

## **EXPRESSIÓ GÈNICA EN MODELS D'ISQUÈMIA CEREBRAL**

ANNA M. PLANAS I ISIDRE FERRER<sup>1</sup>

*Departament de Farmacologia i Toxicologia. Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona. CSIC.*

*<sup>1</sup>Unitat de Neuropatologia. Servei d'Anatomia Patològica. Hospital Princeps d'Espanya. Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Departament de Farmacologia i Toxicologia. IIBB. CSIC. Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.

### **RESUM**

La isquèmia cerebral pot causar una lesió irreversible al cervell, amb una important pèrdua neuronal a les zones afectades. Entre els primers canvis que es detecten després de la isquèmia hi ha alteracions del patró d'expressió gènica. D'una forma molt ràpida s'indueix primer l'expressió dels denominats gens d'inducció immediata, com els protooncogens *c-fos* i *c-jun*, i després les proteïnes d'estrès, com la HSP-70. Algunes d'aquestes proteïnes induïbles poden interaccionar amb el DNA i poden actuar com a factors de transcripció modulant l'expressió d'altres gens de resposta més lenta. Aquest és un mecanisme d'amplificació del senyal que permet que la cèl·lula respongui als estímuls inicials i, com a resultat, sobrevisqui o mori després de l'agressió. A la isquèmia cerebral s'observen diferents patrons de mort neuronal segons la regió afectada i el tipus d'isquèmia (focal o global). Així, s'han descrit fenòmens de mort necròtica i també de mort de tipus apoptòtic. En aquest treball hem estudiat l'expressió de gens induïbles, els canvis en l'expressió de gens d'expressió constitutiva i la seva relació amb la mort o supervivència neuronal en diferents models d'isquèmia cerebral en rosegadors. La comprensió dels processos de senyalització intracel·lular en neurones sotmeses a l'agressió isquèmica pot portar llum a la qüestió de quins són els mecanismes subjacents a la mort neuronal.

## INTRODUCCIÓ

Els accidents cerebrovasculars (Toole, 1990) són una causa freqüent d'hospitalització i de mort en persones d'edat avançada. Aquests accidents poden produir alteracions cerebrals irreversibles que comporten la incapacitació permanent de les persones afectades. Un dels accidents cerebrovasculars més corrents és l'infart cerebral resultant d'una isquèmia. La isquèmia cerebral es pot produir per l'obstrucció de la circulació sanguínia en una zona específica (isquèmia focal) o bé en tot el cervell (isquèmia global). L'aturada de la circulació comporta la manca d'aportació d'oxigen i de glucosa que el teixit cerebral necessita constantment per funcionar. La isquèmia focal pot produir-se per la formació d'un coàgul en alguna artèria cerebral, i afecta la zona del cervell irrigada per aquesta artèria. En canvi, la isquèmia global pot donar-se després d'un infart de miocardi que impedeix que la sang arribi al cervell i, malgrat afectar tot el cervell, provoca lesió en les zones més vulnerables, com, per exemple, l'hipocamp.

En el cas de la isquèmia focal, la lesió ja es fa palesa a les 24 hores i progressa els dies següents. Durant aquest temps es desenvolupa l'infart, que com a conseqüència pot provocar alteracions en altres zones del cervell connectades amb les zones infartades que inicialment no han estat afectades per la isquèmia d'una forma directa. Així, a partir dels set dies després d'un infart cortical o estriatal s'observa lesió en el tàlem o en la substància negra ipsilaterals, respectivament (Soriano *et al.*, 1996). Pel que fa a la isquèmia global, la lesió només apareix a partir de quatre dies després, que és quan hi ha canvis histopatològics, sobretot a les neurones piramidals de la zona CA1 de l'hipocamp, i per això es parla d'un fenomen de mort neuronal retardada (Kirino i Sano, 1984; Hara *et al.*, 1993; Ferrer *et al.*, 1994).

La isquèmia provoca nombrosos canvis en el patró d'expressió gènica de les cèl·lules neurals afectades (Kogure i Kato, 1993). Així, gens que normalment no s'expressen (gens silenciosos) es troben fortament induïts, mentre que l'expressió constitutiva d'altres gens està alterada. Aquests primers efectes poden provocar un seguit de reaccions en cadena, amb les quals s'amplifica la resposta cel·lular inicial, i poden participar en els mecanismes de mort cel·lular. Així, per exemple, s'indueix l'expressió del que s'ha denominat grup de gens d'inducció immediata (IEG) (Herschman, 1991), com són els proto-oncogens *c-jun* i *c-fos* (Ann *et al.*, 1993; Soriano *et al.*, 1995; Takemoto *et al.*, 1995), que actuen com a factors de transcripció modulant l'expressió d'altres gens, i les proteïnes d'estrès del grup de les denominades «proteïnes de xoc de calor» com és la HSP-70 (Nowak, 1991; Li *et al.*, 1992; Kinouchi *et al.*, 1992; Soriano *et al.*, 1994a, 1995). A continuació examinarem l'expressió de mRNA i proteïnes, tant induïbles com constitutives, i la seva relació amb la mort cel·lular postisquèmica.

## MATERIALS I MÈTODES

Els experiments amb animals de laboratori s'han realitzat d'acord amb la normativa de l'Estat espanyol, que segueix les directrius dictades per la Unió Europea.

### *Isquèmia focal en la rata*

Hem utilitzat rates adultes mascles de la soca Sprague-Dawley de 280-350 g de pes corporal. Les rates s'han mantingut estabulades en condicions estàndards de temperatura i humitat ambientals, sota un cicle de 12 hores de llum / fosc, amb accés a menjar i aigua *ad libitum*. Tots els procediments



quirúrgics s'han efectuat sota anestèsia per halotà. S'ha realitzat oclusió d'una artèria cerebral mitjana ja sigui amb el mètode d'oclusió directe amb microclip (Tamura *et al.*, 1981), o bé amb el mètode intraluminal (Longa *et al.*, 1989), que consisteix a introduir un fil de niló per l'artèria caròtida interna fins al nivell de la ramificació de l'artèria cerebral mitjana. En qualsevol dels casos, l'oclusió s'ha fet permanent o bé s'ha procedit a la reperfusió del teixit al cap d'un cert temps d'oclusió.

Durant l'operació quirúrgica s'han mantingut els animals a 37 °C mitjançant un sistema de termoregulació, s'ha mesurat constantment la pressió arterial i s'han fet valoracions periòdiques dels gasos en sang així com del pH sanguini. Els animals que presentaven valors d'aquestes variables fora del rang fisiològic s'han descartat. Al temps convingut s'han sacrificat els animals sota anestèsia amb èter mitjançant perfusió intracardíaca amb paraformaldehid al 4%, o bé per decapitació. Els cervells s'han tallat amb vibratom per a l'estudi immunohistoquímic (Soriano *et al.*, 1994b); o bé s'han englobat amb parafina i s'han fet talls amb micròtom per a altres estudis immunohistoquímics o d'histologia, o per estudiar el marcatge *in situ* del DNA fragmentat amb la terminal transferasa (segons la tècnica de Gavrieli *et al.*, 1992); o bé s'han congelat i tallat en criòstat per a estudis d'hibridació *in situ*; o s'ha fet dissecció del teixit seguida de congelació, extracció de proteïnes que s'han separat en gel d'acrilamida i s'han transferit a membrana, o extracció de DNA per estudiar la fragmentació en gel d'agarosa.

Hem treballat en dues situacions d'isquèmia focal en funció de la durada de l'episodi isquèmic: 10 minuts (que no produeix canvis histopatològics aparents), o 1-2 hores (que produeix infart cerebral a l'escorça i a l'estriat).

### *Isquèmia global en el jerbu*

El jerbu és un rosegador més petit que la rata que s'ha utilitzat en aquest model d'isquèmia per una característica diferencial en l'anatomia de la circulació cerebral, que consisteix en el fet que el jerbu està desprovisat del cercle de Willis (Suzuki *et al.*, 1983), que tant la rata com els humans posseeixen (Toole, 1990). Això permet de produir isquèmia global en jerbu mitjançant l'oclusió de les artèries caròtides comunes. En la rata i en els humans, en canvi, el cercle de Willis permet la comunicació en el cervell de vasos derivats de les caròtides amb els vasos derivats de l'artèria basilar. Per això en la rata l'oclusió únicament de les caròtides comunes no permet de produir isquèmia global i, per aconseguir-ho, s'han d'adoptar altres estratègies com és l'oclusió prèvia de les artèries vertebrals o bé la caiguda de la pressió arterial que acompanyin l'oclusió de les caròtides comunes, amb la qual cosa el model es complica des del punt de vista tècnic. Vàrem treballar amb jerbus (*Meriones unguiculatus*) adults (3 mesos) (Tortosa i Ferrer, 1993; Ferrer *et al.*, 1994; Soriano *et al.*, 1994a) i també durant el desenvolupament postnatal (Soriano *et al.*, 1994a). S'ha realitzat oclusió transitòria de les caròtides comunes de 5 o 20 minuts. Els animals s'han sacrificat i el cervell s'ha processat com el de rata.

