 2014; F. Wang y cols., 2015). Sin embargo, nuestros datos, en apariencia contradictorios, son apoyados por los de otros autores que describieron una disminución de las corrientes correspondientes a canales de Ca^{2+} de alto voltaje de activación (HVA) y un aumento de los de bajo voltaje de activación (LVA) en el séptimo día tras la HSA (Nikitina y cols., 2010). Estos, mostraban además un descenso en la expresión de LTCCs y el aumento en la expresión de RTCCs. Así, dado que nos centramos en el estudio de los LTCCs, estos resultados podrían justificar nuestros hallazgos corroborando además la disfunción de los LTCCs en el control de la contracción arterial de las arterias en este rango temporal para nuestro modelo experimental. En esta misma línea, en Ishiguro y cols. (2005), se describió un aumento de la expresión de RTCCs en conejos al quinto día tras la HSA que participaba en la regulación de la contracción vascular. Pese a que en Nikitina y cols. (2010) se encontraron diferencias significativas para las relaciones I/V al séptimo día, nuestros resultados mostraron únicamente estas tendencias, aunque sin llegar a la significación estadística. Con todo ello, nuestros resultados sugieren que los miocitos patológicos, pese a poseer una menor relación I/V para el pico máximo de corriente (a +10 mV) con respecto a los miocitos del grupo Control y Sham, pudieran ser más sensibles a despolarizaciones moderadas. Respecto al proceso de inactivación, aunque se alcanzó el mismo porcentaje de inactivación en miocitos Controles que HSA para el potencial de membrana que genera la máxima corriente (+10 mV), la τ de inactivación era más lenta en los segundos pudiendo indicar un mayor paso de iones a través de estos. Algo similar

podría ocurrir con los miocitos Sham, donde se dio una conductancia similar a los HSA, dándose diferencias estadísticas con respecto a la inactivación de los del grupo Control.

Además de los VDCC, los canales de K^+ están implicados en el mantenimiento del tono vascular y del V_m en reposo de los miocitos. Existen cinco familias diferentes de estos canales siendo los de K^+ dependientes de voltaje (K_v) los más relacionados con las alteraciones fisiopatológicas que ocurren en diversas patologías cardiovasculares (Dogan y cols., 2019; Koide y cols., 2018). Los resultados obtenidos en nuestros experimentos mostraron una disminución de las corrientes de K^+ en los miocitos procedentes de arterias de animales HSA con respecto a los de animales Controles. Estas observaciones eran similares, aunque de menor amplitud, a las descritas en otros trabajos donde se detalló que el tratamiento con oxihemoglobina o la inducción de HSA provocaba una disminución de las corrientes de K^+ dependientes de voltaje en los miocitos arteriales (Jahromi y cols., 2008; Koide y cols., 2007). No obstante, la corriente de K^+ de los miocitos Sham resultó ser de menor amplitud que las dos anteriores. Esto podría indicar que las corrientes de K^+ dependientes de voltaje no serían las responsables de que los miocitos HSA tengan un potencial de reposo más despolarizado. Nuestros resultados también mostraron una mayor conductancia a K^+ en miocitos HSA con respecto de los Sham y los Controles a 0 mV. Esto resultó ser contrario a lo publicado por los autores anteriores que señalaron la ausencia de cambios en las cinéticas de activación de estos canales. Con respecto a la inactivación, nuestros resultados mostraron que la inducción de la HSA provocaba un descenso en el porcentaje de inactivación de la corriente de K^+ , lo que coincidía por lo publicado por Jahromi y cols., (2008), aunque ese mismo descenso fue observado en los miocitos del grupo Sham. Tanto el trabajo de Jahromi y cols., (2008) como los de Koide y Wellman (2013, 2015) señalaron funcionalmente la participación predominante de los K_v en estos fenómenos excluyendo la participación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}).

Además de llevar a cabo un abordaje electrofisiológico de las células y dado que habíamos observado que los miocitos procedentes de animales HSA estaban despolarizados al séptimo día, se llevaron a cabo experimentos de microfluorimetría para determinar los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$. El objetivo de estos experimentos fue averiguar, dado que los miocitos de animales HSA estaban despolarizados, si esto pudiera ser una causa de un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ o si este ion pudiera estar incrementado debido a otra causa. En nuestros experimentos se determinó que el nivel basal de $[Ca^{2+}]_i$ de los miocitos del

grupo HSA era significativamente mayor al de los grupos Control y Sham. Esto coincidió con las observaciones de otros autores en las que, tanto en células aisladas como en arterias completas, tras la incubación de estas con oxihemoglobina o la inducción de una HSA el nivel basal de $[Ca^{2+}]_i$ se encontraba incrementado en las condiciones hemorrágicas con respecto a las control (Butler y cols., 1996; Guan y cols., 1998; Kim y cols., 1996; Koide y cols., 2011; Vollrath y cols., 1994). Además, en estos experimentos se evaluó si los miocitos del grupo HSA eran más excitables que los del resto de grupos. Se comprobó que en los miocitos de animales HSA se producían incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ a $[K^+]_e$ inferiores a lo que ocurría en el resto de grupos, indicando también que estas células eran más excitables. Esta observación puso de manifiesto que el modelo animal de HSA podría reproducir, al menos parcialmente, la fisiopatología asociada a la vasorreactividad descrita tras la HSA. Además, en estos experimentos se indagó en la naturaleza de la respuesta de cada célula. Se encontró que el recuento de células HSA que respondían a 30K era superior con respecto al resto de grupos. Esto coincidió con la observación previa de que dentro de este grupo experimental se encontraba un mayor número de células excitables. Para finalizar estos experimentos, se analizó de forma separada el nivel de $[Ca^{2+}]_i$ de las células que respondían a 30K y de las que no. Se encontró que en ambos grupos las células HSA tenían mayores niveles de $[Ca^{2+}]_i$ con respecto a los miocitos Controles y Sham. Estas observaciones, que no habían sido observadas por otros autores de forma previa, sugieren que tras la HSA se ponen en marcha mecanismos que aumentan la población de células con mayor excitabilidad, pudiendo implicar una mayor vasorreactividad en arterias completas.

Dado que se encontró que el nivel de $[Ca^{2+}]_i$ basal permanecía aumentado en los miocitos de arterias HSA y que para las despolarizaciones evocadas con las soluciones crecientes en $[K^+]_e$ existían diferencias significativas en la $[Ca^{2+}]_i$ entre miocitos HSA y Sham y Controles, se quiso indagar en el papel que los LTCCs pudieran tener en ambos procesos. Este abordaje no ha sido observado previamente en la literatura. En primer lugar, se aplicó Nifedipina (0,5 μ M) sobre el nivel basal de Ca^{2+} y se observó la ausencia de efecto al no producirse disminución de la $[Ca^{2+}]_i$. Este resultado puso de manifiesto que a nivel de célula aislada en situación basal los LTCCs no mediaban, como agentes causales *per se*, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ ya que su inhibición no tenía repercusión sobre la concentración basal del ión. Sin embargo, la aplicación de Nifedipina (0,5 μ M) sobre miocitos que habían sido despolarizados con 30K mostró una reducción significativa en

la $[Ca^{2+}]_i$ de miocitos HSA con respecto a miocitos Control y Sham. Esto indicó que los LTCCs sufrían una alteración en su funcionamiento a causa de la HSA al tener una mayor sensibilidad a la Nifedipina. Estos resultados, que no habían sido observados por otros autores, apoyan el hecho de que los LTCCs sufren alteraciones en esta patología pudiendo causar efectos en la dinámica del Ca^{2+} . Sin embargo, los datos sugieren que estos canales no son la causa primaria del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, entrando en juego la posible existencia de otros mecanismos subyacentes como causa primaria de este fenómeno como por ejemplo la entrada de Ca^{2+} mediante canales no dependientes de voltaje o el su almacenamiento en reservorios intracelulares y liberación de los mismos. Este aspecto será discutido más adelante en el análisis de microarray realizado en el modelo.

Los resultados anteriores realizados en células aisladas dieron pie al diseño de experimentos de miografía en arterias completas para comprobar si los resultados hallados en células aisladas eran extrapolables a estas. Se utilizaron soluciones despolarizantes de KCl para activar tanto la contracción dependiente de Ca^{2+} como las vías de sensibilización a Ca^{2+} (Ratz y cols., 2005). Los resultados de esta tesis no muestran diferencias en el nivel de contractilidad entre los distintos grupos experimentales al estimular las arterias con soluciones con alto K^+ . Este hecho ha generado bastante controversia en la literatura, ya que tras la inducción de una HSA o su simulación mediante la exposición a oxihemoglobina algunos grupos argumentan que la tensión generada por estas arterias al estimularlas con soluciones despolarizantes está disminuida (Kim y cols., 1996; Koide y cols., 2002; Macdonald y cols., 2006); otros aducen que la estimulación provoca la misma contracción (Kikkawa y cols., 2012); mientras que también existen trabajos donde hay un aumento de la vasorreactividad (Egea-Guerrero y cols., 2015; Wang y cols., 2019). Estas diferencias podrían radicar en la ya comentada variabilidad de los modelos experimentales (Leclerc y cols., 2018; Prunell y cols., 2004). En experimentos previos de nuestro laboratorio se observó que la administración de Nifedipina a bajas dosis, sola o en conjunto con Fasudil, producía una relajación de contracción arterial prolongada sin afectar a la producida por estímulos cortos ni a la contractilidad cardíaca (Porrás-González y cols., 2014). En nuestros resultados se observó que el efecto descrito también se producía en las arterias de los distintos grupos. Tras la estimulación con 70K, la administración de Nifedipina produjo un descenso significativo de la relajación en el grupo Sham en el día 5 con respecto del grupo Control y al Sham en el día 7. Así mismo, la administración de Nifedipina junto a Fasudil a bajas dosis

aumentó el efecto vasorrelajante, como había sido descrito, aunque se encontró una disminución significativa de la vasorrelajación en el grupo Sham al 5º día con respecto a su grupo HSA, al grupo control y al grupo Sham en el día 9.

En conclusión al estudio de las alteraciones iónicas encontradas en los miocitos de las arterias de animales HSA, los resultados de vasorreactividad se complementaron con un microarray que permitiese evaluar globalmente la expresión de genes implicados con el vasoespasmo secundario a la HSA y su dinámica. Son pocos los estudios que han observado cambios en la expresión de canales iónicos implicados en el vasoespasmo y en su mayoría observan la expresión únicamente de genes concretos (Dogan y cols., 2019; Ishiguro y cols., 2005; Koide y cols., 2011; Nikitina y cols., 2010; Shi y cols., 2014), por ello es importante resaltar que nuestro estudio de expresión constituye uno de los primeros abordajes de análisis de la expresión de amplio espectro llevados a cabo en arterias cerebrales de modelo animal de HSA. Con respecto a la expresión de los canales de Ca^{2+} existe cierta controversia ya que algunos autores argumentan que en arterias patológicas los LTCCs mantienen su nivel de expresión con respecto a las arterias controles siendo el canal predominante (Ishiguro y cols., 2005; Koide y cols., 2011), mientras que otros autores defienden una sustitución por las subunidades R y T en condiciones patológicas (Nikitina y cols., 2010; Shi y cols., 2014). En cuanto a los canales de K^+ hay un mayor consenso en que su expresión se encuentra disminuida en condiciones patológicas (Dogan y cols., 2019). Nuestros hallazgos mediante GSEA muestran que existe un ligero empobrecimiento de las categorías relacionadas con VDCC y un empobrecimiento significativo de las categorías implicadas en la dinámica del K^+ . Dado que no todo el Ca^{2+} presente en la célula entra a través de los VDCC, se decidió analizar también si existía enriquecimiento de rutas implicadas en la dinámica de este ion. Se observó que sí existía, siendo significativo en la comparación HSA7d vs. Sham7d. Este resultado coincidió con observaciones en redes y rutas de expresión descritas por Sasahara y cols. (2008). Estas observaciones sugieren que en estas células sí existen cambios aumentados en la dinámica de Ca^{2+} , pero estos tienen lugar mediante canales o rutas no relacionadas directamente con los canales dependiente de voltaje.

En conclusión a este apartado, a la luz de los resultados recogidos en el análisis de expresión cobran sentido las observaciones realizadas mediante otras técnicas. La disminución de la corriente asociada a LTCCs en HSA, la ausencia de cambios en $[Ca^{2+}]_i$ basal en respuesta a nifedipina hace pensar que, pese a que estos canales son funcionales

y se alteran durante la patología, no son la causa principal del vasoespasmo. Así mismo, la disminución de las corrientes asociadas a K_v en miocitos HSA y su nivel de $[Ca^{2+}]_i$ basal elevado resistente a nifedipina concuerdan con que una disminución en la expresión de canales K_v unida a un aumento de la dinámica de Ca^{2+} mediante rutas no relacionadas con los VDCC podrían ser los agentes causales de la despolarización que diese lugar al fenómeno de vasoespasmo asociado a la HSA.

