

## ABSTRACT

Brain stroke is a pathology characterised by a restriction in the availability of oxygen and nutrients due to poor blood flow. Depending on the cause, an occlusion or the rupture of a vessel, they are classified into ischemic and haemorrhagic, respectively. The core of the stroke is characterised by neuronal loss, while the immediately adjacent area, the penumbra, is represented by damaged alive cells. The physiological regeneration and plasticity of neurons in the penumbra is poor and slow. Therefore, it is important to develop strategies to promote the capability of regeneration and new synapsis establishment of these penumbra neurons. Axon repulsion cues activate Rho pathway avoiding axon outgrowth and, therefore, we propose using an inhibitor of ROCK to improve axonal elongation and regeneration.

In this work we have determined the best concentrations and treatment durations of the inhibitor Fasudil to primary neuronal culture of mouse neurons carrying out three assays. First, we tested different concentrations of Fasudil for 30 minutes to study axon growth cone structure. Second, we administrated the same concentrations for 24 hours and 48 hours to study axonal elongation. And third, we tested same concentrations for 24 hours in an *in vitro* model of axonal injury and regeneration.

We did not see significant results in the first assay by measuring the area and perimeter of the growth cones, however, this could be a consequence of its very dynamic nature. In the second and third assays we saw significant results measuring axonal length with p-values  $< 0.001$  with 50 and 100  $\mu\text{M}$  concentrations. However, 200  $\mu\text{M}$  seemed to be toxic and we stopped using this concentration.

In summary, Fasudil seems to effectively promote axon outgrowth in primary neuronal cultures after 24 and 48 hours and in the injury model after 24 hours with 50 and 100  $\mu\text{M}$  concentrations.

Keywords: Stroke, RhoA, ROCK, Fasudil, axon outgrowth, growth cone.

## RESUMEN

El accidente cerebrovascular es una patología caracterizada por la restricción de la disponibilidad de oxígeno y nutrientes debido a un flujo sanguíneo deficiente. Dependiendo de la causa, la oclusión o la rotura de un vaso, se clasifican en isquémico y hemorrágico respectivamente. El núcleo de la lesión se caracteriza por una pérdida de neuronas, mientras que, la zona inmediatamente adyacente, la penumbra, está representada por neuronas vivas dañadas. Por tanto, es importante desarrollar estrategias para promover la capacidad de regeneración y el establecimiento de nuevas sinapsis de las neuronas de la zona de penumbra. Las señales de repulsión axonal activan la vía de Rho evitando el crecimiento axonal y, de esta manera, proponemos el uso de un inhibidor de ROCK para mejorar la elongación y regeneración axonal.

En este trabajo hemos determinado las mejores concentraciones y duraciones del tratamiento del inhibidor Fasudil en cultivos primarios de neuronas de ratón llevando a cabo tres ensayos. Primero, hemos testado diferentes concentraciones de Fasudil durante 30 minutos para estudiar la estructura del cono de crecimiento axonal. En segundo lugar, hemos administrado esas mismas concentraciones durante 24 y 48 horas per a estudiar la elongación axonal. Y, en tercer lugar, hemos probado esas concentraciones durante 24 horas en un modelo *in vitro* de lesión y regeneración axonal.

En el primer ensayo no vimos resultados significativos midiendo el área y perímetro de los conos de crecimiento, no obstante, podría deberse a la naturaleza tan dinámica de dichas estructuras. En el segundo y tercer ensayos obtuvimos resultados significativos midiendo la longitud axonal con p-valores  $< 0.001$  con las concentraciones 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la concentración de 200  $\mu\text{M}$  parece resultar tóxica y dejamos de utilizarla.

En resumen, el inhibidor Fasudil parece promover eficazmente el crecimiento axonal en cultivos neuronales primarios tras 24 y 48 horas de tratamiento y tras 24 horas en el modelo de lesión con concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ .

Palabras clave: Accidente cerebrovascular, RhoA, ROCK, Fasudil, crecimiento axonal, cono de crecimiento.

## RESUM

L'accident cerebrovascular és una patologia caracteritzada per la restricció de la disponibilitat d'oxigen i nutrients degut a un flux sanguini deficient. Depenent de la causa, l'oclusió o la ruptura d'un vas, es classifiquen en isquèmic o hemorràgic. El nucli de la lesió es caracteritza per la pèrdua de neurones, mentre que, la zona immediatament adjacent, la penombra, està representada per neurones vives però danyades. Per tant, és important desenvolupar estratègies per a promoure la capacitat de regeneració i l'establiment de noves sinapsis de les neurones de la zona de penombra. Les senyals de repulsió axonal activen la via de Rho evitant el creixement axonal i, per això, proposem l'ús d'un inhibidor de ROCK per a millorar l'elongació i la regeneració axonal.

En aquest treball hem determinat les millors concentracions i durades de tractament de l'inhibidor Fasudil en cultius primaris de neurones de ratolí duent a terme tres assajos. En primer lloc, hem testat diferents concentracions de Fasudil durant 30 minuts per estudiar l'estructura del con de creixement axonal. Segon, hem administrat les mateixes concentracions durant 24 i 48 hores per a estudiar l'elongació axonal. I, en tercer lloc, hem provat eixes concentracions durant 24 hores en un model *in vitro* de lesió i regeneració axonal.

En el primer assaig no vam veure resultats significatius mesurant l'àrea i el perímetre dels cons de creixement, no obstant això, podria ser degut a la naturalesa tan dinàmica d'aquestes estructures. En el segon i tercer obtinguérem resultats significatius mesurant la llargària dels axons amb p-valors  $< 0.001$  amb les concentracions  $50 \mu\text{M}$  i  $100 \mu\text{M}$ . Però la concentració  $200 \mu\text{M}$  pareix resultar tòxica i deixàrem d'utilitzar-la.

En resum, l'inhibidor Fasudil pareix promoure eficaçment el creixement axonal en cultius neuronals primaris després de 24 i 48 hores de tractament i després de 24 hores en el model de lesió amb concentracions de  $50 \mu\text{M}$  i  $100 \mu\text{M}$ .

Paraules clau: Accident cerebrovascular, RhoA, ROCK, Fasudil, creixement axonal, con de creixement.