## RESULTATS

### La lesió isquèmica

#### *Isquèmia focal en la rata*

L'oclusió de l'artèria cerebral mitjana d'1 hora provoca edema en el cantó ipsilateral (García *et al.*, 1993), que fa que hi hagi un augment del volum regional de les zones

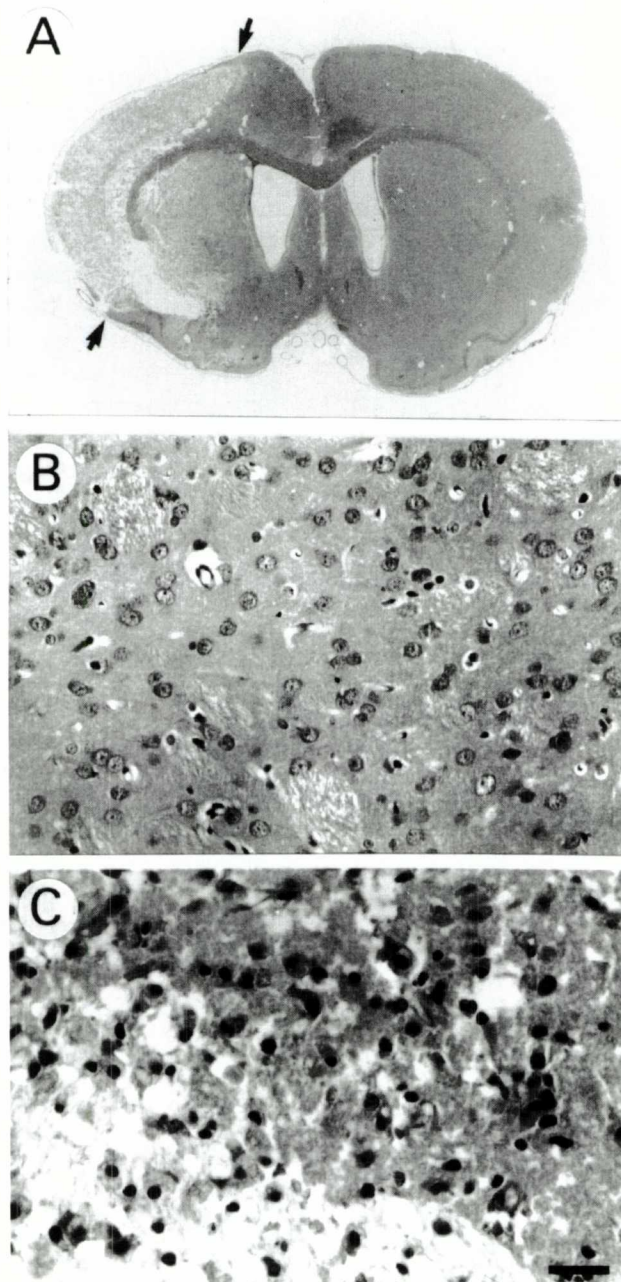


FIGURA 1. (A) Infart cerebral unilateral 7 dies després d'isquèmia focal transitòria en la rata. Tinció amb hematoxilina i eosina que mostra palidesa en l'escorça i l'estriat del cantó ipsilateral a l'oclusió de l'artèria cerebral mitjana (esquerra). Les fletxes indiquen l'extensió de l'infart en l'escorça. (B) Detall de l'estriat contralateral (dreta). (C) Estriat ipsilateral amb vacuolació, espongiòs i cèl·lules picnòtiques típiques d'un quadre de necrosi. Barra: (B), (C) = 50  $\mu$ m.

afectades i una disminució de la densitat cel·lular. L'edema comença a manifestar-se a les 2 hores de reperfusió, progressa fins a les 24-48 hores i després retrocedeix, de manera que als 7 dies ja s'ha reduït. Al llarg d'aquest temps el teixit desenvolupa infart (Tamura *et al.*, 1981; García *et al.*, 1993), que comporta l'aparició de cèl·lules picnòtiques, vacuolació i espongiosis típiques d'un quadre de necrosi (Figura 1). Després s'esdevé una important pèrdua neuronal que s'acompanya de proliferació de cèl·lules gials, tant d'astròglia com de micròglia. Aquestes darreres apareixen de manera molt abundant als 4 dies. Hem observat, però, que aquesta típica mort neuronal isquèmica per necrosi va precedida i acompanyada d'apoptosi. S'observen cèl·lules aïllades que presenten

morfologia apoptòtica (amb nuclis enconegits que mostren condensació extrema de la cromatina i la formació de cossos apoptòtics), d'acord amb altres observacions (Charriaut-Marlangue *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995). El DNA es fragmenta en trossos petits (fragments internucleosomals de 180-200 parells de bases) (Figura 2), d'acord amb altres autors (Linnik *et al.*, 1993; Tominaga *et al.*, 1993). A les 24 hores de reperfusió s'observa en gel de DNA un seguit de bandes en escala típic de mort per apoptosi (Figura 2B). Aquest patró precedeix la mort per necrosi, que als 4 dies dóna un patró de taca en gel de DNA com a conseqüència del trencament a l'atzar que comporta la formació desordenada de múltiples fragments de pesos moleculars variables (Figura 2C). Una situació similar en què

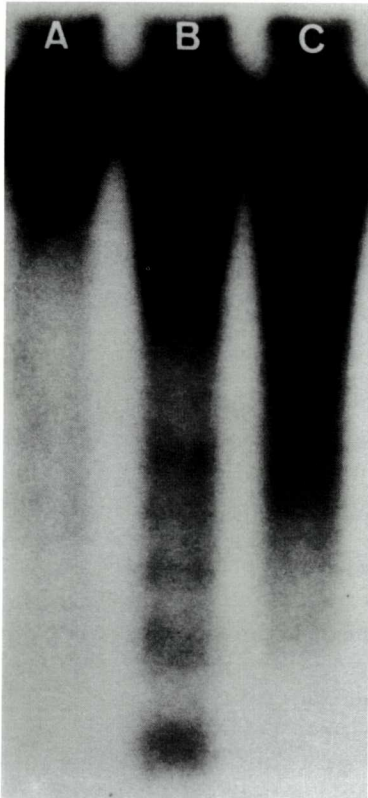


FIGURA 2. Gel d'agarosa de l'escorça i estriat control (A), a 1 dia (B) i a 4 dies (C), després d'una isquèmia focal transitòria en la rata. El senyal s'ha amplificat marcant el DNA amb  $P^{32}$ -ATP. En el carril (B) s'observa un patró de bandes en escala que indica fragmentació inter-nucleosomal del DNA típica d'apoptosi, mentre que en el carril (C) s'observa una taca produïda per la presència de múltiples fragments de DNA de pesos moleculars variables indicativa de necrosi.



es detecten patrons de necrosi i d'apoptosi s'ha observat en models experimentals d'excitotoxicitat (Ferrer *et al.*, 1995c). Amb la tècnica del marcatge *in situ* del DNA fragmentat (Gavrieli *et al.*, 1992) s'observen cèl·lules tenyides que durant les primeres hores de reperfusió apareixen d'una forma aïllada a la zona isquèmica, mentre que durant el dia següent es concentren a la perifèria del focus isquèmic. Val a dir que la tècnica del marcatge *in situ* del DNA fragmentat no és concloent per determinar la presència d'apoptosi, ja que s'ha vist que certs tipus de necrosi també poden esdevenir-se en un marcatge positiu (Charriaud-Marlangue i Ben-Ari, 1995; Thomas *et al.*, 1995). Així, també s'han descrit situacions de fraccionament internucleosomal del DNA acompanyat de característiques ultraestructurals de necrosi (Collins *et al.*, 1992), i situacions d'apoptosi que no van acompanyades de fragmentació internucleosomal del DNA, sinó de la formació de fragments d'elevat pes molecular (Pandey *et al.*, 1994; Kataoka *et al.*, 1995). De fet, ara hi ha evidències que indiquen que entre els conceptes clàssics de mort per apoptosi o per necrosi també es podrien produir situacions intermèdies amb algunes característiques de necrosi i d'altres d'apoptosi (Portera-Cailliau *et al.*, 1995).

#### *Isquèmia global en el jerbu*

Tal com hem esmentat anteriorment, la isquèmia global en el jerbu adult dóna lloc a un fenomen de mort retardada (Kirino i Sano, 1984; Hara *et al.*, 1993; Ferrer *et al.*, 1994), de manera que fins als 3-4 dies no s'observen canvis histopatològics aparents (Figura 3). Després s'observen alteracions en les neurones piramidals de la capa CA1 de l'hipocamp que presenten inflamament del citoplasma i condensació de la cromatina, que adquireix un aspecte de punts discrets i molt densos. Aquesta morfologia particular

(isquèmica), en què alteracions citoplasmàtiques van acompanyades de canvis en la cromatina nuclear, dóna un marcatge positiu amb la tècnica de marcatge *in situ* del DNA fragmentat (Figura 4A, B, C) i, a més a més, el gel de DNA dóna un patró en escala típic d'apoptosi (Figura 4D) (Ferrer *et al.*, 1994), d'acord amb altres observacions (Héron *et al.*, 1993; MacManus *et al.*, 1993). Aquests resultats donen suport a la hipòtesi que la distinció clàssica entre mort per necrosi i apoptosi podria no ser del tot precisa, ja que en determinades patologies apareixen fenòmens intermedis amb certes característiques morfològiques de necrosi acompanyades de característiques bioquímiques d'apoptosi (Ferrer *et al.*, 1995c; Portera-Cailliau *et al.*, 1995). La lesió produeix una important pèrdua neuronal a la capa CA1 de l'hipocamp, que als 15 dies va acompanyada de proliferació glial (Figura 3E). Altres zones afectades són l'escorça cerebral i el tàlem. També hem estudiat (Soriano *et al.*, 1994a) els efectes de la isquèmia global transitòria a l'hipocamp de jerbus de 7, 15, 21 i 30 dies de vida postnatal. No s'han observat alteracions histopatològiques en jerbus de 7 dies. Als 15 dies, es detecten cèl·lules picnòtiques a la base del cantó intern de la capa granular del cos dentat, mentre que als 30 dies les cèl·lules picnòtiques són molt abundants a la capa piramidal de la CA1 i, ocasionalment, a la base del cos dentat. Aquests resultats indiquen que durant el desenvolupament postnatal els rosegadors són menys sensibles a la isquèmia cerebral que els adults, d'acord amb altres observacions (Cherici *et al.*, 1991).

#### **Inducció de la proteïna d'estrès HSP-70**

##### *Generalitats*

Les proteïnes d'estrès del grup de les denominades «proteïnes de xoc de calor»

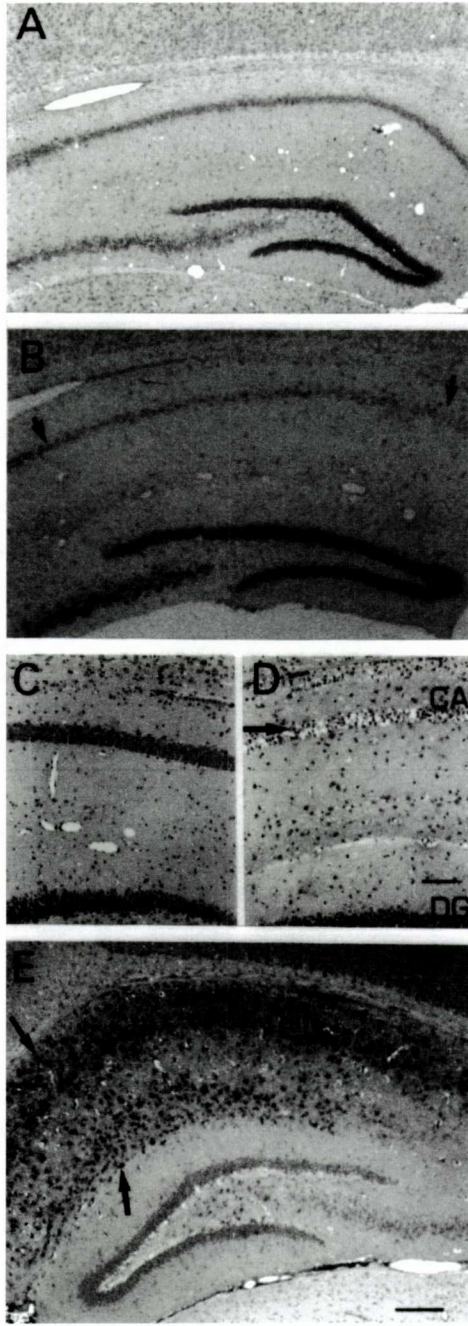


FIGURA 3. (A) Detall de l'hipocamp d'un jerbu control (A) i després de 4 dies d'isquèmia global transitòria (B). Les fletxes a (B) indiquen la zona de pèrdua neuronal a la capa CA1. Tincions amb hematoxilina i eosina. (C) i (D) són detalls de (A) i (B), respectivament. La fletxa a (D) mostra la lesió a la capa CA1 (CA). DG: cos dentat. (E) Immunohistoquímica per la GFAP que mostra la proliferació glial (fletxes) als 15 dies postisquèmia. Barra: (A), (B), (E) = 200  $\mu$ m; (C), (D) = 100  $\mu$ m.