2. Participación de las rutas de PKC y RhoA/ROCK en el vasoespasmo secundario a HSA

Además de las implicaciones de la alteración de las dinámicas iónicas en las VSMCs en el vasoespasmo, se comprobó si las rutas de sensibilización a Ca^{2+} , tenían algún papel en la contracción inducida por despolarización prolongada en el modelo de HSA (descritas en Egea-Guerrero y cols. (2015) y González-Montelongo y cols. (2019)). Para ello se llevaron a cabo un análisis de la expresión proteica mediante western blot y un estudio de miografía para comprobar la vasorreactividad arterial.

Con respecto a los niveles de expresión de PKC α y RhoA, nuestros experimentos mostraron un aumento agudo de la expresión de PKC tras la inducción de la HSA que luego descendió hasta valores próximos al del grupo Control, sin existir diferencias con este grupo ni con los grupos Sham. Esto difirió con los datos publicados por Kikkawa y cols. (2012), quienes observaron un aumento de expresión de PKC α en arterias patológicas en el séptimo día con respecto a las Controles. Sin embargo, la expresión de RhoA en las arterias patológicas aumentó con respecto a la condición Control tras la inducción de la HSA, mostrándose un aumento significativo de la expresión al quinto día y encontrándose una tendencia marcada con respecto a su correspondiente grupo Sham. Esto coincidió con los hallazgos a nivel de expresión de ARNm descritos por Miyagi y cols. (2000). Nuestros resultados también mostraron un aumento significativo de la expresión del grupo Sham al séptimo día con respecto al grupo Control y una tendencia con respecto a su respectivo HSA. Existen pocos indicios previos sobre los niveles de expresión global de PKC y RhoA en el citosol ya que clásicamente se ha caracterizado la expresión de proteína activa en la membrana con respecto a este. Otros autores señalaron que tras la HSA se produce un aumento de la expresión de RhoA y de diversas isoformas de PKC en la membrana, tanto de forma aguda como crónica (Chang y cols., 2014; Lan y cols., 2004; Takuwa y cols., 1993; C. J. Wang y cols., 2014; Wickman y cols., 2003).

En lo relativo a la implicación funcional, mediante el uso de la miografía se estudió la participación y alteración de las rutas de sensibilización a Ca^{2+} de PKC y de RhoA/ROCK tras la HSA. Con respecto a la ruta de PKC, nuestros resultados mostraron que tanto en arterias del grupo HSA como del grupo Sham, tras inducir la vasoconstricción con 70K, la aplicación de GFX (0,5 μM) produjo un efecto vasorrelajante que era significativamente menor que la vasorrelajación producida en individuos Controles. Estos resultados indicaron que la ruta de PKC participaba en el mantenimiento de la contracción inducida tras la HSA, pudiendo tener aumentada su actividad. Ello concuerda con el estudio de Wickman y cols. (2003) donde se involucró la participación de PKC en la contracción de arterias mediante oxihemoglobina y con la actividad de PKC descrita por Koide y cols. (2002). Este efecto no se reprodujo al estimular los anillos arteriales de animales en el día 7 con 30K, al ser la respuesta de todos los grupos de la misma magnitud.

En referencia a la ruta de RhoA/ROCK, nuestros experimentos mostraron que la aplicación de Fasudil (1 μM) en arterias de animales HSA contraídas con soluciones despolarizantes producía un efecto vasorrelajante, indicando que esta ruta participaba en el mantenimiento de la contracción. Estos resultados fueron similares a los expuestos por Wickman y cols. (2003) en arterias expuestas a oxihemoglobina. Con respecto al resto de grupos experimentales la aplicación de Fasudil (1 μM) únicamente mostró una tendencia a una mayor sensibilidad de las arterias patológicas contraídas con 70K al fármaco en el día 7 tras la HSA. Este resultado fue contrario a lo expuesto por Kikkawa y cols. (2012) en arterias patológicas que habían sido estimuladas con ET-1. Esta diferencia podría ser debida a la activación de diferentes rutas de señalización que desembocasen en el mismo efecto. En anillos estimulados con 30K se encontró la misma tendencia, no coincidiendo con lo expuesto en Egea-Guerrero y cols., (2015). Esta diferencia podría señalar que pese a que el modelo animal reproduce en gran parte las observaciones observadas en la patología podría presentar cierta variabilidad ocasionada por el propio modelo experimental, la cirugía y la manipulación interoperatorio (Leclerc y cols., 2018).

En tercer lugar, se quiso estudiar si la regulación en arterias despolarizadas de RhoA por $\text{PKC}\alpha$ estaba presente en las arterias patológicas. Como pudo observarse, en anillos estimulados con 70K solo se produjo un descenso del efecto vasorrelajante en el grupo Sham en el día 7 mostrándose una menor sensibilidad al tratamiento. La diferencia fue significativamente distinta con respecto al control y mostró una tendencia con respecto a su respectivo grupo HSA, sin embargo, no se observaron diferencias con respecto al resto

de grupos. En anillos contraídos con 30K hubo un aumento significativo de la sensibilidad de las arterias patológicas al tratamiento combinado, encontrándose un mayor efecto vasorrelajante en el grupo HSA7d con respecto del grupo Sham. Estos resultados se encontraron en la línea de lo descrito en González-Montelongo y cols. (2019). Además, la administración conjunta de ambos inhibidores producía significativamente un mayor efecto que su administración por separado.

En conclusión, estos resultados muestran que los mecanismos de sensibilización a Ca^{2+} contribuyen al mantenimiento de la contracción arterial en el efecto crónico de la HSA. Sin embargo, pese a existir diferencias significativas en la expresión global de RhoA o diferencias significativas en la sensibilidad de la vasoconstricción a la aplicación de inhibidores de PKC, estos mecanismos no toman un papel preponderante en el control de la contracción de forma aislada. En cambio, se aprecian diferencias significativas en el efecto del uso combinado de inhibidores para ambas rutas. Ello indicaría que mediante el uso de bajas dosis de estos inhibidores se podría alcanzar un efecto vasorrelajante sinérgico que no afectase a otras rutas ni órganos.

3. Cambios histológicos en arterias tras la HSA

El vasoespasmo arterial no solo puede ser producido por cambios funcionales de las VSMCs de las arterias, sino que también puede originarse debido a cambios histológicos en su estructura. Por ello, en cortes histológicos de arteria basilar se evaluaron los cambios producidos tras la HSA.

Nuestros experimentos constataron que en el modelo de HSA se producía un aumento del área muscular que alcanzaba diferencias estadísticas con el grupo Control en el día 5 tras la HSA, siguiendo tendencia similar con su grupo Sham respectivo. Además, se encontró que la luz de las arterias HSA1d era significativamente menor que la de su correspondiente grupo Sham, pudiendo relacionarse con la disminución del área de la sección transversal. Estos resultados coincidieron parcialmente con los expuestos por Güney y cols. (2010) y Wang y cols. (2019) en ratas tras 72 horas tras la HSA, que describían el aumento del grosor de la pared arterial. Sin embargo, ambos trabajos señalaron en paralelo una disminución de la sección transversal de la arteria. De esta forma, el aumento del grosor recogido en nuestros resultados señalaría un proceso de remodelado vascular a nivel histológico a diferencia de los cambios expuestos por los anteriores autores que señalarían una alteración histológica derivada de la vasoconstricción. Con respecto a la capa adventicia, en arterias del grupo HSA5d se

encontró un aumento significativo en las del área de tejido conjuntivo con respecto de los grupos Control y Sham5d. Esto llevó a pensar que se podría estar produciendo un fenómeno de fibrosis, lo que concordaría con el incremento observado de la expresión de varios subtipos de ARNm de colágeno en arterias HSA a los 7 días con respecto a su correspondiente Sham y al grupo Control. Ello se situó en la línea del incremento de la cantidad de colágeno, tanto en la capa adventicia como en la capa muscular, a modo de infiltración de tejido conectivo en el conjuntivo en periodos crónicos de la HSA que otros autores previamente habían corroborado en distintos modelos animales (Nakamura y cols., 1992; Onoda y cols., 1996; Yamaguchi-Okada y cols., 2005). También coincidió con el aumento de los niveles de ARN mensajero de colágeno I descrito en arterias que han sufrido una HSA (Aihara y cols., 2001).

En conclusión, nosotros proponemos que tras la HSA no solo se producen alteraciones funcionales en las arterias. Los resultados descritos muestran que también ocurren alteraciones histológicas que alteran la arquitectura de los vasos sanguíneos, pudiendo afectar a su función. Ambos tipos de alteraciones no deben de ser entendidas como entes separados, sino como mecanismos que ocurren en consonancia al mismo tiempo.

4. Cambios en las PBMCs tras la aHSA. Posibles implicaciones fisiopatológicas

Los resultados que se acaban de exponer, junto con los que han sido comentados en los otros apartados, mostraron que metodológicamente nuestro modelo experimental de HSA reproducía las alteraciones funcionales e inmunológicas descritas por otros autores, otorgándole validez y respaldo experimental. Sin embargo, estas alteraciones producidas tras la HSA no solo provocaron cambios a nivel funcional en las arterias, sino que también indujeron cambios que afectaron a otros órganos y sistemas. El análisis de GSEA que se ha realizado mostró entre las categorías de genes más enriquecidas algunas relacionadas con la activación de células del sistema inmunitario y de su respuesta. Nuestros resultados coincidieron con lo observado por otros autores, aunque como fue indicado en el apartado 1 de Discusión, existen escasos indicios de estudios de expresión a gran escala llevados a cabo en arterias, por lo que nuestros hallazgos representan un hito novedoso en esta área. Relativo a la expresión en arterias sometidas a HSA, Sasahara y cols. (2008) y Vikman y cols. (2007) mostraron una sobreexpresión de genes relacionados con procesos inflamatorios y respuesta inmunitaria, coincidiendo con lo que obtuvimos en nuestro análisis. Estas observaciones se sitúan en la línea de lo observado por Tso y cols. (2021) en células endoteliales del cerebro o por Peng y cols. (2017) y Zheng y cols. (2015) en

muestras de cerebro completo. Como traslación a lo ocurrido en humanos, nuestros resultados coinciden con la sobreexpresión de categorías génicas implicadas en la activación del sistema inmune en PBMCs de pacientes con HSA (Zhao y cols., 2019). Además de ello, en nuestro análisis también destacamos la sobreexpresión de categorías de genes implicadas en la reparación del daño en el ADN. Esto puede encontrarse en relación a la inducción de estrés y fragmentación del ADN ocurridas en cerebro en modelo animal de hemorragia descritas por Matz y cols. (1996).

Dada la alteración del sistema inmune vista en modelo animal se estudió su alteración en pacientes que habían sufrido una aHSA. Algunos autores han descrito, tanto en modelo animal como en humanos, la presencia de citoquinas proinflamatorias en sangre o LCR tras la aHSA (Gris y cols., 2019; Ridwan y cols., 2021; Savarraj y cols., 2018). Estos hechos señalan la activación del sistema inmunitario ocurrida tras el evento hemorrágico.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se detalló un aumento de la expresión y de la actividad de RhoA en PBMCs de pacientes con vasoespasma secundario a una aHSA (González-Montelongo y cols., 2018). Dado que esta proteína está implicada en fenómenos de adhesión celular, entre otros procesos, se evaluó si las PBMCs procedentes de pacientes mostraban una mayor capacidad de adhesión con respecto a las de sujetos Controles. Este hecho se confirmó en experimentos *in vitro* sobre células endoteliales, encontrándose una mayor capacidad de adhesión en células de pacientes. Estas observaciones se situaron en la línea de la implicación de RhoA en procesos de adhesión leucocitaria que otros autores habían descrito (Honing y cols., 2004; J. Wang y cols., 2018).

En una segunda batería de experimentos se comprobó que la adhesión de células pertenecientes a líneas celulares sobre células HUVEC tratadas con plasma de pacientes se encontraba disminuida con respecto al de los Controles. Esta disminución fue significativa en el caso de la línea de células Jurkat, constatando que el plasma de pacientes tras una aHSA provocaba efectos deletéreos sobre las células endoteliales. Esto se situó en la línea de los efectos citotóxicos del LCR de pacientes con una extravasación de sangre tras la HSA y de la oxihemoglobina sobre las células endoteliales en cultivo o en órgano completo (Foley y cols., 1994; Guo y cols., 2015; Meguro y cols., 2001).

Una vez determinado el aumento en la capacidad adherente de las PBMCs de los pacientes se realizó un inmunofenotipado, mediante citometría de flujo, de las

subpoblaciones celulares circulantes que se encontraban alteradas en los pacientes tras sufrir una HSA y de las que mostraban capacidad adherente. Los recuentos celulares presentaron alteraciones significativas, aunque dentro de los rangos fisiológicos observados en los hemogramas de los pacientes. Nuestros experimentos mostraron que a las 24 horas tras la aHSA se producía un descenso de la población de linfocitos y un aumento significativo de la población de monocitos con respecto a la de individuos Controles. Estos recuentos se encontraban en la línea de lo descrito por Yang y cols. (2012) en pacientes dentro de las primeras 48 horas tras la HSA y con los recuentos globales de linfocitos descrito por Bacigaluppi y cols. (2020) y Moraes y cols. (2015). Es de especial relevancia que el aumento significativo de monocitos en pacientes que desarrollaron vasoespasmo también fue observada por Bacigaluppi y cols. (2020). Este hecho se encuentra relacionado con el incremento de la activación inmune a nivel celular en pacientes con DCT descrito por Mohme y cols. (2020). El descenso de linfocitos se restableció al quinto día tras la aHSA, pero el recuento de monocitos continuó encontrándose significativamente elevado sobre el nivel de los monocitos de individuos controles. No se encontraron diferencias significativas entre las subpoblaciones de linfocitos, a diferencia de otros trabajos donde se recogían cambios en la subpoblación de linfocitos T (Moraes y cols., 2015; Sarrafzadeh y cols., 2011). Sin embargo, sí se encontró un aumento significativo de la población de monocitos clásicos y una disminución significativa de los no clásicos, que también había sido descrita por Bacigaluppi y cols. (2020), Korostynski y cols. (2019) y Moraes y cols., (2015). La relación de los monocitos intermedios fue variable entre los distintos estudios. Estos resultados se encontraron en consonancia con trabajos donde se observó la sobreexpresión de genes relacionados con monocitos y descenso de los relacionados con linfocitos (Korostynski y cols., 2019; Pera y cols., 2013) o el descenso del número de linfocitos y el aumento de monocitos (Cai y cols., 2021). Ese mismo comportamiento de las subpoblaciones de monocitos ha sido descrito en células infiltrantes de cerebro de ratón (Gris y cols., 2019), aunque en LCR de pacientes se ha constatado un aumento tanto de monocitos como de linfocitos (Mohme y cols., 2020; Roa y cols., 2020) a mayor tiempo de observación.

Por último, se determinó el perfil de expresión de algunas moléculas de adhesión de la superficie de las PBMCs. Nuestros experimentos mostraron perfiles de expresión diferentes para cada subpoblación celular. En ellas se destacó el aumento significativo de la expresión de CD49d y CD62L en linfocitos y la disminución de expresión de CD11a

en monocitos clásicos en pacientes tras la aHSA con respecto de los Controles. Otros autores han señalado la presencia de estas tres moléculas en PBMCs en relación a los procesos de adhesión entre leucocitos y endotelio (Frijns & Kappelle, 2002). Con respecto al descenso en el nivel de expresión de CD11a que habíamos observado en monocitos, este también ha sido señalado por Yang y cols. (2012). Esta molécula está fuertemente implicada en procesos de adhesión celular y se ha descrito que su bloqueo farmacológico mejora en gran medida el vasoespasma asociado a la presencia de sangre en modelos animales (Bavbek y cols., 1998; Clatterbuck y cols., 2002, 2003). Aunque el descenso en el nivel de expresión de CD11a podría parecer contrario a la relevancia de su función, en el trabajo realizado por Prieto y cols. (1994) se constató que dicha disminución era un signo de activación monocitaria y de la diferenciación hacia macrófagos. Este descenso también fue señalado por Hammond y cols. (2014), aunque no vieron significación estadística. Esto concordaría con el proceso de inflamación generado tras la aHSA de manera que aquellos pacientes con menor recuento de CD11a tengan un peor pronóstico, según las escalas Hunt y Hess y WFNS, y sus PBMCs tengan mayor capacidad de adhesión, como muestran nuestros resultados. También se ha observado la expresión de CD11a en monocitos infiltrantes en otras patologías neurovasculares, aunque sin detallar la expresión basal con respecto a individuos sanos (Sobel y cols., 1990).

Los resultados obtenidos respecto a la expresión de CD49d mostraron un aumento significativo de su nivel de expresión en linfocitos T de pacientes a las 24 horas tras la aHSA y en linfocitos B de pacientes al quinto día. No se han encontrado referencias en estudios humanos sobre esta observación en relación a la aHSA. Sin embargo, en el trabajo realizado en modelo murino por Hammond y cols. (2014) se mostró el aumento de CD49d en linfocitos infiltrantes en el cerebro de los animales a los que se había inducido una hemorragia intracraneal, aunque este aumento no se trasladó a los linfocitos circulantes. Varios estudios en modelos animales de hemorragia e ictus isquémico han constatado que la administración de anticuerpos contra CD49d disminuye la cantidad de linfocitos infiltrantes, aunque existen controversias con respecto a la reducción del daño y la mejora el estado de los animales (Hammond y cols., 2014; Langhauser y cols., 2014; Liesz y cols., 2011). Estas observaciones podrían señalar la participación de estas células en el agravamiento de la patología neurovascular. Sin embargo, en estudios recientes en humanos se ha comprobado que el bloqueo temprano de CD49d únicamente genera una

mejora en el pronóstico funcional de pacientes a largo plazo aunque no en la reducción del daño tisular (Elkind y cols., 2020; Elkins y cols., 2017).

En último lugar, nuestros experimentos mostraron un incremento de expresión de CD62L en linfocitos T adherentes de pacientes a las 24 horas con respecto a los controles, que se situó próximo a la significación estadística. Este resultado fue similar a lo presentado por Hammond y cols. (2014) en linfocitos circulantes de animales que habían sufrido una hemorragia intracraneal. Se observó que el nivel de expresión global de estas moléculas no era elevado, lo que se encontró en consonancia con los resultados de Galkina y cols. (2007) que señalaron que la función de CD62L era saturable y la sobreexpresión de dicha molécula de unión no inducía un aumento en la capacidad de adhesión. CD62L es una molécula que está altamente implicada en el proceso de *homing* de los linfocitos T en los nódulos linfáticos o en los tejidos inflamados y su inhibición altera esta función (Dios-Esponera y cols., 2019). En este contexto, el trabajo llevado a cabo por Giblin y cols. (1997) demostró que además de participar en el proceso de *homing*, CD62L inducía la expresión de las integrinas $\beta 1$ favoreciendo el proceso de adhesión estable de los linfocitos al endotelio. Este hecho podría relacionarse con los niveles elevados de CD49d encontrados en nuestras células.

En conjunto, estos resultados indican que tras la aHSA el sistema inmunitario también sufre alteraciones. Nuestras observaciones avalan que existe una activación del mismo en el que las PBMCs incrementan su capacidad de adhesión. Además, se observan cambios en los recuentos celulares cuya temporalidad coincide con el periodo de acción de las distintas respuestas inmunitarias. Por último, fruto de esta activación también se produce un cambio en el perfil de expresión de algunas moléculas de adhesión en ciertas subpoblaciones. En suma, el sistema inmunitario parece jugar un papel importante en el manejo de la HSA más allá de las alteraciones que han sido observadas clásicamente en la función vascular y la vasorreactividad.

CONCLUSIONES

A continuación, se recogen las principales conclusiones de esta tesis doctoral:

1. Los miocitos procedentes de animales patológicos se encuentran más despolarizados que los Sham en un curso temporal prolongado (5-7 días) tras la HSA.
2. En el día 7 tras la HSA la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje se encuentra disminuida en los animales HSA con respecto a los Sham mientras que la corriente de K^{+} dependiente de voltaje estaba incrementada en ratas HSA con respecto a las Sham. Estos resultados concuerdan con el empobrecimiento de la expresión de categorías génicas “actividad de los VDCCs” tras la HSA mientras no están en consonancia con el empobrecimiento de varias categorías génicas implicadas en la dinámica del K^{+} .
3. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal se encuentra incrementada en los miocitos HSA con respecto a los Sham, mostrando mayor sensibilidad a las despolarizaciones moderadas. Los LTCCs no median el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en condiciones basales, aunque sí se ven afectados tras la HSA. Estos resultados están en consonancia con el enriquecimiento de categorías génicas implicadas en la dinámica del Ca^{2+} no dependiente de voltaje.
4. Las rutas de sensibilización a Ca^{2+} de PKC y RhoA/ROCK no mostraron alteraciones importantes de su función tras la HSA. No obstante, la inhibición conjunta de estas rutas con bajas concentraciones de inhibidores muestra un mayor efecto vasorrelajante en las arterias patológicas contraídas por despolarización moderada.
5. La inhibición conjunta de los LTCCs y de la ruta de RhoA/ROCK con dosis bajas de sus inhibidores provoca un mayor efecto vasorrelajante de las arterias patológicas contraídas por despolarización intensa con respecto a las Sham en el día 5 tras la HSA.
6. Se produjo un enriquecimiento de categorías génicas relacionadas con la activación del sistema inmune y de la reparación del DNA en arterias HSA con respecto a las Sham y a las Controles.
7. En arterias HSA se produjo un aumento significativo del tejido conjuntivo al día 5 tras la HSA con respecto a su correspondiente Sham y a las Controles, indicando que la HSA también produce alteraciones vasculares a nivel histológico.

8. Los resultados expuestos en la tesis doctoral muestran que, aun siendo conscientes de sus limitaciones, nuestro modelo animal reproduce algunas de las alteraciones funcionales e inmunológicas descritas por otros autores, otorgándole validez y respaldo experimental.
9. Las PBMCs procedentes de pacientes que habían sufrido una aHSA mostraron una mayor capacidad de adhesión al endotelio que las procedentes de sujetos Controles.
10. Se produce un incremento del número total de monocitos circulantes en los pacientes que han sufrido una aHSA. Este aumento se debe a que el número de monocitos clásicos aumenta. Por otro lado, el número de monocitos no-clásicos disminuye. Esto también se observa en las PBMCs que se adhieren a las células endoteliales.
11. En sujetos Controles existe una correlación lineal entre la cantidad de monocitos circulantes y la adhesión de las PBMCs. Dicha correlación no se observa al analizar las muestras de pacientes. Este resultado sugiere un aumento en la capacidad de adhesión de los monocitos de los pacientes.
12. Los pacientes de aHSA que presentan vasoespasmo muestran una mayor cantidad de monocitos circulantes.
13. Se produce un incremento de la expresión de las moléculas de adhesión CD49d, en linfocitos, y una disminución de CD11a en monocitos clásicos de pacientes con respecto a los Controles. El descenso de la expresión de CD11a en monocitos clásicos circulantes de pacientes a las 24h se correlaciona con el aumento de la gravedad de los pacientes y de la capacidad de adhesión de las PBMCs. También se encuentra la misma relación entre la gravedad y la disminución de CD11a en monocitos clásicos de pacientes a los 5 días.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguettaz, E., Bois, P., Cognard, C., & Sebillé, S. (2017). Stretch-activated TRPV2 channels: Role in mediating cardiopathies. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *130*, 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.05.007>
- Aihara, Y., Kasuya, H., Onda, H., Hori, T., & Takeda, J. (2001). Quantitative Analysis of Gene Expressions Related to Inflammation in Canine Spastic Artery After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, *32*(1), 212-217. <https://doi.org/10.1161/01.STR.32.1.212>
- Al-Khindi, T., MacDonald, R. L., & Schweizer, T. A. (2010). Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, *41*(8). <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.581975>
- Anzabi, M., Angleys, H., Aamand, R., Ardalan, M., Mouridsen, K., Rasmussen, P. M., Sørensen, J. C. H., Plesnila, N., Østergaard, L., & Iversen, N. K. (2019). Capillary flow disturbances after experimental subarachnoid hemorrhage: A contributor to delayed cerebral ischemia? *Microcirculation*, *26*(3), 1-11. <https://doi.org/10.1111/micc.12516>
- Ashida, T., & Blaustein, M. P. (1987). Regulation of cell calcium and contractility in mammalian arterial smooth muscle: The role of sodium-calcium exchange. *The journal of physiology*, *392*, 617-635.
- Ávila-Medina, J., Calderón-Sánchez, E., González-Rodríguez, P., Monje-Quiroga, F., Rosado, J. A., Castellano, A., Ordóñez, A., & Smani, T. (2016). Orail and TRPC1 Proteins Co-localize with CaV1.2 Channels to Form a Signal Complex in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(40), 21148-21159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.742171>
- Bacigaluppi, S., Ivaldi, F., Bragazzi, N. L., Benvenuto, F., Gallo, F., D'Andrea, A., Severi, P., Uccelli, A., & Zona, G. (2020). An Early Increase of Blood Leukocyte Subsets in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Is Predictive of Vasospasm. *Frontiers in Neurology*, *11*(December), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.587039>
- Backes, D., Rinkel, G. J. E., Kemperman, H., Linn, F. H. H., & Vergouwen, M. D. I. (2012). Time-dependent test characteristics of head computed tomography in patients suspected of nontraumatic subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, *43*(8), 2115-2119. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.658880>
- Bavbek, M., Polin, R., Kwan, A.-L., Arthur, A. S., Kassell, N. F., & Lee, K. S. (1998). Monoclonal Antibodies Against ICAM-1 and CD18 Attenuate Cerebral Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rabbits. *Stroke*, *29*(9), 1930-1936. <https://doi.org/10.1161/01.STR.29.9.1930>
- Bear, M., Connors, B., & Paradiso, M. (2008). *Neuroscience: Exploring the brain* (3er ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Benham, C. D., Hess, P., & Tsien, R. W. (1987). Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circulation research*, *61*(4 Pt 2), 10-16.
- Bergdahl, A., Gomez, M. F., Wihlborg, A. K., Erlinge, D., Eyjolfson, A., Xu, S. Z., Beech, D. J., Dreja, K., & Hellstrand, P. (2005). Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: Correlation with store-operated Ca²⁺ entry. *American*