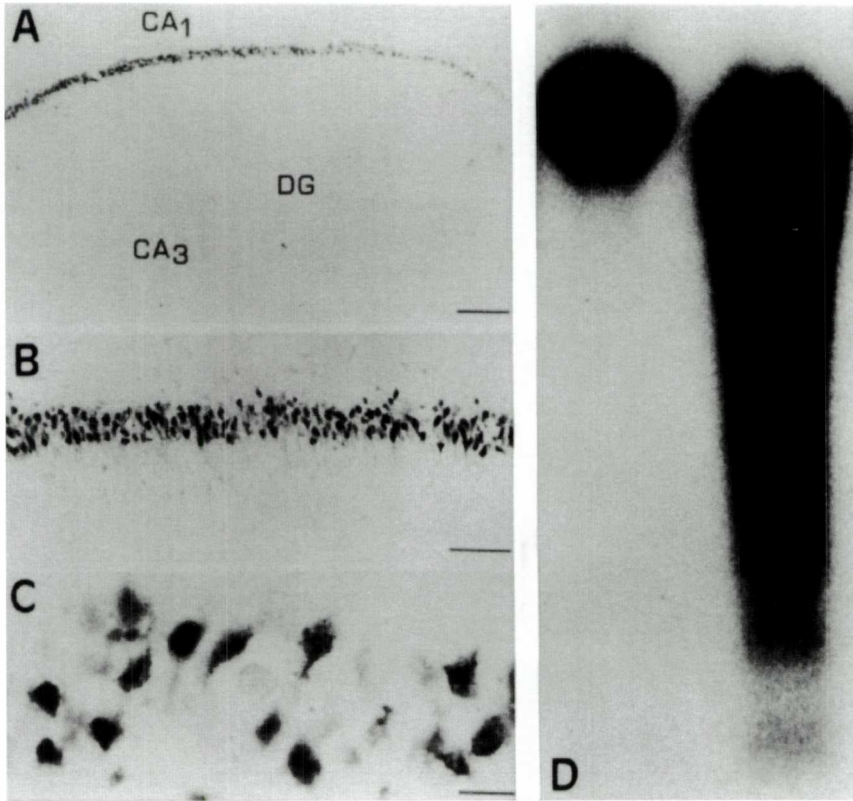


FIGURA 4. (A), (B) i (C) marcatge *in situ* del DNA fragmentat indicativa d'apoptosi en el jerbu als 4 dies després d'isquèmia global transitòria. CA1 i CA3: capes piramidals; DG: cos dentat. (D) Gel d'agarosa que mostra en el carril de l'esquerra el DNA de l'hipocamp d'un control, i al de la dreta el d'un jerbus als 4 dies postisquèmia (patró de bandes en escala). Barra: (A) = 200  $\mu$ m; (B) = 100  $\mu$ m; (C) = 10  $\mu$ m.

(HSP) s'inclouen en una família de proteïnes algunes de les quals s'expressen de forma constitutiva, mentre que d'altres, com és la de 72 kD (que per convenció denominarem HSP-70), són induïbles en el cervell (per a revisió, Planas *et al.*, 1997). La inducció pot ser deguda no només a un augment de la temperatura (Brown *et al.*, 1990), sinó també a altres tipus d'estrès cel·lular, com és l'administració d'agents excitadors (González *et al.*, 1989; Planas *et al.*, 1994, 1995a,b; Ferrer i Planas, 1995) i la isquèmia (Nowak, 1991; Simon *et al.*, 1991; Kinouchi *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Soriano *et al.*, 1994b, 1995), mentre que la HSP-70 no es detecta en el cervell

d'animals control. Les HSP tenen la funció d'estabilitzar altres proteïnes cel·lulars i intervenen en processos de plegament, assemblatge, secreció, degradació i transport a través de membranes d'altres proteïnes cel·lulars (Pelham, 1986; Gething i Sambrook, 1992; Morimoto, 1993a). Sembla que la presència de proteïnes anormals podria induir l'expressió de la HSP-70 (Rordorf *et al.*, 1991; Morimoto, 1993b). La funció, però, d'aquesta proteïna induïble després de la isquèmia cerebral encara és desconeguda. D'una banda, s'havia proposat que la HSP-70 podria ser un marcador de mort cel·lular (González *et al.*, 1989), mentre que de l'altra, hi ha



evidències que suggereixen que la HSP-70 ofereix protecció en situacions d'estrès (Morimoto, 1993b), fins i tot en cèl·lules neuronals (Rordorf *et al.*, 1991; Lowenstein *et al.*, 1991). Alguns dels nostres resultats (Soriano *et al.*, 1994a; Planas *et al.*, 1994, 1995a), i els d'altres investigadors (Sloviter i Lowenstein, 1992), han demostrat, però, que la inducció de HSP-70 és independent de la mort o supervivència cel·lular. Aquests resultats no estan en desacord amb la hipòtesi que la HSP-70 té un paper protector de la cèl·lula, però demostren que la HSP-70, si bé podria ser un element necessari per a la supervivència cel·lular en situacions d'estrès, no és pas un element suficient.

#### La HSP-70 en la isquèmia focal

La isquèmia focal induïx l'mRNA HSP-70, tant si l'episodi és letal per al teixit (1 hora o més) (Planas *et al.*, 1995c), com si no produeix dany aparent (10 minuts) (Soriano *et al.*, 1995). Aquesta inducció ja s'observa als 30 minuts després de la isquèmia, i augmenta fins a les 4 hores (Figura 5). La proteïna HSP-70, segons s'observa per immunohistoquímica (Figura 6A, B) i per *immunoblotting* (Figura 6C), es detecta a les 3 hores després de la isquèmia, augmenta fins a les 24 hores, i a partir de 4 dies disminueix. Tant l'mRNA com la proteïna només es troben en el cantó ipsilateral al d'oclusió de l'artèria

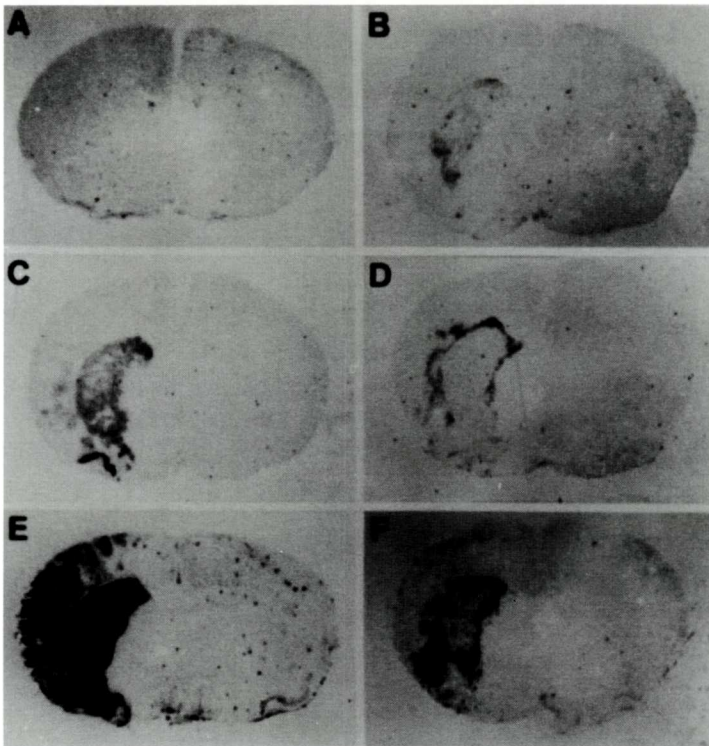


FIGURA 5. Hibridació *in situ* per l'mRNA de la HSP-70 en la isquèmia focal transitòria. Cervell de ratna control (A). Isquèmia de 10 minuts de durada i 2 hores (C) o 4 hores (E) de reperfusió. Isquèmia d'1 hora sense reperfusió (B), o 2 hores (D) o 4 hores (F) de reperfusió. El senyal s'incrementa amb el temps. A (F) s'observa la zona de penombra que envolta el focus de l'infart i presenta forta inducció de l'mRNA de la HSP-70.

cerebral mitjana (Figures 5 i 6) a les zones afectades per la isquèmia, que són l'escorça parietal i piriforme, i l'estriat. Els tipus cel·lulars que presenten inducció de HSP-70 inclouen neurones, cèl·lules glials, endoteli i cèl·lules perivasculars. Hem observat que es pot establir una gradació per la sensibilitat cel·lular a la isquèmia amb l'expressió de HSP-70, de manera que les cèl·lules més sensibles són les neurones, que expressen HSP-70 fins i tot en una situació d'isquèmia no letal, i després les cèl·lules glials i les endotelials, que són les més resistents a la isquèmia. Aquests resultats concorden amb estudis previs (Kinouchi *et al.*, 1992) en què s'ha descrit la presència de HSP-70 en cèl·lules

gials. Per esbrinar si les cèl·lules microglials podien expressar HSP-70, vàrem fer doble marcatge immunohistoquímic amb l'anticòs per la HSP-70 i un anticòs per un antigen específic de micròglia, el MRC OX-42. La immunoreactivitat de l'OX-42 colocalitza amb la de la HSP-70 en cèl·lules de la zona dorsolateral de l'estriat i al cos callós a les 3 hores postisquèmia, i també a la perifèria de la zona isquèmica a les 8 hores. Per tant, s'observa la presència de HSP-70 en cèl·lules microglials amb morfologia estel·lar. En conjunt, aquests resultats demostren que l'expressió de la HSP-70 no és un bon marcador de mort o supervivència cel·lular.