Journal of Physiology - Cell Physiology, 288(4 57-4), 872-880.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2004>

BioRender. (2021). *BioRender*. <https://biorender.com/>

Brami, J., Chousterman, B., Boulouis, G., Dorze, M. Le, Majlath, M., Saint-Maurice, J. P., Civelli, V., Froelich, S., Houdart, E., & Labeyrie, M. A. (2020). Delayed Cerebral Infarction is Systematically Associated with a Cerebral Vasospasm of Large Intracranial Arteries. *Clinical Neurosurgery*, 86(2), E175-E183.
<https://doi.org/10.1093/neuros/nyz340>

Branch, M., & Wright, S. (s. f.). *The Nernst/Goldman equation simulator*.
<http://www.nernstgoldman.physiology.arizona.edu/>

Brisman, J. L., Song, J. K., & Newell, D. W. (2006). Cerebral Aneurysms. *New England Journal of Medicine*, 355(9), 928-939. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052760>

Brown, R. A., Chipperfield, A. R., Davis, J. P. L., & Harper, A. A. (1999). Increased (Na+K+Cl) Cotransport in Rat Arterial Smooth Muscle in Deoxycorticosterone (DOCA)/Salt-Induced Hypertension. *Journal of Vascular Research*, 36(6), 492-501.
<https://doi.org/10.1159/000025692>

Butler, W. E., Peterson, J. W., Zervas, N. T., & Morgan, K. G. (1996). Intracellular Calcium, Myosin Light Chain Phosphorylation, and Contractile Force in Experimental Cerebral Vasospasm. *Neurosurgery*, 38(4), 781-788.
<https://doi.org/10.1227/00006123-199604000-00029>

Cai, L., Zeng, H., Tan, X., Wu, X., Qian, C., & Chen, G. (2021). The Role of the Blood Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Frontiers in Neurology*, 12(June), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.671098>

Chaichana, K. L., Pradilla, G., Huang, J., & Tamargo, R. J. (2010). Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurgery*, 73(1), 22-41.
<https://doi.org/10.1016/j.surneu.2009.05.027>

Chandra, A., Li, W. A., Stone, C. R., Geng, X., & Ding, Y. (2017). The cerebral circulation and cerebrovascular disease I: Anatomy. *Brain circulation*, 3(2), 45-56.
https://doi.org/10.4103/bc.bc_10_17

Chang, C.-Z., Wu, S.-C., & Kwan, A.-L. (2014). Magnesium Lithospermate B, an Active Extract of *Salvia miltiorrhiza*, Mediates sGC/cGMP/PKG Translocation in Experimental Vasospasm. *BioMed Research International*, 2014, 1-9.
<https://doi.org/10.1155/2014/272101>

Chen, L., & Zhang, Q. (2020). Dynamic Change in Mean Platelet Volume and Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Frontiers in Neurology*, 11(November), 1-7. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.571735>

Chipperfield, A. R., & Harper, A. A. (2000). Chloride in smooth muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 74(3-5), 175-221.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00024-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00024-9)

Clatterbuck, R. E., Gailloud, P., Ogata, L., Gebremariam, A., Dietsch, G. N., Murphy, K. J., & Tamargo, R. J. (2003). Prevention of cerebral vasospasm by a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody administered after experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates. *Journal of Neurosurgery*, 99(2), 376-382.
<https://doi.org/10.3171/jns.2003.99.2.0376>

- Clatterbuck, R. E., Oshiro, E. M., Hoffman, P. A., Dietsch, G. N., Pardoll, D. M., & Tamargo, R. J. (2002). Inhibition of vasospasm with lymphocyte function-associated antigen—1 monoclonal antibody in a femoral artery model in rats. *Journal of Neurosurgery*, *97*(3), 676-682. <https://doi.org/10.3171/jns.2002.97.3.0676>
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W., & Lisanti, M. P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, *84*(4), 1341-1379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2003>
- Coulibaly, A. P., & Provencio, J. J. (2020). Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: an Overview of Inflammation-Induced Cellular Changes. *Neurotherapeutics*, *17*(2), 436-445. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00829-x>
- Crowley, R. W., Medel, R., Dumont, A. S., Ilodigwe, D., Kassell, N. F., Mayer, S. A., Ruefenacht, D., Schmiedek, P., Weidauer, S., Pasqualin, A., & MacDonald, R. L. (2011). Angiographic vasospasm is strongly correlated with cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, *42*(4), 919-923. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.597005>
- De Jaegere, S., Wuytack, F., Eggermont, J. A., Verboomen, H., & Casteels, R. (1990). Molecular cloning and sequencing of the plasma-membrane Ca²⁺ pump of pig smooth muscle. *Biochemical Journal*, *271*(3), 655-660. <https://doi.org/10.1042/bj2710655>
- del Valle-Rodríguez, A., López-Barneo, J., & Ureña, J. (2003). Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx. *The EMBO Journal*, *22*(17), 4337-4345.
- Devine, C. E., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1972). Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *Journal of Cell Biology*, *52*(3), 690-718. <https://doi.org/10.1083/jcb.52.3.690>
- Dickhout, J. G., & Lee, R. M. K. W. (2000). Increased medial smooth muscle cell length is responsible for vascular hypertrophy in young hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *279*(5 48-5), 2085-2094. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.h2085>
- Dios-Esponera, A., Melis, N., Subramanian, B. C., Weigert, R., & Samelson, L. E. (2019). Pak1 Kinase Promotes Activated T Cell Trafficking by Regulating the Expression of L-Selectin and CCR7. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00370>
- Dogan, M. F., Yildiz, O., Arslan, S. O., & Ulusoy, K. G. (2019). Potassium channels in vascular smooth muscle: a pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *33*(5), 504-523. <https://doi.org/10.1111/fcp.12461>
- Doulatov, S., Notta, F., Eppert, K., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., & Dick, J. E. (2010). Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature Immunology*, *11*(7), 585-593. <https://doi.org/10.1038/ni.1889>
- Eagles, M. E., Tso, M. K., & Macdonald, R. L. (2019). Cognitive Impairment, Functional Outcome, and Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurgery*, *124*, e558-e562. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.12.152>

- Earley, S., & Brayden, J. E. (2015). Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiological Reviews*, 95(2), 645-690. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2014>
- Egea-Guerrero, J. J., Murillo-Cabezas, F., Muñoz-Sánchez, M. Á., Vilches-Arenas, A., Porras-González, C., Castellano, A., Ureña, J., & González-Montelongo, M. del C. (2015). Role of L-type Ca²⁺ channels, sarcoplasmic reticulum and Rho kinase in rat basilar artery contractile properties in a new model of subarachnoid hemorrhage. *Vascular Pharmacology*, 72, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.04.011>
- Elkind, M. S. V., Veltkamp, R., Montaner, J., Johnston, S. C., Singhal, A. B., Becker, K., Lansberg, M. G., Tang, W., Kasliwal, R., & Elkins, J. (2020). Natalizumab in acute ischemic stroke (ACTION II). *Neurology*, 95(8), e1091-e1104. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010038>
- Elkins, J., Veltkamp, R., Montaner, J., Johnston, S. C., Singhal, A. B., Becker, K., Lansberg, M. G., Tang, W., Chang, I., Muralidharan, K., Gheuens, S., Mehta, L., & Elkind, M. S. V. (2017). Safety and efficacy of natalizumab in patients with acute ischaemic stroke (ACTION): a randomised, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, 16(3), 217-226. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30357-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30357-X)
- Etminan, N., Chang, H. S., Hackenberg, K., De Rooij, N. K., Vergouwen, M. D. I., Rinkel, G. J. E., & Algra, A. (2019). Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurology*, 76(5), 588-597. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.0006>
- Fernández-Tenorio, M. (2009). *Doble función de los canales de Ca²⁺ en la regulación de la contracción del músculo liso arterial y su relación con los mecanismos de sensibilización a Ca²⁺*. Universidad de Sevilla.
- Fernández-Tenorio, M., Porras-González, C., Castellano, A., Del Valle-Rodríguez, A., López-Barneo, J., & Ureña, J. (2011). Metabotropic regulation of RhoA/Rho-associated kinase by l-type Ca²⁺ Channels: New Mechanism for Depolarization-Evoked Mammalian Arterial Contraction. *Circulation Research*, 108(11), 1348-1357. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240127>
- Foley, P. L., Takenaka, K., Kassell, N. F., & Lee, K. S. (1994). Cytotoxic effects of bloody cerebrospinal fluid on cerebral endothelial cells in culture. *Journal of Neurosurgery*, 81(1), 87-92. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.81.1.0087>
- Frijns, C. J. M., & Kappelle, L. J. (2002). Inflammatory Cell Adhesion Molecules in Ischemic Cerebrovascular Disease. *Stroke*, 33(8), 2115-2122. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000021902.33129.69>
- Galkina, E., Florey, O., Zarbock, A., Smith, B. R. E., Preece, G., Lawrence, M. B., Haskard, D. O., & Ager, A. (2007). T lymphocyte rolling and recruitment into peripheral lymph nodes is regulated by a saturable density of L-selectin (CD62L). *European Journal of Immunology*, 37(5), 1243-1253. <https://doi.org/10.1002/eji.200636481>
- Geraghty, J. R., Davis, J. L., & Testai, F. D. (2019). Neuroinflammation and Microvascular Dysfunction After Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Emerging Components of Early Brain Injury Related to Outcome. *Neurocritical Care*, 31(2), 373-389. <https://doi.org/10.1007/s12028-019-00710-x>

- Ghosh, D., Syed, A. U., Prada, M. P., Nystoriak, M. A., Santana, L. F., Nieves-Cintrón, M., & Navedo, M. F. (2017). Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. En *Adv Pharmacol* (Vol. 78, pp. 49-87). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.002>
- Giblin, P. A., Hwang, S. T., Katsumoto, T. R., & Rosen, S. D. (1997). Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates beta1 integrins and promotes adhesion to fibronectin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *159*(7), 3498-3507. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9317149>
- Godoy, M. A. F. D., & Rattan, S. (2011). Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trends in Pharmacological Sciences*, *32*(7), 384-393. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.03.005>
- Görlitz, P., Hoelter, P., Rösch, J., Roessler, K., Knossalla, F., & Doerfler, A. (2018). Ultra-early Detection of Microcirculatory Injury as Predictor of Developing Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Clinical Neuroradiology*, *28*(4), 501-507. <https://doi.org/10.1007/s00062-017-0616-6>
- Gong, M. C., Fujihara, H., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1997). Translocation of rhoA Associated with Ca²⁺ Sensitization of Smooth Muscle *. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(16), 10704-10709. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10704>
- González-Montelongo, M. C., Egea-Guerrero, J. J., Murillo-Cabezas, F., González-Montelongo, R., Ruiz de Azúa-López, Z., Rodríguez-Rodríguez, A., Vilches-Arenas, A., Castellano, A., & Ureña, J. (2018). Relation of RhoA in Peripheral Blood Mononuclear Cells With Severity of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Vasospasm. *Stroke*, *49*(6), 1507-1510. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.020311>
- González-Montelongo, M. D. C., Porrás-González, C., González-Montelongo, R., Revilla-González, G., Pastor, M. D., Castellano, A., & Ureña, J. (2019). PKC α -mediated downregulation of RhoA activity in depolarized vascular smooth muscle: Synergistic vasorelaxant effect of PKC α and ROCK inhibition. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *52*(1), 76-93. <https://doi.org/10.33594/000000006>
- Grange, J. J., Baca-Regen, L. M., Nollendorfs, A. J., Persidsky, Y., Sudan, D. L., Baxter, B. T., & Alexander, J. (1998). Protein kinase C isoforms in human aortic smooth muscle cells. *Journal of Vascular Surgery*, *27*(5), 919-927. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(98\)70273-3](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(98)70273-3)
- Gris, T., Laplante, P., Thebault, P., Cayrol, R., Najjar, A., Joannette-Pilon, B., Brillant-Marquis, F., Magro, E., English, S. W., Lapointe, R., Bojanowski, M., Francoeur, C. L., & Cailhier, J. F. (2019). Innate immunity activation in the early brain injury period following subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1629-7>
- Grover, A. K., Kwan, C. Y., Rangachari, P. K., & Daniel, E. E. (1983). Na-Ca exchange in a smooth muscle plasma membrane-enriched fraction. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, *13*(2), 158-165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1983.244.3.c158>
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(6), 3440-3450. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83641-4)
- Guan, Y. Y., Weir, B. K. A., Marton, L. S., Macdonald, R. L., & Zhang, H. (1998). Effects

- of erythrocyte lysate of different incubation times on intracellular free calcium in rat basilar artery smooth-muscle cells. *Journal of Neurosurgery*, 89(6), 1007-1014. <https://doi.org/10.3171/jns.1998.89.6.1007>
- Güney, O., Erdi, F., Esen, H., Kiyici, A., & Kocaogullar, Y. (2010). N-acetylcysteine prevents vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurgery*, 73(1), 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2009.06.003>
- Guo, Z., Xu, L., Wang, X., & Sun, X. (2015). MMP-9 expression and activity is concurrent with endothelial cell apoptosis in the basilar artery after subarachnoid hemorrhaging in rats. *Neurological Sciences*, 36(7), 1241-1245. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2092-6>
- Hall, J. E. (2016). *Guiton y Hall. Tratado de fisiología médica* (13^a). Elsevier Inc.
- Hammond, M. D., Ambler, W. G., Ai, Y., & Sansing, L. H. (2014). α 4 Integrin Is a Regulator of Leukocyte Recruitment After Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 45(8), 2485-2487. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005551>
- Honing, H., van den Berg, T. K., van der Pol, S. M. A., Dijkstra, C. D., van der Kammen, R. A., Collard, J. G., & de Vries, H. E. (2004). RhoA activation promotes transendothelial migration of monocytes via ROCK. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(3), 523-528. <https://doi.org/10.1189/jlb.0203054>
- Hunt, B. J., Poston, L., Schachter, M., & Halliday, A. (Eds.). (2002). *An introduction to Vascular Biology. From Basic Science to Clinical Practice* (2nd ed.).
- Ishiguro, M., Wellman, T. L., Honda, A., Russell, S. R., Tranmer, B. I., & Wellman, G. C. (2005). Emergence of a R-Type Ca²⁺ Channel (Ca_v2.3) Contributes to Cerebral Artery Constriction After Subarachnoid Hemorrhage. *Circulation Research*, 96(4), 419-426. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000157670.49936.da>
- Jahromi, B. S., Aihara, Y., Ai, J., Zhang, Z.-D., Weyer, G., Nikitina, E., Yassari, R., Houamed, K. M., & Macdonald, R. L. (2008). Temporal profile of potassium channel dysfunction in cerebrovascular smooth muscle after experimental subarachnoid haemorrhage. *Neuroscience Letters*, 440(1), 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.05.015>
- Jarajapu, Y. P. R., & Knot, H. J. (2005). Relative contribution of Rho kinase and protein kinase C to myogenic tone in rat cerebral arteries in hypertension. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(5 58-5), 1917-1922. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01012.2004>
- Julian, L., & Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK). *Small GTPases*, 5(2), e29846. <https://doi.org/10.4161/sgtp.29846>
- Kamishima, T., & McCarron, J. G. (1997). Regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration by Ca²⁺ stores in single smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *The Journal of Physiology*, 501(3), 497-508. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.497bm.x>
- Kikkawa, Y., Matsuo, S., Kameda, K., Hirano, M., Nakamizo, A., Sasaki, T., & Hirano, K. (2012). Mechanisms Underlying Potentiation of Endothelin-1-Induced Myofilament Ca²⁺ Sensitization after Subarachnoid Hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(2), 341-352. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.132>
- Kim, P., Yoshimoto, Y., Iino, M., Tomio, S., Kirino, T., & Nonomura, Y. (1996).

- Impaired Calcium Regulation of Smooth Muscle during Chronic Vasospasm following Subarachnoid Hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(2), 334-341. <https://doi.org/10.1097/00004647-199603000-00020>
- Kobayashi, S., Somlyo, A. V., & Somlyo, A. P. (1988). Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent, but not the independent, calcium release induced by guanine nucleotide in vascular smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 153(2), 625-631. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)81141-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81141-0)
- Koide, M., Moshkforoush, A., Tsoukias, N. M., Hill-Eubanks, D. C., Wellman, G. C., Nelson, M. T., & Dabertrand, F. (2018). The yin and yang of K V channels in cerebral small vessel pathologies. *Microcirculation*, 25(1), e12436. <https://doi.org/10.1111/micc.12436>
- Koide, M., Nishizawa, S., Ohta, S., Yokoyama, T., & Namba, H. (2002). Chronological changes of the contractile mechanism in prolonged vasospasm after subarachnoid hemorrhage: from protein kinase C to protein tyrosine kinase. *Neurosurgery*, 51(6), 1468-1476. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000036389.57399.D5>
- Koide, M., Nystoriak, M. A., Brayden, J. E., & Wellman, G. C. (2011). Impact of Subarachnoid Hemorrhage on Local and Global Calcium Signaling in Cerebral Artery Myocytes. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 110, 145-150. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0353-1_25
- Koide, M., Penar, P. L., Tranmer, B. I., & Wellman, G. C. (2007). Heparin-binding EGF-like growth factor mediates oxyhemoglobin-induced suppression of voltage-dependent potassium channels in rabbit cerebral artery myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(3), H1750-H1759. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00443.2007>
- Koide, M., & Wellman, G. C. (2013). SAH-Induced Suppression of Voltage-Gated K⁺ (KV) Channel Currents in Parenchymal Arteriolar Myocytes Involves Activation of the HB-EGF/EGFR Pathway. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 115, 179-184. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1192-5_34
- Koide, M., & Wellman, G. C. (2015). SAH-Induced MMP Activation and K V Current Suppression is Mediated Via Both ROS-Dependent and ROS-Independent Mechanisms. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 120(Dci), 89-94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-04981-6_15
- Korostynski, M., Piechota, M., Morga, R., Hoinkis, D., Golda, S., Zygmunt, M., Dziedzic, T., Moskala, M., Slowik, A., & Pera, J. (2019). Systemic response to rupture of intracranial aneurysms involves expression of specific gene isoforms. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1891-6>
- Kratofil, R. M., Kubes, P., & Deniset, J. F. (2017). Monocyte conversion during inflammation and injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(1), 35-42. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308198>
- Lan, C., Das, D., Wloskowicz, A., & Vollrath, B. (2004). Endothelin-1 modulates hemoglobin-mediated signaling in cerebrovascular smooth muscle via RhoA/Rho kinase and protein kinase C. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(1), H165-H173. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00664.2003>

- Langhauser, F., Kraft, P., Göb, E., Leinweber, J., Schuhmann, M. K., Lorenz, K., Gelderblom, M., Bittner, S., Meuth, S. G., Wiendl, H., Magnus, T., & Kleinschnitz, C. (2014). Blocking of $\alpha 4$ Integrin Does Not Protect From Acute Ischemic Stroke in Mice. *Stroke*, *45*(6), 1799-1806. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005000>
- Leclerc, J. L., Garcia, J. M., Diller, M. A., Carpenter, A.-M., Kamat, P. K., Hoh, B. L., & Doré, S. (2018). A Comparison of Pathophysiology in Humans and Rodent Models of Subarachnoid Hemorrhage. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*(March). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00071>
- Li, H., Pan, R., Wang, H., Rong, X., Yin, Z., Milgrom, D. P., Shi, X., Tang, Y., & Peng, Y. (2013). Clipping versus coiling for ruptured intracranial aneurysms: A systematic review and meta-analysis. *Stroke*, *44*(1), 29-37. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.663559>
- Li, K., Barras, C. D., Chandra, R. V., Kok, H. K., Maingard, J. T., Carter, N. S., Russell, J. H., Lai, L., Brooks, M., & Asadi, H. (2019). A Review of the Management of Cerebral Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurgery*, *126*, 513-527. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.03.083>
- Liesz, A., Zhou, W., Mracskó, É., Karcher, S., Bauer, H., Schwarting, S., Sun, L., Bruder, D., Stegemann, S., Cerwenka, A., Sommer, C., Dalpke, A. H., & Veltkamp, R. (2011). Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain*, *134*(3), 704-720. <https://doi.org/10.1093/brain/awr008>
- Liu, Z., & Khalil, R. A. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, *153*(December 2017), 91-122. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.012>
- Lohn, M., Furstenau, M., Sagach, V., Elger, M., Schulze, W., Luft, F. C., Haller, H., & Gollasch, M. (2000). Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae. *Circulation Research*, *87*(11), 1034-1039. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.11.1034>
- Lucke-Wold, B., Logsdon, A., Manoranjan, B., Turner, R., McConnell, E., Vates, G., Huber, J., Rosen, C., & Simard, J. (2016). Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(4), 497. <https://doi.org/10.3390/ijms17040497>
- Macdonald, R. L., & Schweizer, T. A. (2017). Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *The Lancet*, *389*(10069), 655-666. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30668-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30668-7)
- Macdonald, R. L., Zhang, Z.-D., Takahashi, M., Nikitina, E., Young, J., Xie, A., & Larkin, L. (2006). Calcium sensitivity of vasospastic basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *290*(6), H2329-H2336. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00911.2005>
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO Journal*, *15*(9), 2208-2216. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00574.x>
- Matz, P. G., Sundaresan, S., Sharp, F. R., & Weinstein, P. R. (1996). Induction of HSP70

- in rat brain following subarachnoid hemorrhage produced by endovascular perforation. *Journal of Neurosurgery*, 85(1), 138-145. <https://doi.org/10.3171/jns.1996.85.1.0138>
- McFadzean, I., & Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 135(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704468>
- Meguro, T., Chen, B., Lancon, J., & Zhang, J. H. (2001). Oxyhemoglobin induces caspase-mediated cell death in cerebral endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 77(4), 1128-1135. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00313.x>
- Miller, B. G., Connors, B. A., Bohlen, H. G., & Evan, A. P. (1987). Cell and wall morphology of intestinal arterioles from 4- to 6- and 17- to 19-week-old Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 9(1), 59-68. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.9.1.59>
- Miyagi, Y., Carpenter, R. C., Meguro, T., Parent, A. D., & Zhang, J. H. (2000). Upregulation of rho A and rho kinase messenger RNAs in the basilar artery of a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 93(3), 471-476. <https://doi.org/10.3171/jns.2000.93.3.0471>
- Mizuno, Y., Isotani, E., Huang, J., Ding, H., Stull, J. T., & Kamm, K. E. (2008). Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 295(2), 358-364. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.90645.2007>
- Mohme, M., Sauvigny, T., Mader, M. M.-D., Schweingruber, N., Maire, C. L., Runger, A., Ricklefs, F., Regelsberger, J., Schmidt, N. O., Westphal, M., Lamszus, K., Tolosa, E., & Czorlich, P. (2020). Immune Characterization in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Reveals Distinct Monocytic Activation and Chemokine Patterns. *Translational Stroke Research*, 11(6), 1348-1361. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00764-1>
- Moller, J. V., Nissen, P., Sørensen, T. L. M., & Le Maire, M. (2005). Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase pump. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(4), 387-393. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.06.005>
- Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., ... Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 34(3), 267-273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Moraes, L., Grille, S., Morelli, P., Mila, R., Trias, N., Brugnini, A., LLuberas, N., Biestro, A., & Lens, D. (2015). Immune cells subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *SpringerPlus*, 4(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0970-2>
- Mossa-Basha, M., Huynh, T. J., Hippe, D. S., Fata, P., Morton, R. P., & Levitt, M. R. (2019). Vessel wall MRI characteristics of endovascularly treated aneurysms: Association with angiographic vasospasm. *Journal of Neurosurgery*, 131(3), 859-867. <https://doi.org/10.3171/2018.4.JNS172829>
- Mulvany, M. J., & Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance

- vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*, 41(1), 19-26. <https://doi.org/10.1161/01.RES.41.1.19>
- Munarriz, P. M., Gómez, P. A., Paredes, I., Castaño-Leon, A. M., Cepeda, S., & Lagares, A. (2016). Basic Principles of Hemodynamics and Cerebral Aneurysms. *World Neurosurgery*, 88, 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.01.031>
- Muñoz-Sánchez, M. A., Egea-Guerrero, J. J., Revuelto-Rey, J., Moreno-Valladares, M., & Murillo-Cabezas, F. (2012). A new percutaneous model of Subarachnoid Haemorrhage in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 211(1), 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.08.010>
- Nakamura, S., Tsubokawa, T., Yoshida, K., Hirasawa, T., & Nakano, M. (1992). Appearance of Collagen Fibers in the Cerebral Vascular Wall Following Subarachnoid Hemorrhage. *Neurologia medico-chirurgica*, 32(12), 877-882. <https://doi.org/10.2176/nmc.32.877>
- Nieuwkamp, D. J., Setz, L. E., Algra, A., Linn, F. H. H., Rooij, N. K. De, & Rinkel, G. J. E. (2007). Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time , according to age , sex , and region : a meta-analysis. *The Lancet Neurology*, 8(7), 635-642. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70126-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70126-7)
- Nikitina, E., Kawashima, A., Takahashi, M., Zhang, Z.-D., Shang, X., Ai, J., & Macdonald, R. L. (2010). Alteration in voltage-dependent calcium channels in dog basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*, 113(4), 870-880. <https://doi.org/10.3171/2010.2.JNS091038>
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, 41(5), 694-707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
- Onoda, K., Ono, S., Ogihara, K., Shiota, T., Asari, S., Ohmoto, T., & Ninomiya, Y. (1996). Role of Extracellular Matrix in Experimental Vasospasm. *Stroke*, 27(11), 2102-2109. <https://doi.org/10.1161/01.STR.27.11.2102>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (2^o). Academic Press Australia.
- Peng, J., Wu, Y., Tian, X., Pang, J., Kuai, L., Cao, F., Qin, X., Zhong, J., Li, X., Li, Y., Sun, X., Chen, L., & Jiang, Y. (2017). High-Throughput Sequencing and Co-Expression Network Analysis of lncRNAs and mRNAs in Early Brain Injury Following Experimental Subarachnoid Haemorrhage. *Scientific Reports*, 7(1), 46577. <https://doi.org/10.1038/srep46577>
- Pera, J., Korostynski, M., Golda, S., Piechota, M., Dzbek, J., Krzyszkowski, T., Dziedzic, T., Moskala, M., Przewlocki, R., Szczudlik, A., & Slowik, A. (2013). Gene Expression Profiling of Blood in Ruptured Intracranial Aneurysms: in Search of Biomarkers. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(7), 1025-1031. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.37>
- Perry, J. J., Stiell, I. G., Sivilotti, M. L. A., Bullard, M. J., Emond, M., Symington, C., Sutherland, J., Worster, A., Hohl, C., Lee, J. S., Eisenhauer, M. A., Mortensen, M., Mackey, D., Pauls, M., Lesiuk, H., & Wells, G. A. (2011). Sensitivity of computed tomography performed within six hours of onset of headache for diagnosis of subarachnoid haemorrhage: prospective cohort study. *BMJ*, 343(jul18 1), d4277-d4277. <https://doi.org/10.1136/bmj.d4277>
- Pietras, E. M., Reynaud, D., Kang, Y. A., Carlin, D., Calero-Nieto, F. J., Leavitt, A. D.,

- Stuart, J. A., Göttgens, B., & Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*, 17(1), 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>
- Popescu, L. M., & Ignat, P. (1983). *Calmodulin-dependent Ca²⁺-pump ATPase of human smooth muscle sarcolemma*. 4, 219-235.
- Porras-González, C. (2017). *Implicación de los canales de Ca²⁺ tipo L y RhoA/Rho quinasa en el incremento del tono vascular inducido por la despolarización mantenida: posible papel en la hipertensión arterial*. Universidad de Sevilla.
- Porras-González, C., González-Rodríguez, P., Calderón-Sánchez, E., López-Barneo, J., & Ureña, J. (2014). Low-dose combination of Rho kinase and L-type Ca²⁺ channel antagonists for selective inhibition of depolarization-induced sustained arterial contraction. *European Journal of Pharmacology*, 732(1), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.046>
- Prieto, J., Eklund, A., & Patarroyo, M. (1994). Regulated Expression of Integrins and Other Adhesion Molecules during Differentiation of Monocytes into Macrophages. *Cellular Immunology*, 156(1), 191-211. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1164>
- Prunell, G. F., Mathiesen, T., Diemer, N. H., Svendgaard, N. A., Dodd, R. L., Steinberg, G. K., Kassell, N. F., Chow, M. M., Dumont, A., Findlay, J. M., & Vapalahti, M. (2003). Experimental subarachnoid hemorrhage: Subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery*, 52(1), 165-176. <https://doi.org/10.1097/00006123-200301000-00022>
- Prunell, G. F., Mathiesen, T., & Svendgaard, N.-A. (2004). Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Cerebral Blood Flow and Brain Metabolism during the Acute Phase in Three Different Models in the Rat. *Neurosurgery*, 54(2), 426-437. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000103670.09687.7A>
- Ratz, P. H., Berg, K. M., Urban, N. H., & Miner, A. S. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 288(4), C769-C783. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00529.2004>
- Revilla-González, G. (2015). *Estudio de la homeostasis del Ca²⁺ en el músculo liso arterial*. Universidad de Sevilla.
- Revilla-González, G. (2016). *Estudio del vasoespasma cerebral en un modelo experimental de hemorragia subaracnoidea en rata*. Univesidad de Sevilla.
- Ridwan, S., Grote, A., & Simon, M. (2021). Interleukin 6 in cerebrospinal fluid is a biomarker for delayed cerebral ischemia (DCI) related infarctions after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Scientific Reports*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79586-3>
- Roa, J. A., Sarkar, D., Zanaty, M., Ishii, D., Lu, Y., Karandikar, N. J., Hasan, D. M., Ortega, S. B., & Samaniego, E. A. (2020). Preliminary results in the analysis of the immune response after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68861-y>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2008). *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular* (5^a). Lippincott Williams & Wilkins.

- Sailer, A. M. H., Wagemans, B. A. J. M., Nelemans, P. J., De Graaf, R., & Van Zwam, W. H. (2014). Diagnosing intracranial aneurysms with mr angiography : Systematic review and meta-analysis. *Stroke*, *45*(1), 119-126. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.003133>
- Sarrafzadeh, A., Schlenk, F., Meisel, A., Dreier, J., Vajkoczy, P., & Meisel, C. (2011). Immunodepression After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke*, *42*(1), 53-58. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.594705>
- Sasahara, A., Kasuya, H., Krischek, B., Tajima, A., Onda, H., Sasaki, T., Akagawa, H., Hori, T., & Inoue, I. (2008). Gene expression in a canine basilar artery vasospasm model: a genome-wide network-based analysis. *Neurosurgical Review*, *31*(3), 283. <https://doi.org/10.1007/s10143-008-0135-7>
- Savarraj, J., Parsha, K., Hergenroeder, G., Ahn, S., Chang, T. R., Kim, D. H., & Choi, H. A. (2018). Early Brain Injury Associated with Systemic Inflammation After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocritical Care*, *28*(2), 203-211. <https://doi.org/10.1007/s12028-017-0471-y>
- Sharma, N., Cho, D. H., Kim, S. Y., Bhattarai, J. P., Hwang, P. H., & Han, S. K. (2012). Magnesium sulfate suppresses L-type calcium currents on the basilar artery smooth muscle cells in rabbits. *Neurological Research*, *34*(3), 291-296. <https://doi.org/10.1179/1743132812Y.0000000016>
- Shi, X., Fu, Y., Liao, D., Chen, Y., & Liu, J. (2014). Alterations of Voltage-Dependent Calcium Channel Currents in Basilar Artery Smooth Muscle Cells at Early Stage of Subarachnoid Hemorrhage in a Rabbit Model. *PLoS ONE*, *9*(1), e84129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084129>
- Shimamura, N., Fumoto, T., Naraoka, M., Katagai, T., Fujiwara, N., Katayama, K., Kinoshita, S., Yanagiya, K., Sasaki, T., Kurose, A., & Ohkuma, H. (2020). Irreversible Neuronal Damage Begins Just After Aneurysm Rupture in Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage Patients. *Translational Stroke Research*. <https://doi.org/10.1007/s12975-020-00875-0>
- Shmygol, A., & Wray, S. (2005). Modulation of agonist-induced Ca²⁺ release by SR Ca²⁺ load: Direct SR and cytosolic Ca²⁺ measurements in rat uterine myocytes. *Cell Calcium*, *37*(3), 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.10.002>
- Sobel, R. A., Mitchell, M. E., & Fondren, G. (1990). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *The American journal of pathology*, *136*(6), 1309-1316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1972610>
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W., & Gill, D. L. (2006). Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(30), 20661-20665. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600126200>
- Somlyo, A. P., & Somlyo, A. V. (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews*, *83*(4), 1325-1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2003>
- Somlyo, A. V., Bond, M., Somlyo, A. P., & Scarpa, A. (1985). Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 82(15), 5231-5235. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.15.5231>

- Steiner, T., Juvela, S., Unterberg, A., Jung, C., Forsting, M., & Rinkel, G. (2013). European Stroke Organization Guidelines for the Management of Intracranial Aneurysms and Subarachnoid Haemorrhage. *Cerebrovascular Diseases*, 35(2), 93-112. <https://doi.org/10.1159/000346087>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545-15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Sun, L., Wang, J., Li, M., Li, M., & Zhu, Y. (2020). The contribution of wall shear stress insult to the growth of small unruptured cerebral aneurysms in longitudinal 3D-TOF-MRA. *Journal of the Neurological Sciences*, 413(March), 116798. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116798>
- Takuwa, Y., Matsui, T., Abe, Y., Nagafuji, T., Yamashita, K., & Asano, T. (1993). Alterations in Protein Kinase C Activity and Membrane Lipid Metabolism in Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 13(3), 409-415. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.55>
- Tortora, J., & Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología* (15ª). Editorial Médica Panamericana.
- Tso, M. K., Turgeon, P., Bosche, B., Lee, C. K., Nie, T., D'Abbondanza, J., Ai, J., Marsden, P. A., & Macdonald, R. L. (2021). Gene expression profiling of brain endothelial cells after experimental subarachnoid haemorrhage. *Scientific Reports*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87301-z>
- Urrea, X., Villamor, N., Amaro, S., Gómez-Choco, M., Obach, V., Oleaga, L., Planas, A. M., & Chamorro, A. (2009). Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(5), 994-1002. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.25>
- Van Der Laan, A. M., Ter Horst, E. N., Delewi, R., Begieneman, M. P. V., Krijnen, P. A. J., Hirsch, A., Lavaei, M., Nahrendorf, M., Horrevoets, A. J., Niessen, H. W. M., & Piek, J. J. (2014). Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *European Heart Journal*, 35(6), 376-385. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh331>
- Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Pérez-Martínez, M., Yáñez-Mó, M., Sancho, D., Cabrero, J. R., Barreiro, O., de la Fuente, H., Itoh, K., & Sánchez-Madrid, F. (2003). The RhoA Effector mDia Is Induced During T Cell Activation and Regulates Actin Polymerization and Cell Migration in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 171(2), 1023-1034. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.2.1023>
- Vikman, P., Ansar, S., & Edvinsson, L. (2007). Transcriptional regulation of inflammatory and extracellular matrix-regulating genes in cerebral arteries following experimental subarachnoid hemorrhage in rats: Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery*, 107(5), 1015-1022. <https://doi.org/10.3171/JNS-07/11/1015>
- Vollrath, B. A. M., Weir, B. K. A., Macdonald, R. L., & Cook, D. A. (1994). Intracellular

- mechanisms involved in the responses of cerebrovascular smooth-muscle cells to hemoglobin. *Journal of Neurosurgery*, 80(2), 261-268. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.2.0261>
- Wang, A. Y. C., Hsieh, P. C., Chen, C. C., Chin, S. C., Wu, Y. M., Chen, C. T., Chang, C. H., & Wu, T. W. E. (2018). Effect of Intracranial Pressure Control on Improvement of Cerebral Perfusion After Acute Subarachnoid Hemorrhage: A Comparative Angiography Study Based on Temporal Changes of Intracranial Pressure and Systemic Pressure. *World Neurosurgery*, 120, e290-e296. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.08.053>
- Wang, C. J., Lee, P. Y., Wu, B. N., Wu, S. C., Loh, J. K., Tsai, H. P., Chung, C. L., Kassell, N. F., & Kwan, A. L. (2014). Alteration of Basilar Artery Rho-Kinase and Soluble Guanylyl Cyclase Protein Expression in a Rat Model of Cerebral Vasospasm following Subarachnoid Hemorrhage. *BioMed Research International*, 2014, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/531508>
- Wang, F., Wang, Y., Zhang, L., Wang, H., & Yu, H. (2015). Effect of subarachnoid hemorrhage on voltage-dependence calcium channel current in cerebral artery smooth muscle cells. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(8), 13556-13563. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26550294>
- Wang, J., Xu, J., Zhao, X., Xie, W., Wang, H., & Kong, H. (2018). Fasudil inhibits neutrophil-endothelial cell interactions by regulating the expressions of GRP78 and BMPR2. *Experimental Cell Research*, 365(1), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.02.026>
- Wang, L., Zhang, Z., Liang, L., Wu, Y., Zhong, J., & Sun, X. (2019). Anti-high mobility group box-1 antibody attenuated vascular smooth muscle cell phenotypic switching and vascular remodelling after subarachnoid haemorrhage in rats. *Neuroscience Letters*, 708(March), 134338. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134338>
- Wang, Y., Zheng, X. R., Riddick, N., Bryden, M., Baur, W., Zhang, X., & Surks, H. K. (2009). ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 104(4), 531-540. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188524>
- Waters, A., & Harder, D. R. (1985). Altered membrane properties of cerebral vascular smooth muscle following subarachnoid hemorrhage: an electrophysiological study. I. Changes in resting membrane potential (Em) and effect on the electrogenic pump potential contribution to Em. *Stroke*, 16(6), 990-997. <https://doi.org/10.1161/01.STR.16.6.990>
- Welsh, D. G., Morielli, A. D., Nelson, M. T., & Brayden, J. E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circulation Research*, 90(3), 248-250. <https://doi.org/10.1161/hh0302.105662>
- Wettersvik, T., Howells, T., Lewén, A., Ronne-Engström, E., & Enblad, P. (2021). Temporal Dynamics of ICP, CPP, PRx, and CPPopt in High-Grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and the Relation to Clinical Outcome. *Neurocritical Care, Dci*. <https://doi.org/10.1007/s12028-020-01162-4>
- Wickman, G., Lan, C., & Vollrath, B. (2003). Functional Roles of the Rho/Rho Kinase Pathway and Protein Kinase C in the Regulation of Cerebrovascular Constriction Mediated by Hemoglobin. *Circulation Research*, 92(7), 809-816. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000066663.12256.B2>