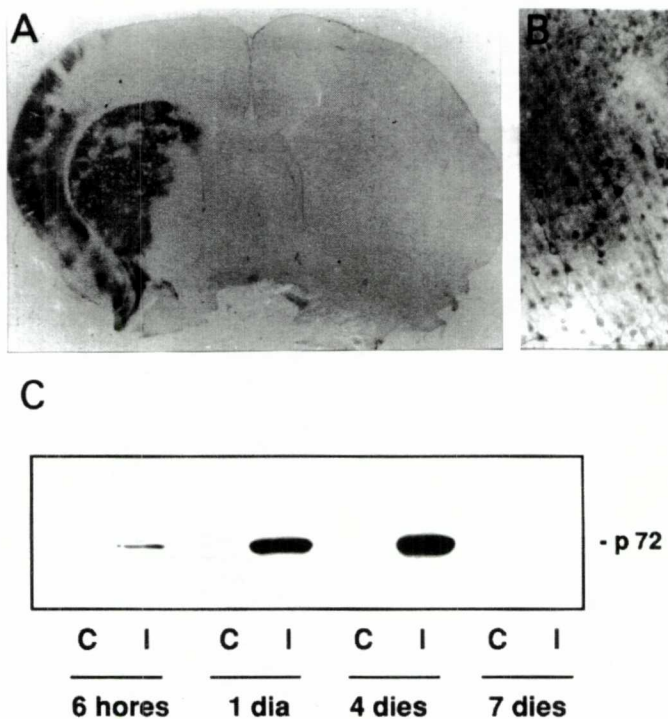


FIGURA 6. Inducció de la proteïna HSP-70 en la isquèmia focal transitòria, segons s'observa utilitzant un anticòs monoclonal (Oncogene) per immunohistoquímica a les 24 hores postisquèmia (A, B) i *immuno-blotting* a diferents temps postisquèmia (C). (B) és un detall de (A) on es mostra la presència de HSP-70 en neurones piramidals de la capa IV de l'escorça cerebral ipsilateral. (C) Inducció progressiva de HSP-70 des de les 6 hores fins als 4 dies. Als 7 dies gairebé no es detecta senyal. C = cantó contralateral; I = cantó ipsilateral (isquèmic). (-p72) indica el pes molecular de la proteïna.



### La HSP-70 en la isquèmia global

En el jerbu adult, l'mRNA HSP-70 es detecta per hibridació *in situ* en neurones piramidals de la capes CA1 i CA3 de l'hipocamp, i en neurones granulars del cos dentat a les 3 hores d'una isquèmia global de 20 minuts. Aquest patró regional d'inducció no es correspon amb les zones que presenten mort neuronal, ja que la zona afectada a nivell histopatològic és la capa CA1. La proteïna HSP-70 augmenta a partir de 48 hores postisquèmia a la CA3 i al cos dentat (Ferrer *et al.*, 1995b). Durant el desenvolupament postnatal (Soriano *et al.*, 1994a), l'mRNA HSP-70 no es detecta a les 3 hores postisquèmia, ni a P7 (dia postnatal 7) (Figura 7A,B), ni a P15 (Figura 7C, D), mentre que a P21 (Figura 7E, F) es troba al cos dentat i en menor grau a la capa CA1. Finalment, a P30 (Figura 7G, H), el patró és similar al dels adults. A les 24 hores postisquèmia, la proteïna HSP-70 es troba principalment al cos dentat a partir de P15, en menor grau també a la capa CA1 a partir de P21, i també a la CA3 a P30 i en adults (Figura 8). Per tant, no sembla haver-hi correlació entre la inducció de la HSP-70 i la vulnerabilitat regional a la isquèmia. Independentment, vàrem observar que a 7 i a 15 dies postisquèmia en adults la gran majoria de neurones de la CA1 són immunoreactives per la parvalbúmina, una proteïna lligadora de calci (Tortosa i Ferrer, 1993; Ferrer *et al.*, 1995b). En controls, les cèl·lules de l'hipocamp immunoreactives per la parvalbúmina són neurones no piramidals situades a la capa piramidal i l'*stratum oriens* de la CA1 i CA3, la capa granular del cos dentat i l'hil. Atès que les neurones que contenen parvalbúmina en l'hipocamp del jerbu són més resistents a la isquèmia global, vàrem estudiar la possibilitat que aquesta resistència fos dependent de l'expressió de HSP-70. El doble marcatge immunohistoquímic per la HSP-70 i la parvalbúmina va

mostrar (Ferrer *et al.*, 1995b) la presència de dues poblacions neuronals a la capa CA1: neurones piramidals amb HSP-70 i neurones no piramidals que tenen parvalbúmina però no HSP-70. Aquests resultats mostren que hi ha diferents llindars de sensibilitat i vulnerabilitat a la isquèmia per subpoblacions neuronals específiques.

### Inducció de *c-jun* i *c-fos*

#### Generalitats

Les proteïnes c-Fos i c-Jun estan molt poc expressades en el cervell d'animals control però són induïbles per diferents estímuls. La funció d'aquestes proteïnes està implicada en la regulació de la transcripció, ja que transporten senyals citoplasmàtics fins al nucli, on interaccionen amb el DNA (Morgan i Curran, 1991). Homodímers de proteïnes de la família Jun o bé heterodímers de membres de les famílies Jun i Fos s'uneixen als llocs AP-1 del DNA i regulen la transcripció d'altres gens de resposta més lenta (Marx, 1987). D'una banda, la inducció ràpida i transitòria de *c-fos* s'ha relacionat amb l'increment de l'activitat neuronal (Hunt *et al.*, 1987; Morgan i Curran, 1991). Tanmateix, l'expressió prolongada de *c-fos* s'ha associat amb mort per apoptosi (Smeyne *et al.*, 1993). D'una altra banda, l'expressió de *c-jun* també s'ha vist associada a fenòmens de mort per apoptosi (Dragunow i Preston, 1995). Així, per exemple, hem observat una intensa inducció de *c-jun* en la mort neuronal per apoptosi induïda per radiacions gamma (Ferrer *et al.*, 1995a, 1996) o bé per metilazoximetanol (MAM) (Ferrer *et al.*, 1997) en el cervell de la rata en desenvolupament. En altres situacions s'ha vist que l'expressió de *c-jun* era necessària per a l'apoptosi (Estus *et al.*, 1994; Schlingensiepen *et al.*, 1994; Ham *et al.*, 1995). Però c-Jun també s'ha vist implicat en situacions de regeneració (Haas *et al.*,



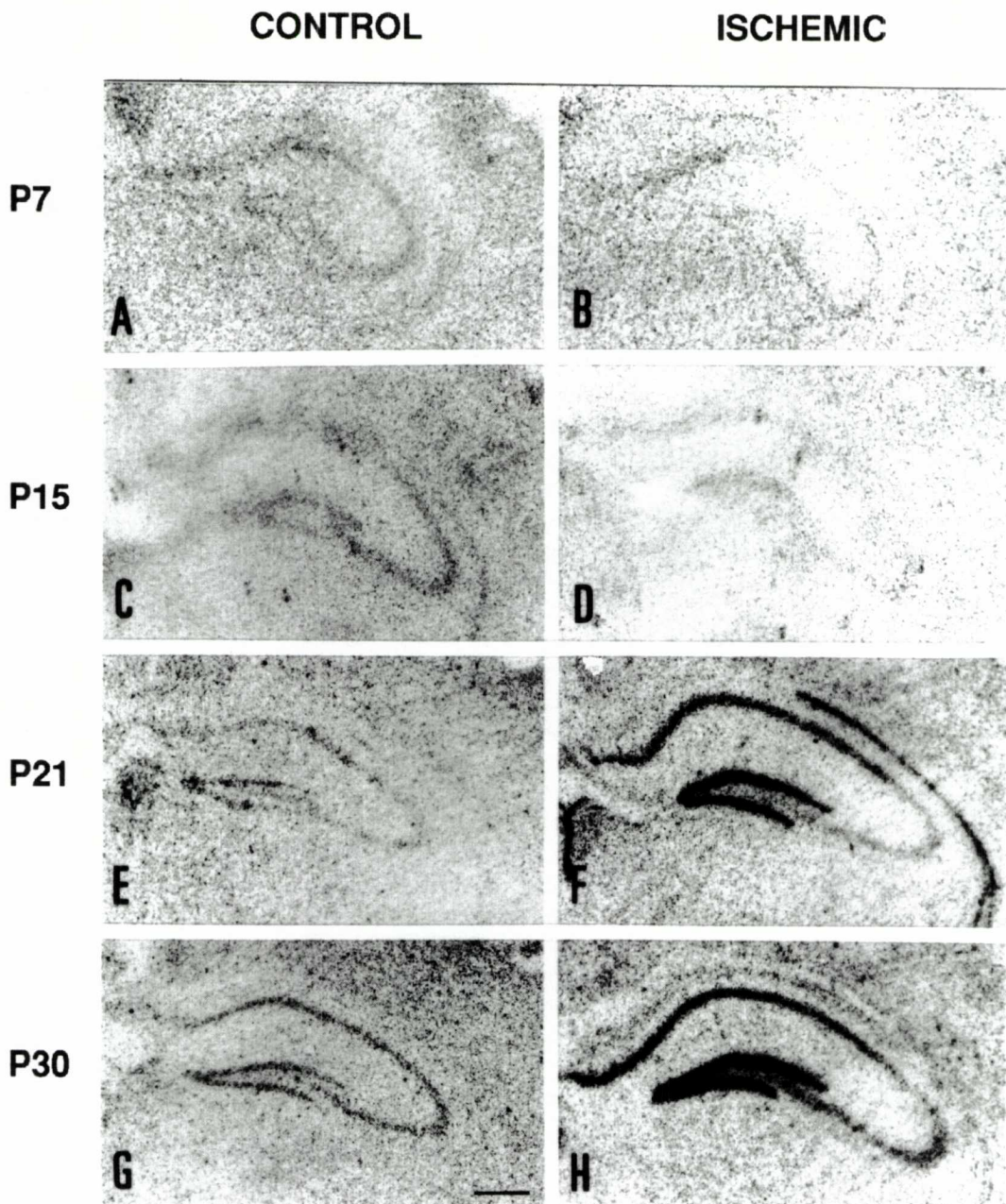


FIGURA 7. mRNA de la HSP-70 en l'hipocamp del jerbu a diferents temps durant el desenvolupament en controls (A, C, E, G), i a les 3 hores d'una isquèmia global transitòria (B, D, F, H). (P) indica el dia postnatal. S'observa inducció en el cos dentat i en les capes piramidals CA1 i CA3 després de la isquèmia als 21 i 30 dies. Barra = 500  $\mu$ m.

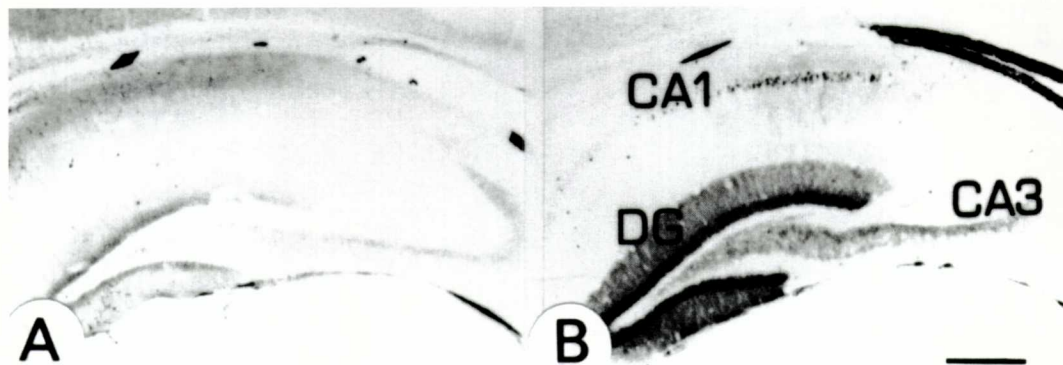


FIGURA 8. Immunohistoquímica per la HSP-70 (anticòs monoclonal d'Oncogene) a l'hipocamp de jerbu adult control (A) i a les 24 hores postisquèmia (B). CA1 i CA3: capes piramidals; DG: cos dentat. S'observa expressió de HSP-70 principalment al cos dentat i en menor grau a la CA3 i la CA1. Barra = 300 µm.

1996). La implicació de *c-Jun* en situacions tan diverses podria ser deguda a factors com la interacció de *c-Jun* amb altres proteïnes, el seu estat de fosforilació o la formació de complexos d'alt pes molecular que hem trobat associats a algunes situacions d'apoptosi induïdes en el cervell durant el desenvolupament (Ferrer *et al.*, 1997). El paper d'aquestes proteïnes en la isquèmia no és del tot clar. S'ha suggerit que la inducció de *c-jun* prèvia a la isquèmia confereix protecció enfront de la mort neuronal (Sommer *et al.*, 1995).

#### *c-fos* i *c-jun* en la isquèmia focal

Un episodi curt (10 minuts) d'isquèmia focal que no produeix mort neuronal provoca la inducció de *c-fos* (Soriano *et al.*, 1995a). Comparativament, la inducció de *c-fos* és més ràpida i molt més transitòria (Figura 9E, F) que la de *c-jun* (Figura 9B, C) i la de *hsp-70* (Figura 5C, E). El *c-fos* es dona en cèl·lules que sobreviuen a la isquèmia ja que no hem observat canvis histopatològics en aquest model d'isquèmia focal de 10 minuts. La isquèmia d'1 hora també causa inducció

transitòria de *c-fos*, i a més a més s'ha trobat *c-Fos* a les 24 hores (Kinouchi *et al.*, 1994). Això suggeriria que hi ha dues onades d'inducció de *c-fos* diferents (Smeyne *et al.*, 1994).

L'mRNA de *c-jun* també s'indueix després d'una isquèmia focal, tant d'1 hora com de 10 minuts (Figura 9B, C). Aquesta inducció abasta una extensió diferent a la de *c-fos*. Predominantment a l'escorça cerebral l'extensió de l'àrea d'inducció de *c-fos* és més gran que la de *c-jun* i la de *hsp-70*, de manera que s'observa inducció de *c-fos* en zones més allunyades del focus isquèmic, com, per exemple, l'escorça frontal. Això podria ser degut al que s'ha denominat «fenomen de propagació de la depressió», que consisteix en la propagació d'una onada de despolarització des de la zona isquèmica cap a les regions veïnes. Com a conseqüència d'això té lloc un augment de l'activitat neuronal (Kinouchi *et al.*, 1994; Uemura *et al.*, 1991). En conjunt, aquests resultats indiquen que la inducció ràpida de *c-jun* i *c-fos* tampoc no és un bon marcador de la mort cel·lular. Amb tot, hem observat la presència de *c-Jun* en cèl·lules de zones corticals (al límit de



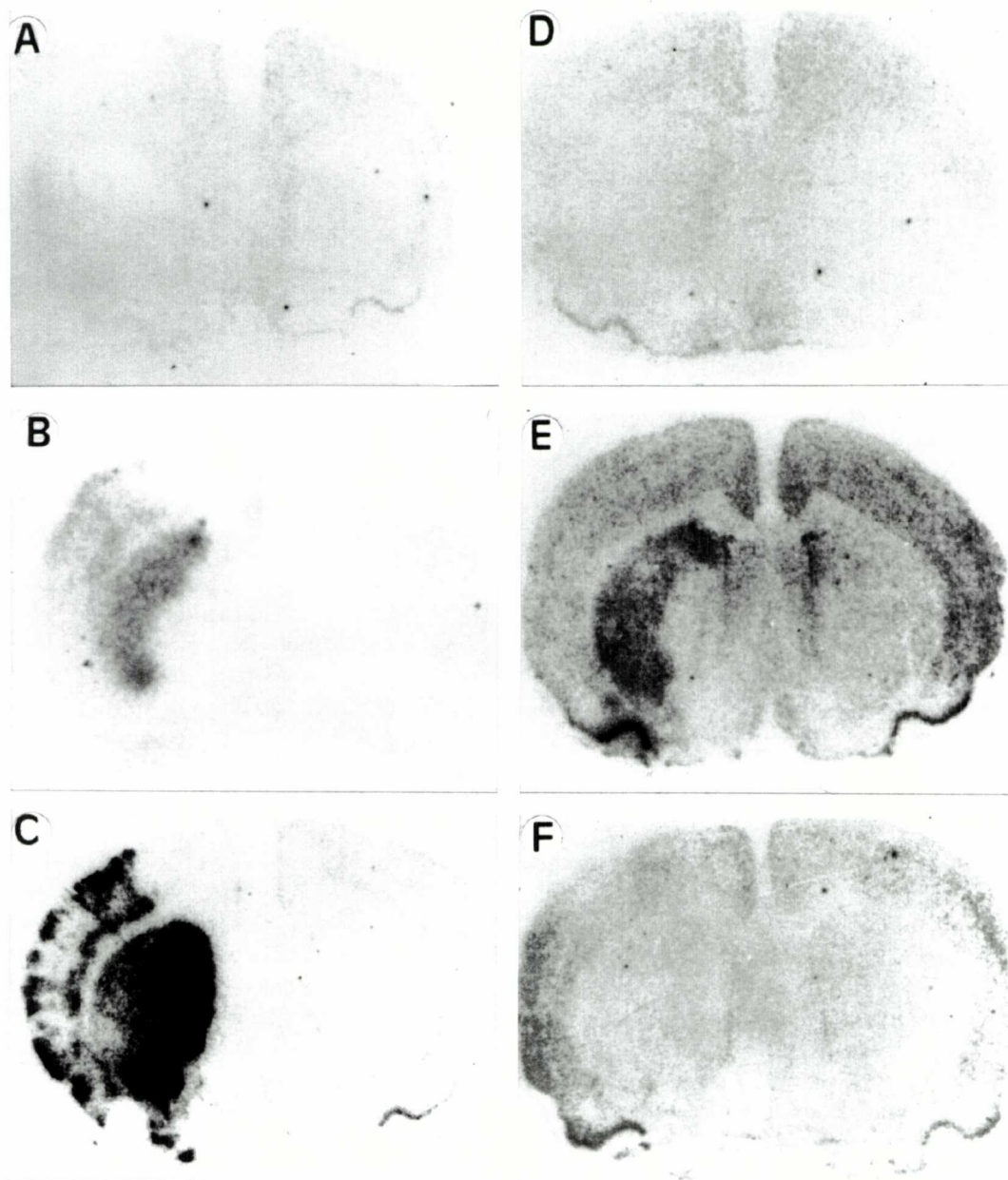


FIGURA 9. Hibridació *in situ* pels mRNA de *c-jun* (A, B, C) i de *c-fos* (D, E, F) en rates control (A, D), a 1 hora (B, E), i a 4 hores (C, F) després d'una isquèmia focal de 10 minuts. El senyal de *c-fos* apareix i desapareix abans que el de *c-jun*, per això *c-fos* sembla que, comparativament, tingui un caràcter més transitori.



l'escorça parietal i frontal), que envolten el nucli isquèmic a les 24 hores. Aquestes cèl·lules presenten morfologia apoptòtica.

#### *Expressió de c-jun en el tàlem*

L'infart cortical provoca la degeneració i pèrdua cel·lular en el tàlem del cantó ipsilateral a la isquèmia que s'observa als 7 i als 14 dies després d'1 hora d'oclusió de l'artèria cerebral mitjana (Figura 10) (Soriano *et al.*, 1996). Aquesta lesió va acompanyada de proliferació glial (Figura 10A). Hem observat que la mort per necrosi va acompanyada de la presència de cèl·lules aïllades que presenten morfologia apoptòtica (Figura 10B, C) i que es tenyeixen amb la tècnica de marcatge *in situ* del DNA fragmentat (Figura 10G, H). Moltes d'aquestes cèl·lules apoptòtiques són immunoreactives per c-Jun (Figura 10D, E, F), fet que suggereix que c-Jun podria estar implicat en l'apoptosi que contribueix a la degeneració talàmica després de l'infart cortical.