- Xu, S. Z., Boulay, G., Flemming, R., & Beech, D. J. (2006). E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 291(6), 2653-2659. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00495.2006>
- Yamaguchi-Okada, M., Nishizawa, S., Koide, M., & Nonaka, Y. (2005). Biomechanical and phenotypic changes in the vasospastic canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Applied Physiology*, 99(5), 2045-2052. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01138.2004>
- Yang, T. M., Lin, Y. J., Tsai, N. W., Lin, W. C., Ho, J. T., Chang, W. N., Cheng, B. C., Kung, C. T., Lee, T. H., Huang, C. C., Wang, H. C., & Lu, C. H. (2012). The prognostic value of serial leukocyte adhesion molecules in post-aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clinica Chimica Acta*, 413(3-4), 411-416. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.10.007>
- Zagranichnaya, T. K., Wu, X., & Villereal, M. L. (2005). Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29559-29569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505842200>
- Zarrinkoob, L., Ambarki, K., Wåhlin, A., Birgander, R., Eklund, A., & Malm, J. (2015). Blood Flow Distribution in Cerebral Arteries. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(4), 648-654. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.241>
- Zhang, X., Liu, Y., Zhang, S., Wang, C., Zou, C., & Li, A. (2020). Neutrophil-to-Albumin Ratio as a Biomarker of Delayed Cerebral Ischemia After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurgery*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2020.12.084>
- Zhao, D., He, X., Liu, L., Liu, Q., Xu, H., Ji, Y., Zhu, L., Wang, G., Xu, J., & Wang, Y. (2020). Correlation between Arteriole Membrane Potential and Cerebral Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Neurology India*, 68(2), 327. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.280652>
- Zhao, H., Li, S. ting, Zhu, J., Hua, X. M., & Wan, L. (2019). Analysis of Peripheral Blood Cells' Transcriptome in Patients With Subarachnoid Hemorrhage From Ruptured Aneurysm Reveals Potential Biomarkers. *World Neurosurgery*, 129, e16-e22. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.04.125>
- Zheng, B., Liu, H., Wang, R., Xu, S., Liu, Y., Wang, K., Hou, X., Shen, C., Wu, J., Chen, X., Wu, P., Zhang, G., Ji, Z., Wang, H., Xiao, Y., Han, J., Shi, H., & Zhao, S. (2015). Expression signatures of long non-coding RNAs in early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 967-973. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3474>

ANEXO I: Tablas de los 20 *gene sets* más enriquecidos y más empobrecidos en las siguientes comparaciones según las librerías *Molecular Function* y *KEGG*.

HSA vs. Control

Librería *Molecular Function*, 20 *gene sets* más enriquecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Exoribonuclease activity	39	0,486	1,907	0,000	0,161	0,117	4674	tags=33% list=21% signal=42%
Exonuclease activity active with either ribo or deoxyribonucleic acids and producing 5 phosphomonoesters	57	0,463	1,761	0,000	0,263	0,332	4674	tags=37% list=21% signal=46%
Translation initiation factor activity	44	0,498	1,747	0,000	0,222	0,401	8535	tags=68% list=38% signal=110%
Transmembrane receptor protein serine threonine kinase activity	17	0,574	1,710	0,000	0,274	0,515	6478	tags=47% list=29% signal=66%
Single stranded RNA binding	75	0,394	1,709	0,000	0,229	0,525	7157	tags=45% list=32% signal=66%
Damaged DNA binding	63	0,427	1,669	0,000	0,288	0,640	6993	tags=54% list=31% signal=78%
Ribonucleoprotein complex binding	121	0,266	1,647	0,000	0,322	0,751	8565	tags=45% list=38% signal=73%
Ubiquitin-like protein conjugating enzyme activity	35	0,504	1,647	0,062	0,285	0,751	7890	tags=60% list=35% signal=93%
3-5 exonuclease activity	52	0,383	1,644	0,000	0,264	0,751	4674	tags=33% list=21% signal=41%
Cyclin dependent protein kinase activity	25	0,441	1,623	0,000	0,300	0,834	3556	tags=28% list=16% signal=33%
5-3 exonuclease activity	17	0,499	1,617	0,000	0,287	0,849	5433	tags=41% list=24% signal=54%
Translation factor activity RNA binding	71	0,345	1,615	0,060	0,272	0,849	8535	tags=58% list=38% signal=93%
Exonuclease activity	78	0,365	1,612	0,000	0,259	0,849	4674	tags=31% list=21% signal=39%
Protein phosphorylated amino acid binding	55	0,486	1,605	0,027	0,263	0,849	3503	tags=25% list=16% signal=30%
Transcription regulator inhibitor activity	15	0,631	1,591	0,033	0,287	0,884	3174	tags=47% list=14% signal=54%

Insulin-like growth factor binding	23	0,533	1,589	0,038	0,280	0,904	1315	tags=22% list=6% signal=23%
Structural constituent of ribosome	150	0,419	1,585	0,030	0,270	0,904	8699	tags=65% list=39% signal=106%
Phosphatidylcholine transporter activity	16	0,537	1,582	0,000	0,262	0,904	2039	tags=31% list=9% signal=34%
Phosphotyrosine residue binding	43	0,557	1,566	0,000	0,293	0,928	3503	tags=33% list=16% signal=39%
DNA directed DNA polymerase activity	22	0,508	1,556	0,036	0,307	0,965	6045	tags=50% list=27% signal=68%

Librería Molecular Function, 20 gene sets más empobrecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Solute cation symporter activity	99	-0,594	-1,605	0,000	1,000	0,830	4937	tags=53% list=22% signal=67%
Solute sodium symporter activity	72	-0,653	-1,547	0,000	1,000	0,941	4937	tags=63% list=22% signal=80%
Organic acid sodium symporter activity	29	-0,695	-1,534	0,000	1,000	0,941	4937	tags=69% list=22% signal=88%
Symporter activity	141	-0,531	-1,532	0,000	1,000	0,941	4799	tags=46% list=21% signal=58%
Inhibitory extracellular ligand gated ion channel activity	15	-0,708	-1,520	0,000	1,000	0,956	2049	tags=47% list=9% signal=51%
Active ion transmembrane transporter activity	195	-0,488	-1,516	0,000	1,000	0,956	4086	tags=36% list=18% signal=44%
Acid amino acid ligase activity	18	-0,511	-1,505	0,000	1,000	0,956	5585	tags=44% list=25% signal=59%
Zinc ion transmembrane transporter activity	21	-0,582	-1,500	0,032	1,000	0,956	3182	tags=38% list=14% signal=44%
Secondary active monocarboxylate transmembrane transporter activity	18	-0,702	-1,498	0,000	1,000	0,956	2623	tags=50% list=12% signal=57%
Anion cation symporter activity	22	-0,612	-1,484	0,000	1,000	0,956	4062	tags=45% list=18% signal=56%
GAP junction channel activity	19	-0,596	-1,483	0,058	0,963	0,956	5703	tags=63% list=26% signal=85%

Monocarboxylic acid transmembrane transporter activity	59	-0,522	-1,482	0,039	0,888	0,956	4937	tags=47% list=22% signal=61%
Oxidoreductase activity acting on paired donors with incorporation or reduction of molecular oxygen NADPH as one donor and incorporation of one atom of oxygen	33	-0,522	-1,479	0,000	0,848	0,982	5321	tags=45% list=24% signal=60%
Organic anion transmembrane transporter activity	161	-0,479	-1,479	0,000	0,794	0,982	4629	tags=41% list=21% signal=51%
Primary active transmembrane transporter activity	54	-0,425	-1,472	0,054	0,768	1,000	7730	tags=59% list=35% signal=90%
Active transmembrane transporter activity	283	-0,441	-1,468	0,000	0,744	1,000	4799	tags=37% list=21% signal=47%
Secondary active transmembrane transporter activity	228	-0,463	-1,458	0,000	0,764	1,000	4346	tags=37% list=19% signal=46%
Sodium ion transmembrane transporter activity	144	-0,508	-1,457	0,000	0,724	1,000	4799	tags=47% list=21% signal=60%
Vitamin transmembrane transporter activity	25	-0,550	-1,454	0,093	0,708	1,000	5603	tags=60% list=25% signal=80%
Organic acid transmembrane transporter activity	141	-0,479	-1,450	0,040	0,691	1,000	4984	tags=47% list=22% signal=60%

Librería KEGG, 20 gene sets más enriquecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Nucleotide excision repair	42	0,473	1,694	0,043	0,488	0,202	8630	tags=57% list=39% signal=93%
DNA replication	34	0,542	1,599	0,000	0,693	0,514	4770	tags=41% list=21% signal=52%
NOTCH signaling pathway	46	0,314	1,523	0,070	0,826	0,795	7996	tags=48% list=36% signal=74%
Systemic lupus erythematosus	39	0,606	1,522	0,030	0,622	0,795	2243	tags=38% list=10% signal=43%
Leishmania infection	55	0,492	1,492	0,030	0,659	0,848	4882	tags=40% list=22% signal=51%
Ribosome	83	0,546	1,473	0,149	0,647	0,931	9248	tags=82% list=41% signal=139%
SNARE interactions in vesicular transport	36	0,397	1,466	0,074	0,599	0,956	3343	tags=28% list=15% signal=33%
Antigen processing and presentation	45	0,518	1,454	0,076	0,587	0,956	2796	tags=31% list=13% signal=35%
TOLL like receptor signaling pathway	92	0,451	1,452	0,045	0,539	0,956	4922	tags=36% list=22% signal=46%
Natural killer cell mediated cytotoxicity	101	0,478	1,435	0,000	0,548	0,956	2197	tags=23% list=10% signal=25%
ECM receptor interaction	78	0,463	1,418	0,035	0,547	0,956	5281	tags=45% list=24% signal=59%
Proteasome	43	0,317	1,416	0,000	0,510	0,956	9984	tags=65% list=45% signal=118%
NOD like receptor signaling pathway	52	0,439	1,408	0,058	0,489	0,956	4443	tags=33% list=20% signal=41%
Base excision repair	33	0,346	1,403	0,066	0,471	0,956	4770	tags=36% list=21% signal=46%
Mismatch repair	22	0,508	1,393	0,107	0,477	0,956	4770	tags=36% list=21% signal=46%
Aminoacyl trna biosynthesis	22	0,369	1,390	0,102	0,462	0,956	5155	tags=32% list=23% signal=41%
Fc gamma r mediated phagocytosis	92	0,415	1,385	0,126	0,444	0,956	2371	tags=21% list=11% signal=23%
Regulation of actin cytoskeleton	204	0,293	1,373	0,000	0,459	0,984	2716	tags=16% list=12% signal=18%

Focal adhesion	192	0,336	1,349	0,062	0,514	0,984	5413	tags=33% list=24% signal=43%
Pyruvate metabolism	37	0,324	1,349	0,031	0,489	0,984	5711	tags=35% list=26% signal=47%