#### *c-fos i c-jun en la isquèmia global*

Les proteïnes c-Fos i c-Jun es detecten poques hores (2-8 hores) després de una isquèmia de 5 minuts en el jerbu (Uemura *et al.*, 1991). Tal com s'observava per a la HSP-70, el c-Fos i el c-Jun es troben principalment al cos dentat i a la CA3, mentre que són molt minoritaris o absents a la CA1 (Takemoto *et al.*, 1995), que és la zona de l'hipocamp més vulnerable a la isquèmia. Aquests resultats suggereixen que la inducció de *c-fos* i *c-jun* té lloc poc després de la isquèmia en cèl·lules que sobreviuran (Takemoto *et al.*, 1995). En un model d'hipòxia-isquèmia en la rata, s'observa l'expressió de *c-jun* a la CA1 i CA3 a les 24 hores (Dragunow *et al.*, 1993). Durant el desenvolupament postnatal en la rata, l'hipòxia-isquèmia també induïx l'expressió transitòria de *c-jun* i *c-fos* que es troben tant

en regions del cervell que són vulnerables a la isquèmia, com en regions que no ho són (Munell *et al.*, 1994). La inducció de *c-fos* i *c-jun* podria estar implicada en l'adaptació de les cèl·lules a una situació metabòlica diferent, i en la concessió d'una certa plasticitat amb què les cèl·lules poguessin integrar una xarxa de comunicació neural diferent durant el període postisquèmic.

#### **Alteracions en l'expressió de mRNA constitutius**

En el model d'isquèmia focal en rata hem estudiat l'expressió de una sèrie de mRNA constitutius que codifiquen per proteïnes essencials per al funcionament i supervivència cel·lulars. Així, hem estudiat per hibridació *in situ* els mRNA de la  $\beta$ -actina, calmodulina i el factor d'elongació II (EF-2). La  $\beta$ -actina és una proteïna del citoesquelet àmpliament distribuïda que està implicada en diverses funcions cel·lulars, com, per exemple, la transmissió sinàptica (Matus *et al.*, 1982); la calmodulina és una proteïna lligadora de calci molt abundant que és fonamental per a la regulació de l'activitat enzimàtica i que participa en nombrosos processos neuronals (Barrón *et al.*, 1995); i l'EF-2 és un factor necessari per a l'elongació de les cadenes proteïques en formació, ja que participa en la translocació dels peptidil-tRNA en els ribosomes de les cèl·lules eucariotes (Weissbach *et al.*, 1976). Les rates sotmeses a una hora d'oclusió de l'artèria cerebral mitjana presenten un senyal d'hibridació *in situ* per l'mRNA de la calmodulina,  $\beta$ -actina (Figura 11) i EF-2 més baixa en el cantó ipsilateral comparat amb el contralateral. Aquesta disminució ja s'observa immediatament després de la isquèmia, i també al cap de 30 minuts, 2 hores i 4 hores de reperfusió. Les rates sotmeses a 10 minuts d'oclusió i també les rates control no presen-

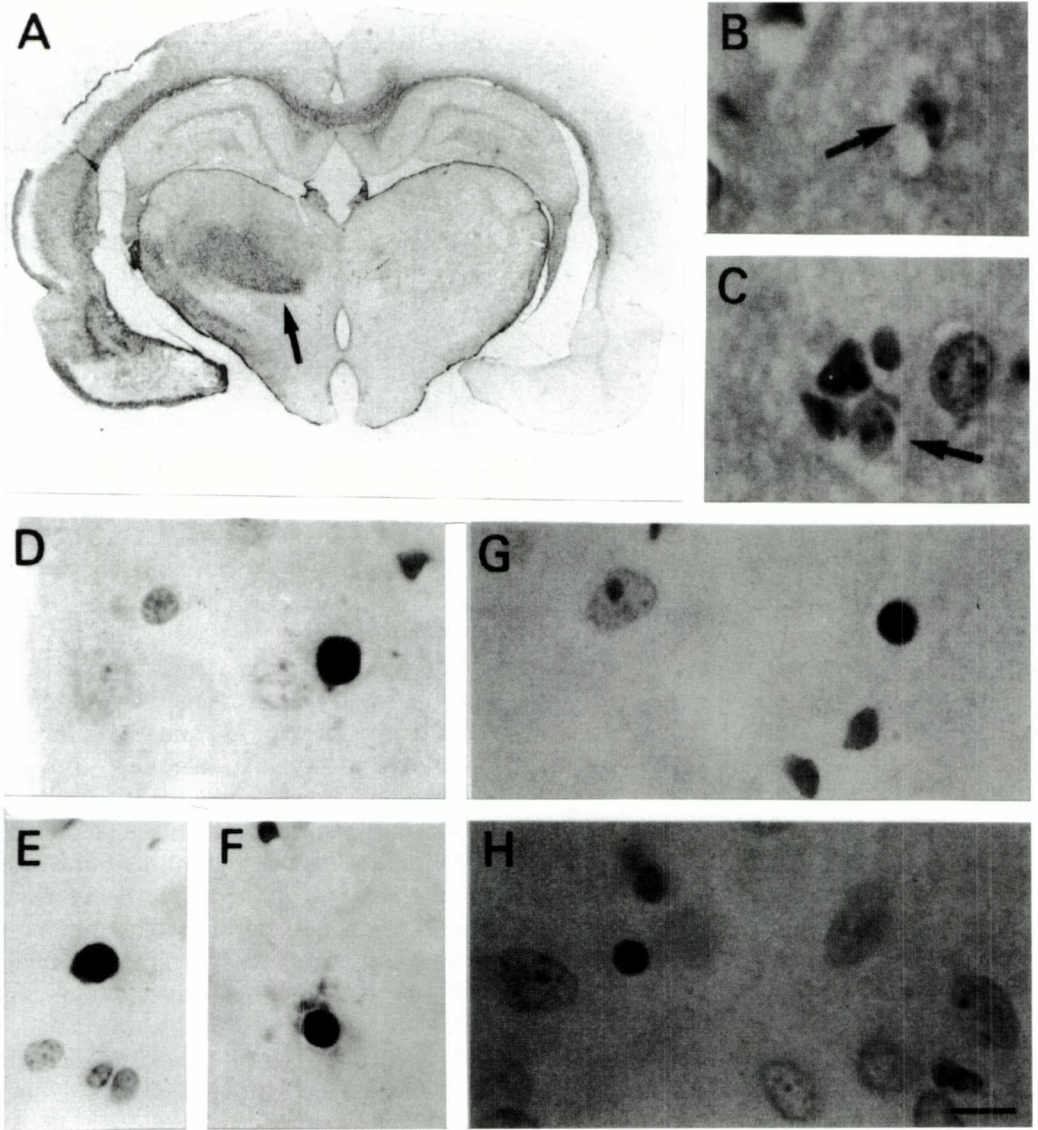


FIGURA 10. Alteracions talàmiques en rata als 7 dies d'una isquèmia focal d'1 hora que ha produït infart cortical. (A) Immunohistoquímica per la GFAP que mostra (fletxa) la proliferació glial en el tàlem ipsilateral. (B, C, D, E, F, G, H) Detalls del tàlem ipsilateral. (B, C) Hematoxilina i eosina que mostren (fletxes) cèl·lules amb morfologia apoptòtica (condensació de la cromatina i cossos apoptòtics). (D, E, F) Immunohistoquímica per c-Jun que mostra cèl·lules aïllades immunoreactives. (G, H) Marcatge *in situ* del DNA fragmentat que mostra els nuclis tenyits de cèl·lules aïllades. Barra = 20 µm.



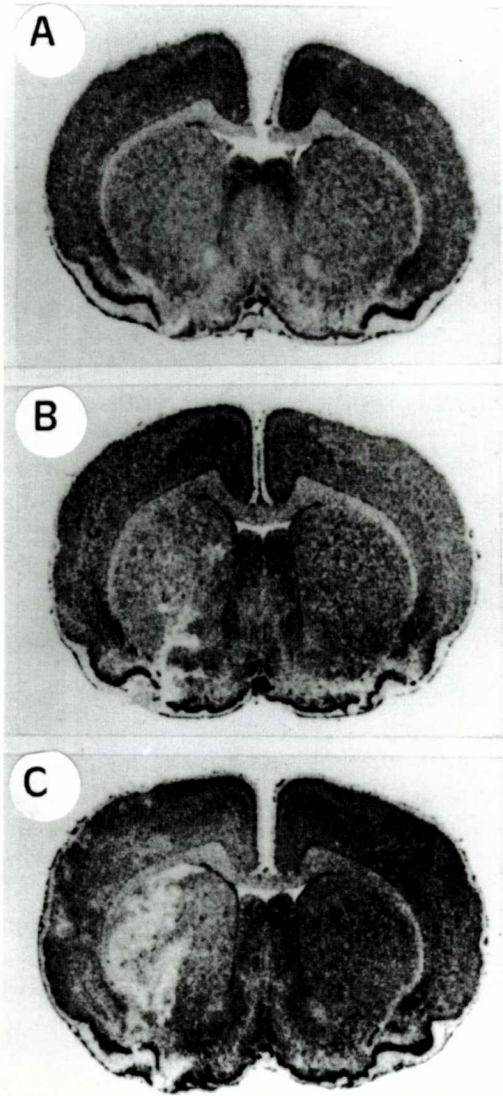


FIGURA 11. Hibridació *in situ* amb una sonda específica per l'mRNA de la  $\beta$ -actina en la rata. (A) Control. (B, C) Isquèmia focal transitòria d'1 hora, i 30 minuts (B) o 4 hores (C) de reperfusió. El senyal disminueix en el cantó isquèmic (esquerre).

ten canvis en el senyal d'hibridació *in situ* en el cantó ipsilateral comparat amb el contralateral. Es va mesurar la densitat òptica del senyal d'hibridació *in situ* en l'estriat ipsilateral i el contralateral, i la relació entre aquestes dues mesures es va calcular per a cada rata. Aquesta relació és igual a la unitat en rates control i rates sotmeses a 10 minuts d'isquèmia, atès que les densitats òptiques a les bandes ipsilateral i contralateral són idèntiques. En canvi, després d'1 hora d'isquèmia la relació de densitats òptiques és inferior a la unitat, atès que el valor de densitat òptica del cantó ipsilateral és significativament més baix que el del cantó contralateral. Per a l'mRNA de l'EF-2, el valor mitjà ( $\pm$ error estàndard) de la relació entre les densitats òptiques del cantó ipsilateral *versus* el contralateral immediatament després de l'oclusió, o bé després de 30 minuts, 2 hores o 4 hores de reperfusió, ( $0,761 \pm 0,13$ ;  $0,673 \pm 0,06$ ;  $0,631 \pm 0,17$ ;  $0,278 \pm 0,09$ , respectivament) és significativament menor ( $p < 0,005$ ) al valor mitjà de les rates control ( $0,987 \pm 0,01$ ) i de les rates sotmeses a 10 minuts d'isquèmia i a 1-2 hores de reperfusió ( $0,954 \pm 0,03$ ).

Aquests resultats demostren que un episodi sever d'isquèmia focal que més endavant pugui causar pèrdua cel·lular comporta la disminució de l'expressió de certs mRNA constitutius que codifiquen per proteïnes essencials per al funcionament i la supervivència cel·lular. En canvi, quan l'episodi d'isquèmia és suficientment curt per no causar lesió histològica, llavors no s'observa alteració d'aquests mRNA. La disminució del senyal en el cantó ipsilateral és indicativa del fet que ha disminuït la transcripció dels gens corresponents, però alternativament també podria explicar-se per un augment de la degradació de l'mRNA. Resultats similars s'han obtingut per la  $\beta$ -actina en la isquèmia global en jerbu (Kumar *et al.*, 1995), i s'ha suggerit que les proteïnes del citoesquelet podrien tenir un paper en la gene-



ració de la lesió isquèmica. A més, la disminució dels mRNA de la calmodulina i l'EF-2 suggereix que mecanismes relacionats amb el tamponament de calci i la traducció podrien estar-hi implicats. S'ha descrit que els nivells d'altres mRNA constitutius disminueixen després de la isquèmia (Maruno *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1993, 1995). Per tant, la disminució ràpida de certs mRNA constitutius pot servir de marcador de dany histopatològic abans que aquest dany es manifesti.

## DISCUSSIÓ

La isquèmia cerebral causa múltiples alteracions en el patró d'expressió gènica. Hem vist que no s'ha pogut establir una correlació entre l'expressió de gens induïbles i la pèrdua cel·lular que esdevé més tard. Però, en canvi, alteracions del patró d'expressió de mRNA constitutius podrien ser indicatives de dany cel·lular irreversible abans que aquest dany es manifesti. La presència de HSP-70 en una cèl·lula determinada indica que ha estat afectada per la isquèmia, però no necessàriament que hagi de morir com a resultat d'aquesta afectació. La presència d'aquesta proteïna es dona en cèl·lules que encara són viables i, per tant, que es poden sotmetre a tractaments farmacològics que puguin prevenir la pèrdua neuronal progressiva durant el desenvolupament de l'infart cerebral. Pel que fa a *c-fos*, no hem pogut trobar cap relació entre l'expressió de l'mRNA, o de la proteïna, i la mort neuronal. En canvi, el que sí que hem vist és que podria haver-hi una estreta relació entre la inducció de *c-fos* i l'activació neuronal, d'acord amb altres observacions (Morgan i Curran, 1991). Tanmateix hem detectat la proteïna c-Jun en cèl·lules amb morfologia apoptòtica i en situacions de fragmentació internucleosomal del DNA. Això suggereix que la isquèmia podria produir apoptosi dependent de

c-Jun (Soriano *et al.*, 1996), segons algunes hipòtesis en altres situacions (Estus *et al.*, 1994; Schlingensiepen *et al.*, 1994; Ham *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1995).

El mecanisme responsable dels canvis en l'expressió gènica que s'observen després de la isquèmia cerebral, així com el paper que té cadascun d'ells tant en la regulació o alteració de l'activitat cel·lular com en la mort cel·lular, encara es desconeix. Les cèl·lules tenen un nombre limitat de respostes immediates a una gran varietat de lesions diferents, i per això es troben canvis similars en un espectre ampli d'alteracions de l'entorn cel·lular. Esbrinar quins d'aquests canvis són crucials per al futur de la cèl·lula podria obrir un potencial terapèutic amb vista a una possible aplicació en el tractament de la isquèmia cerebral.

## AGRAÏMENTS

Aquest treball s'ha dut a terme amb suports del FIS (96/2187 i 97/0490) i de la CICYT (SAF 94-0076). M. A. Soriano (becari del MEC) ha elaborat la seva tesi doctoral en el marc d'aquest projecte d'investigació i ha contribuït a la realització dels treballs, com també hi han contribuït el Dr. A. Macaya i la Dra. A. Tortosa. També s'agraeix el suport del Dr. E. Rodríguez Farré i la col·laboració de R. Blanco.

## BIBLIOGRAFIA

- AN, G.; T.-N. LIN; J.-S. LIU; J.-J. XUE.; Y.-Y. HE; C.Y. HSU (1993). «Expression of *c-fos* and *c-jun* family genes after focal cerebral ischemia». *Ann. Neurol.*, núm. 33, pàg. 457-464.
- BARRÓN, S.; J. M. TUSELL; J. SERRATOSA (1995). «Effect of hexachlorocyclohexane isomers on calmodulin mRNA expression in the central nervous system». *Mol. Brain Res.*, núm. 30, pàg. 279-286.
- BROWN, I. R. (1990). «Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia

- and other traumatic events: a current perspective». *J. Neurosci. Res.*, núm. 27, pàg. 247-255.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; Y. BEN-ARI (1995). «A cautionary note on the use of TUNEL stain to determine apoptosis». *NeuroReport*, núm. 7, pàg. 61-64.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; I. MARGAILL; M. PLOTKINE; Y. BEN-ARI (1995). «Early endonuclease activation following reversible focal ischemia in the rat brain». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, núm. 15, pàg. 385-388.
- CHERICI, G.; M. ALESIANI; D. E. PELLEGRINI-GIAMPETRO; F. MORONI (1991). «Ischemia does not induce the release of excitotoxic amino acids from the hippocampus of the newborn rat». *Dev. Brain Res.*, núm. 60, pàg. 235-240.
- COLLINS, R. J.; B. V. HARMON; G. C. GOBÉ; J. F. R. KERR (1992). «Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterium for identifying apoptosis». *Int. J. Radiat. Biol.*, núm. 61, pàg. 451-453.
- DRAGUNOW, M.; K. PRESTON (1995). «The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death». *Brain Res. Rev.*, núm. 21, pàg. 1-28.
- DRAGUNOW, M.; D. YOUNG; P. HUGHES; G. MACGIBBON; P. LAWLOR; K. SINGLETON; E. SIRIMANNE; E. BEILHARZ; P. GLUCKMAN (1993). «Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury?». *Mol. Brain Res.*, núm. 18, pàg. 347-352.
- ESTUS, S.; W. J. ZAKS; R. S. FREEMAN; M. GRUDA; R. BRAVO; E. M. JOHNSON JR. (1994). «Altered gene expression in neurons during programmed cell death: Identification of *c-jun* as necessary for neuronal apoptosis». *J. Cell. Biol.*, núm. 127, pàg. 1717-1727.
- FERRER, I.; S. BARRÓN; E. RODRÍGUEZ FARRÉ; A. M. PLANAS (1995a). «Ionizing radiation-induced apoptosis is associated with c-Jun expression and c-Jun/AP-1 activation in the developing cerebellum of the rat». *Neurosci. Lett.*, núm. 202, pàg. 105-108.
- FERRER, I.; F. MARTÍN; T. SERRANO; J. REIRIZ; E. PÉREZ-NAVARRO; J. ALBERCH; A. MACAYA; A. M. PLANAS (1995c). «Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins». *Acta Neuropathol.*, núm. 90, pàg. 504-510.
- FERRER, I.; M. OLIVÉ; J. RIBERA; A. M. PLANAS (1996). «Naturally occurring (programmed) and radiation-induced apoptosis are associated with selective c-Jun expression in the developing rat brain». *Eur. J. Neurosci.*, núm. 8, pàg. 1286-1298.
- FERRER, I.; A. M. PLANAS (1995). «Induction of heat-shock protein-70 messenger RNA and protein following systemic kainic acid injection in the rat: evidence of protein axonal transport». *Neuroscience*, núm. 69, pàg. 1111-1118.
- FERRER, I.; E. POZAS; M. MARTI; R. BLANCO; A. M. PLANAS (1997). «Methylazoxymethanol acetate-induced apoptosis in the external granule cell layer of the developing cerebellum of the rat is associated with strong c-Jun expression and formation of high molecular weight c-Jun complexes». *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, núm. 56, pàg. 1-9.
- FERRER, I.; M. A. SORIANO; A. VIDAL; A. M. PLANAS (1995b). «Survival of parvalbumin-immunoreactive neurons in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia does not depend on HSP-70 protein induction». *Brain Res.*, núm. 692, pàg. 41-46.
- FERRER, I.; A. TORTOSA; A. MACAYA; A. SIERRA; D. MORENO; F. MUNELL; R. BLANCO; W. SQUIER (1994). «Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil». *Brain Pathol.*, núm. 4, pàg. 115-122.
- GARCÍA, J. H.; Y. YOSHIDA; H. CHEN; Y. LI; Z. G. ZHANG; J. LIAN; S. CHEN; M. CHOPP (1993). «Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat». *Am. J. Pathol.*, núm. 142, pàg. 623-635.
- GAVRIELI, Y.; Y. SHERMAN; S. A. BEN-SASSON (1992). «Identification of programmed cell death in focal cerebral ischemia *in situ* via specific labeling of DNA nuclear fragmentation». *J. Cell. Biol.*, núm. 119, pàg. 493-501.
- GETHING, M. J.; J. SAMBROOK (1992). «Protein folding in the cell». *Nature*, núm. 355, pàg. 33-45.
- GONZÁLEZ, M. F.; K. SHIRAIISHI; K. HISANAGA; S. M. SAGAR; M. MANDABACH; F. R. SHARP (1989). «Heat shock proteins as markers of neuronal injury». *Mol. Brain Res.*, núm. 6, pàg. 93-100.
- HAAS, C. A.; T. DELLER; T. NAUMANN.; M. FROTSCHER (1996). «Selective expression of the immediate early gene *c-jun* in axotomized rat medial septal neurons is not related to neuronal degeneration». *J. Neurosci.*, núm. 16, pàg. 1894-1903.
- HAM, J.; C. BABIJ; J. WHIFIELD; C. M. PFARR; D. LALLEMAND; M. YANIV; L. L. RUBIN (1995). «A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death». *Neuron*, núm. 14, pàg. 927-939.
- HARA, H.; T. SAKAMOTO; K. KOGURE (1993). «Mechanism and pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage». *Prog. Neurobiol.*, núm. 40, pàg. 645-670.
- HÉRON, A.; H. POLLARD; F. DESSI; J. MOREAU; F. LASBENNES; Y. BEN-ARI; C. CHARRIAUT-MARLANGUE (1993). «Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain». *J. Neurochem.*, núm. 61, pàg. 1973-1976.
- HERSCHMAN, H. R. (1991). «Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 60, pàg. 281-319.
- HUNT, S. P.; A. PINI; G. EVAN (1987). «Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation». *Nature*, núm. 328, pàg. 632-634.