Librería KEGG, 20 gene sets más empobrecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Basal cell carcinoma	54	-0,432	-1,512	0,064	1,000	0,813	5168	tags=37% list=23% signal=48%
Hedgehog signaling pathway	54	-0,400	-1,491	0,000	1,000	0,847	4920	tags=33% list=22% signal=43%
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	19	-0,463	-1,489	0,030	0,876	0,847	6928	tags=53% list=31% signal=76%
Vasopressin regulated water reabsorption	43	-0,338	-1,334	0,115	1,000	0,984	628	tags=7% list=3% signal=7%
Steroid hormone biosynthesis	32	-0,454	-1,268	0,075	1,000	0,984	4745	tags=34% list=21% signal=44%
Proximal tubule bicarbonate reclamation	19	-0,426	-1,243	0,129	1,000	1,000	3240	tags=26% list=15% signal=31%
Olfactory transduction	29	-0,442	-1,237	0,176	1,000	1,000	3303	tags=24% list=15% signal=28%
Glycosaminoglycan biosynthesis heparan sulfate	25	-0,422	-1,225	0,239	1,000	1,000	2706	tags=28% list=12% signal=32%
ABC transporters	39	-0,341	-1,213	0,090	1,000	1,000	8226	tags=59% list=37% signal=93%
Retinol metabolism	32	-0,355	-1,170	0,136	1,000	1,000	6876	tags=53% list=31% signal=77%
Arginine and proline metabolism	51	-0,278	-1,168	0,247	1,000	1,000	7142	tags=37% list=32% signal=55%
Butanoate metabolism	32	-0,327	-1,162	0,193	1,000	1,000	4631	tags=22% list=21% signal=28%
Neuroactive ligand receptor interaction	257	-0,350	-1,149	0,115	1,000	1,000	4208	tags=33% list=19% signal=40%
Axon guidance	124	-0,271	-1,139	0,220	1,000	1,000	2362	tags=13% list=11% signal=14%
Primary bile acid biosynthesis	15	-0,508	-1,136	0,362	1,000	1,000	4626	tags=53% list=21% signal=67%

Melanogenesis	98	-0,224	-1,127	0,218	1,000	1,000	5368	tags=22% list=24% signal=29%
Renin angiotensin system	15	-0,479	-1,122	0,354	1,000	1,000	4173	tags=40% list=19% signal=49%
Autoimmune thyroid disease	23	-0,364	-1,108	0,331	1,000	1,000	4424	tags=35% list=20% signal=43%
Glycosphingolipid biosynthesis lacto and neolacto series	21	-0,330	-1,099	0,397	1,000	1,000	8168	tags=52% list=37% signal=82%
Aldosterone regulated sodium reabsorption	40	-0,273	-1,097	0,265	0,975	1,000	3720	tags=23% list=17% signal=27%

HSA vs. Sham

Librería Molecular Function, 20 gene sets más enriquecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Ligase activity forming carbon oxygen bonds	22	0,456	1,781	0,000	0,668	0,338	3988	tags=27% list=18% signal=33%
Promoter specific chromatin binding	51	0,448	1,776	0,000	0,364	0,350	3816	tags=25% list=17% signal=31%
Damaged DNA binding	63	0,491	1,769	0,000	0,260	0,367	3955	tags=35% list=18% signal=42%
RNA polymerase II activating transcription factor binding	47	0,485	1,764	0,000	0,210	0,391	3759	tags=32% list=17% signal=38%
Activating transcription factor binding	73	0,419	1,757	0,000	0,182	0,407	4292	tags=27% list=19% signal=34%
Retinoid x receptor binding	16	0,590	1,713	0,022	0,241	0,577	972	tags=19% list=4% signal=20%
Retinoic acid receptor binding	23	0,501	1,708	0,028	0,222	0,589	972	tags=13% list=4% signal=14%
Oxidoreductase activity acting on metal ions	16	0,651	1,700	0,018	0,206	0,617	5692	tags=50% list=25% signal=67%
mRNA 5 utr binding	24	0,395	1,650	0,015	0,317	0,795	4378	tags=21% list=20% signal=26%
Calcium release channel activity	16	0,555	1,614	0,020	0,399	0,881	4817	tags=38% list=22% signal=48%
Rna polymerase II transcription factor binding	51	0,434	1,593	0,019	0,444	0,945	4602	tags=29% list=21% signal=37%
Poly pyrimidine tract binding	25	0,398	1,576	0,026	0,473	0,970	7873	tags=60% list=35% signal=93%
Signaling adaptor activity	66	0,443	1,562	0,016	0,488	0,971	2561	tags=29% list=11% signal=32%
Translation repressor activity	23	0,467	1,544	0,008	0,538	0,980	6153	tags=48% list=28% signal=66%
Endodeoxyribonuclease activity	33	0,510	1,542	0,043	0,512	0,980	3955	tags=30% list=18% signal=37%
Tetrapyrrole binding	101	0,423	1,535	0,000	0,503	0,989	4931	tags=36% list=22% signal=46%
Deoxyribonuclease activity	52	0,472	1,517	0,058	0,549	0,996	4766	tags=35% list=21% signal=44%

Exonuclease activity active with either ribo or deoxyribonucleic acids and producing 5 phosphomonoesters	57	0,373	1,516	0,063	0,524	0,996	7535	tags=54% list=34% signal=82%
SH2 domain binding	35	0,453	1,472	0,079	0,715	1,000	5136	tags=40% list=23% signal=52%
Peptidase activator activity involved in apoptotic process	15	0,546	1,468	0,099	0,700	1,000	5112	tags=40% list=23% signal=52%

Librería Molecular Function, 20 gene sets más empobrecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Acid amino acid ligase activity	18	-0,590	-1,666	0,014	1,000	0,786	3221	tags=33% list=14% signal=39%
Nuclear localization sequence binding	23	-0,474	-1,649	0,022	1,000	0,827	7587	tags=48% list=34% signal=72%
Microtubule motor activity	62	-0,464	-1,633	0,000	1,000	0,895	3233	tags=24% list=14% signal=28%
Protein phosphatase 2a binding	29	-0,527	-1,618	0,008	1,000	0,920	1006	tags=14% list=5% signal=14%
Triglyceride lipase activity	24	-0,626	-1,566	0,000	1,000	0,981	3443	tags=46% list=15% signal=54%
Carboxylic ester hydrolase activity	119	-0,411	-1,518	0,000	1,000	1,000	2928	tags=27% list=13% signal=31%
Structural constituent of nuclear pore	25	-0,401	-1,510	0,032	1,000	1,000	6987	tags=52% list=31% signal=76%
NAD ⁺ kinase activity	16	-0,529	-1,492	0,027	1,000	1,000	1316	tags=19% list=6% signal=20%
Apolipoprotein binding	16	-0,576	-1,485	0,034	1,000	1,000	1967	tags=31% list=9% signal=34%
Acidic amino acid transmembrane transporter activity	15	-0,742	-1,485	0,033	1,000	1,000	1165	tags=33% list=5% signal=35%
ATPase activator activity	23	-0,431	-1,479	0,088	1,000	1,000	5640	tags=39% list=25% signal=52%
Neurotransmitter receptor activity involved in regulation of postsynaptic membrane potential	47	-0,655	-1,470	0,000	1,000	1,000	3714	tags=51% list=17% signal=61%
Neuropeptide hormone activity	29	-0,624	-1,469	0,010	1,000	1,000	1308	tags=34% list=6% signal=37%

Postsynaptic neurotransmitter receptor activity	60	-0,634	-1,457	0,000	1,000	1,000	3714	tags=48% list=17% signal=58%
Motor activity	115	-0,348	-1,447	0,011	1,000	1,000	5756	tags=28% list=26% signal=37%
HSP90 protein binding	39	-0,408	-1,447	0,068	1,000	1,000	1022	tags=15% list=5% signal=16%
Translation elongation factor activity	16	-0,424	-1,444	0,008	1,000	1,000	4964	tags=31% list=22% signal=40%
Phosphatidylinositol monophosphate phosphatase activity	16	-0,432	-1,440	0,134	1,000	1,000	5212	tags=38% list=23% signal=49%
Hormone activity	103	-0,451	-1,423	0,000	1,000	1,000	2352	tags=26% list=11% signal=29%
Glutamate receptor activity	26	-0,683	-1,420	0,025	1,000	1,000	3209	tags=58% list=14% signal=67%

Librería KEGG, 20 gene sets más enriquecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Aminoacyl tRNA biosynthesis	22	0,550	2,020	0,000	0,019	0,010	4312	tags=41% list=19% signal=51%
Non small cell lung cancer	51	0,462	1,722	0,012	0,233	0,266	1189	tags=16% list=5% signal=17%
Base excision repair	33	0,497	1,659	0,027	0,276	0,405	3955	tags=36% list=18% signal=44%
Pancreatic cancer	67	0,349	1,620	0,025	0,323	0,535	1189	tags=10% list=5% signal=11%
Colorectal cancer	62	0,396	1,606	0,022	0,291	0,567	2162	tags=16% list=10% signal=18%
Endometrial cancer	52	0,369	1,572	0,052	0,325	0,656	1189	tags=12% list=5% signal=12%
DNA replication	34	0,503	1,548	0,037	0,338	0,718	4942	tags=41% list=22% signal=53%
Leishmania infection	55	0,466	1,541	0,044	0,318	0,763	4600	tags=33% list=21% signal=41%
Homologous recombination	24	0,446	1,541	0,010	0,286	0,763	3903	tags=25% list=17% signal=30%
B cell receptor signaling pathway	75	0,490	1,527	0,082	0,295	0,800	3326	tags=31% list=15% signal=36%
VEGF signaling pathway	75	0,360	1,475	0,022	0,404	0,899	1394	tags=13% list=6% signal=14%
Natural killer cell mediated cytotoxicity	101	0,473	1,466	0,079	0,396	0,905	3326	tags=33% list=15% signal=38%
Nucleotide excision repair	42	0,398	1,450	0,075	0,405	0,934	7937	tags=48% list=36% signal=74%
RNA degradation	53	0,341	1,433	0,106	0,427	0,957	7604	tags=40% list=34% signal=60%
Thyroid cancer	29	0,358	1,428	0,056	0,413	0,958	4951	tags=24% list=22% signal=31%
Systemic lupus erythematosus	39	0,519	1,427	0,061	0,392	0,958	6019	tags=51% list=27% signal=70%
T cell receptor signaling pathway	106	0,396	1,421	0,118	0,383	0,971	3883	tags=29% list=17% signal=35%
Ribosome	83	0,429	1,366	0,194	0,510	0,992	9030	tags=67% list=40% signal=113%

Lysosome	118	0,387	1,350	0,221	0,537	0,992	5103	tags=30% list=23% signal=38%
Porphyrin and chlorophyll metabolism	27	0,478	1,336	0,031	0,551	0,992	2444	tags=30% list=11% signal=33%

Librería KEGG, 20 gene sets más empobrecidos en HSA

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM <i>p</i> -val	FDR <i>q</i> -val	FWER <i>p</i> -val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
RIG I like receptor signaling pathway	58	-0,412	-1,508	0,029	1,000	0,826	5807	tags=34% list=26% signal=46%
Vasopressin regulated water reabsorption	43	-0,453	-1,463	0,033	1,000	0,912	6848	tags=35% list=31% signal=50%
Butanoate metabolism	32	-0,419	-1,444	0,050	1,000	0,946	2881	tags=22% list=13% signal=25%
Regulation of autophagy	25	-0,389	-1,437	0,020	0,970	0,954	708	tags=12% list=3% signal=12%
GAP junction	81	-0,348	-1,401	0,037	0,992	0,992	4012	tags=22% list=18% signal=27%
Steroid biosynthesis	16	-0,472	-1,392	0,072	0,866	0,992	7689	tags=56% list=34% signal=86%
Renin angiotensin system	15	-0,549	-1,384	0,090	0,777	0,996	2578	tags=27% list=12% signal=30%
Amyotrophic lateral sclerosis ALS	52	-0,358	-1,358	0,027	0,797	0,996	1539	tags=13% list=7% signal=14%
Alanine aspartate and glutamate metabolism	29	-0,375	-1,333	0,094	0,816	0,996	3964	tags=31% list=18% signal=38%
Proximal tubule bicarbonate reclamation	19	-0,474	-1,308	0,148	0,833	1,000	6637	tags=42% list=30% signal=60%
Arginine and proline metabolism	51	-0,329	-1,269	0,107	0,918	1,000	3964	tags=24% list=18% signal=29%
Olfactory transduction	29	-0,473	-1,267	0,135	0,851	1,000	2625	tags=24% list=12% signal=27%
Epithelial cell signaling in helicobacter pylori infection	67	-0,302	-1,255	0,142	0,840	1,000	6129	tags=33% list=27% signal=45%
Basal transcription factors	32	-0,299	-1,221	0,237	0,923	1,000	7020	tags=38% list=31% signal=55%
Cytosolic DNA sensing pathway	43	-0,387	-1,186	0,231	1,000	1,000	6030	tags=42% list=27% signal=57%

Neuroactive ligand receptor interaction	257	-0,394	-1,168	0,064	1,000	1,000	4013	tags=35% list=18% signal=42%
Tight junction	125	-0,245	-1,154	0,203	1,000	1,000	5337	tags=20% list=24% signal=26%
Autoimmune thyroid disease	23	-0,377	-1,151	0,225	0,992	1,000	4077	tags=35% list=18% signal=43%
Long term potentiation	67	-0,313	-1,141	0,299	0,980	1,000	3332	tags=16% list=15% signal=19%
PPAR signaling pathway	65	-0,326	-1,139	0,284	0,940	1,000	4761	tags=31% list=21% signal=39%