- KATATOKA, A.; M. KUBOTA; Y. WAKAZONO; A. OKUDA; R. BESSHO; Y. W. LIN; I. USAMI; Y. AKIYAMA; K. FURUSHO (1995). «Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or non-apoptotic cell death induced by calcium ionophore». *FEBS Lett.*, núm. 364, pàg. 264-267.
- KINOCHI, H.; F. R. SHARP; M. P. HILL; J. KOISTINAHO; S. M. SAGAR; P. H. CHAN (1992). «Induction of 70-kDa heat shock protein and hsp70 mRNA following transient focal ischemia in the rat». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, núm. 13, pàg. 105-115.
- KIRINO, T.; K. SANO (1984). «Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus». *Acta Neuropathol.*, núm. 62, pàg. 208-218.
- KOGURE, K.; H. KATO (1993). «Altered gene expression in cerebral ischemia». *Stroke*, núm. 24, pàg. 2121-2127.
- KUMAR, K.; S. SAVITHIRY; B. V. MADHUKAR (1993). «Comparison of alpha-tubulin mRNA and heat shock protein-70 mRNA in gerbil brain following 10 min of ischemia». *Mol. Brain Res.*, núm. 20, pàg. 130-136.
- KUMAR, K.; X. WU (1995). «Expression of  $\beta$ -actin and  $\alpha$ -tubulin mRNA in gerbil brain following transient ischemia and reperfusion up to 1 month». *Mol. Brain Res.*, núm. 30, pàg. 149-157.
- LI, Y.; M. CHOPP; J. H. GARCÍA; Y. YOSHIDA; Z. G. ZHANG; S. R. LEVINE (1992). «Distribution of the 72-Kd heat shock protein as a function of transient focal ischemia in rats». *Stroke*, núm. 23, pàg. 1292-1298.
- LI, Y.; M. CHOPP; N. JIANG; F. YAO; C. ZALOGA (1995). «Temporal profile of *in situ* DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, núm. 15, pàg. 389-397.
- LINNIK, M. D.; R. H. ZOBRIST; M. D. HATFIELD (1993). «Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats». *Stroke*, núm. 24, pàg. 2002-2009.
- LONGA, E. Z.; P. R. WEINSTEIN; S. CARLSON; R. CUMMINS (1989). «Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats». *Stroke*, núm. 20, pàg. 84-91.
- LOWENSTEIN, D. H.; P. H. CHAN; M. F. MILES (1991). «The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity». *Neuron*, núm. 7, pàg. 1053-1060.
- MACMANUS, J. P.; A. M. BUCHAN; I. E. HILL; I. RASQUINHA; E. PRESTON (1993). «Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain». *Neurosci. Lett.*, núm. 164, pàg. 89-92.
- MARUNO, M.; T. YANAGIHARA (1990). «Progressive loss of messenger RNA and delayed neuronal death following transient cerebral ischemia in gerbils». *Neurosci. Lett.*, núm. 115, pàg. 155-160.
- MARX, J. L. (1987). «The *fos* gene as 'master-switch'». *Science*, núm. 237, pàg. 854-856.
- MATUS, A.; M. ACKERMANN; G. PEHLING (1982). «High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 79, pàg. 7590-7594.
- MORGAN, J. I.; T. CURRAN (1991). «Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*». *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 14, pàg. 421-451.
- MORIMOTO, R. I. (1993a). «Chaperoning the nascent polypeptide chain». *Curr. Biol.*, núm. 3, pàg. 101-102.
- (1993b). «Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes». *Science*, núm. 269, pàg. 1409-1410.
- MUNELL, F.; R. E. BURKE; A. BANDELE; R. M. GUBITS (1994). «Localization of *c-fos*, *c-jun*, and *hsp-70* mRNA expression in brain after neonatal hypoxia-ischemia». *Dev. Brain Res.*, núm. 77, pàg. 111-121.
- NOWAK, T. S. JR. (1991). «Localization of 70 kDa stress protein mRNA induction in gerbil brain after ischemia». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, núm. 11, pàg. 432-439.
- PANDEY, S.; P. R. WALKER; M. SIKORSKA (1994). «Separate pools of endonuclease activity are responsible for internucleosomal and high molecular mass DNA fragmentation during apoptosis». *Biochem. Cell Biol.*, núm. 72, pàg. 625-629.
- PELHAM, H. R. B. (1986). «Speculations on the functions of major heat-shock and glucose regulated proteins». *Cell*, núm. 46, pàg. 959-961.
- PLANAS, A. M.; I. FERRER; E. RODRÍGUEZ FARRÉ (1995b). «Induction of heat shock protein in the mouse brain following administration of the ibotenic acid analogue AMAA is mediated through NMDA receptors». *Brain Res.*, núm. 700, pàg. 289-294.
- PLANAS, A. M.; A. SORIANO; A. ESTRADA; O. SANZ; F. MARTIN; I. FERRER (1997). «The heat-shock stress response after brain lesions: Induction of 72 kD heat shock protein (cell types involved, axonal transport, transcriptional regulation) and protein synthesis inhibition». *Prog. Neurobiol.* [En premsa]
- PLANAS, A. M.; M. A. SORIANO; I. FERRER; E. RODRÍGUEZ FARRÉ (1994). «Regional expression of inducible heat shock protein-70 mRNA in the rat brain following administration of convulsant drugs». *Mol. Brain Res.*, núm. 27, pàg. 127-1377.
- (1995a). «Kainic acid-induced heat-shock protein-70 mRNA and protein, expression is inhibited by MK-801 in certain rat brain regions». *Eur. J. Neurosci.*, núm. 7, pàg. 293-304.
- PLANAS, A. M.; M. A. SORIANO; E. RODRÍGUEZ FARRÉ; I. FERRER (1995c). «Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain». *Neurosci. Lett.*, núm. 200, pàg. 187-190.
- PORTERA-CAILLIAU, C.; J. C. HEDREEN; D. L. PRICE; V. E. KOLIATOS (1995). «Evidence for apoptotic cell death

- in Huntington disease and excitotoxic animal models». *J. Neurosci.*, núm. 15, pàg. 3775-3787.
- RORDORF, G.; W. J. KOROSHETZ; J. V. BONVENTRE (1991). «Heat shock protects cultured neurons from glutamate toxicity». *Neuron*, núm. 7, pàg. 1043-1052.
- SCHLINGENSIEPEN, K. H.; F. WOOLNIK; M. KUNST; R. SCHLINGENSIEPEN (1994). «The role of jun transcription factor expression and phosphorylation in neuronal differentiation, neuronal cell death, and plastic adaptations *in vivo*». *Cell. Mol. Neurobiol.*, núm. 14, pàg. 487-505.
- SIMON, R. P.; H. CHO; R. DWINN; D. LOWENSTEIN (1991). «The temporal profile of 72-kDa heat-shock protein expression following global ischemia». *J. Neurosci.*, núm. 11, pàg. 881-889.
- SLOVITER, R. S.; D. H. LOWENSTEIN (1992). «Heat shock protein expression in vulnerable cells of the rat hippocampus as an indication of excitation-induced stress». *J. Neurosci.*, núm. 11, pàg. 3004-3009.
- SMEYNE, R. J.; M. VENDRELL; M. HAYWARD; S. J. BAKER; G. C. MIAO; K. SCHILLING; L. M. ROBERTSON; T. CURRAN; J. I. MORGAN (1993). «Continuous *c-fos* expression precedes programmed cell death *in vivo*». *Nature*, núm. 363, pàg. 166-169.
- SOMMER, C.; P. GASS; M. KIESSLING (1995). «Selective *c-jun* expression in CA1 neurons of the gerbil hippocampus during and after acquisition of an ischemia-tolerant state». *Brain Pathol.*, núm. 5, pàg. 135-144.
- SORIANO, M. A.; I. FERRER; E. RODRÍGUEZ FARRÉ; A. M. PLANAS (1995). «Expression of *c-fos* and inducible *hsp-70* mRNA following a transient episode of focal ischemia that had non-lethal effects on the rat brain». *Brain Res.*, núm. 670, pàg. 317-320.
- (1996). «Apoptosis and *c-Jun* in the thalamus of the rat following cortical infarction». *NeuroReport*, núm. 7, pàg. 425-428.
- SORIANO, M. A.; A. M. PLANAS; E. RODRÍGUEZ FARRÉ; I. FERRER (1994b). «Early 72-kDa heat shock protein induction in microglial cells following focal ischemia in the rat brain». *Neurosci. Lett.*, núm. 182, pàg. 205-207.
- SORIANO, M. A.; A. TORTOSA; A. PLANAS; E. RODRÍGUEZ FARRÉ; I. FERRER (1994a). «Induction of HSP70 mRNA and HSP70 protein in the hippocampus of the developing gerbil following transient forebrain ischemia». *Brain Res.*, núm. 653, pàg. 191-198.
- SUZUKI, R.; T. YAMAGUCHI; T. KIRINO; F. ORZI; I. KLATZO (1983). «The effects of 5-min ischemia in mongolian gerbils. I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilization changes». *Acta Neuropathol.*, núm. 60, pàg. 207-216.
- TAKEMOTO, O.; H. TOMIMOTO; T. YANAGIHARA (1995). «Induction of *c-fos* and *c-jun* gene products and heat shock protein after brief and prolonged cerebral ischemia in gerbils». *Stroke*, núm. 26, pàg. 1639-1648.
- TAMURA, A.; D. I. GRAHAM; J. MCCULLOCH; G. M. TEASDALE (1981). «Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion». *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, núm. 1, pàg. 53-69.
- THOMAS, L. B.; D. J. GATES; E. K. RICHFIELD; T. F. O'BRIEN; J. B. SCHWEITZER; D. A. STEINDLER (1995). «DNA end labelling (TUNEL) in Huntington's disease and other neuropathological conditions». *Exp. Neurol.*, núm. 133, pàg. 265-272.
- TOMINAGA, T.; S. KURE; K. NARISAWA; T. YOSHIMOTO (1993). «Endonuclease activation following focal ischemia injury in the rat brain». *Brain Res.*, núm. 608, pàg. 21-26.
- TOOLE, J. F. (1990). «Cerebrovascular disorders». New York: Raven Press.
- TORTOSA, A.; I. FERRER (1993). «Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil after transient forebrain ischemia: a qualitative and quantitative sequential study». *Neuroscience*, núm. 55, pàg. 33-43.
- UEMURA, Y.; N. W. KOWALL; M. F. BEAL (1991). «Global ischemia induces NMDA receptor-mediated *c-fos* expression in neurons resistant to injury in the gerbil hippocampus». *Brain Res.*, núm. 542, pàg. 343-347.
- WEISSBACH, H.; S. OCHOA (1976). «Soluble factors required for eukaryotic protein synthesis». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 45, pàg. 191-216.