

ARTICULO

Expresión de Fas (CD95) y FasL (CD95L) en tejido cerebral normal e isquémico

Carlota Oria de Suárez¹, Andrés Alvarez¹, Adriana Arriaga¹, María Eugenia Barrios¹, Idana Chacón¹, Loida Ponce², Robert Tovar², José Corado²

¹Laboratorio de Fisiopatología Experimental (FiPEX)

²Unidad de Inmunología (UNIVENIN)
Departamento de Ciencias Fisiológicas.
Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad de Carabobo
Valencia-Venezuela

Correspondencia: José Corado
A.P.3798, El Trigal, Valencia, Venezuela
Tel.™ +58.241.8679820
E-mail: jcorado@uc.edu.ve

Recibido: Noviembre 2007 **Aprobado:** Septiembre 2008

RESUMEN

Fas y FasL son moléculas proteicas de amplia expresión en el organismo. La interacción entre ellas tiene numerosas consecuencias para células y tejidos, la más importante es la apoptosis. Se sabe que ambas se modifican en diversos trastornos neurológicos, pero se desconoce su patrón de expresión en el cerebro, en condiciones normales y durante la isquemia cerebral. **Objetivo:** Evaluar la expresión de Fas/FasL en tejido cerebral normal e isquémico, para avanzar en el estudio de la fisiopatología de la isquemia cerebral. **Material y Métodos:** Muestras de tejido cerebral de 20 ratas Sprague-Dawley, se utilizaron para determinar Fas y FasL por inmunohistoquímica. Diez muestras sin isquemia formaron el grupo control, (5 para determinar Fas y 5 para FasL), a las 10 restantes se les indujo isquemia cerebral global por paro respiratorio (5 para determinar Fas y 5 para FasL). Los cortes de tejido se observaron al microscopio óptico, considerándose positiva para expresión de Fas y FasL al observar coloración pardorajiza del tejido y membranas celulares, registrándose los hallazgos en imágenes digitalizadas. Se realizó conteo celular y densitometría con programa Imagetool 3.0. **Resultados:** Fas y FasL se expresaron en células del tejido no isquémico (38,1% y 46,9%, respectivamente,). La expresión de Fas y FasL aumentó en tejido cerebral isquémico (60,1% y 64,3%, respectivamente) ($P < 0,05$). La densitometría reportó valores significativamente más altos en la expresión de Fas y FasL, en el grupo isquémico que en el grupo normal ($P < 0,05$). **Conclusiones:** Los marcadores Fas/FasL, se expresan en tejido cerebral normal. Esta expresión aumenta en presencia de isquemia. Esto sugiere, que ambas moléculas, juegan un papel fisiológico en el SNC, siendo, probablemente, uno de ellos, la apoptosis. Además, participan en los mecanismos de daño cerebral durante isquemia.

Palabras claves: Isquemia cerebral, Muerte neuronal, Fas, CD95, FasL CD95L, Apoptosis

ABSTRACT

Expression of Fas (CD95) and FasL (CD95L) in normal and ischemic cerebral tissue

Fas and FasL are protein molecules of wide expression in the organism. The interaction among them has numerous consequences for cells and tissues, the most important being apoptosis. It is known that both molecules are modified in various neurological disorders, but their pattern of expression in the brain in normal and ischemic conditions is unknown. **Objective:** To evaluate the expression of Fas/FasL in normal and ischemic tissue, in order to advance in the study of cerebral ischemia physiopathology. **Material and Methods:** cerebral tissue samples of 20 Sprague-Dawley rats were used to determine Fas and FasL by immunohistochemistry. The control group consisted of ten samples without brain ischemia (5 to determine Fas and 5 for FasL). The experimental group consisted of the other 10 samples, which were submitted to global brain ischemia (5 to determine Fas and 5 for FasL). Tissues were fixed, cut and examined under the optical microscope. Expression of Fas and FasL was considered positive when a brownish-red coloration of the tissue and cellular membranes was observed. Findings were recorded in digitalized images. Positive cells were counted, and densitometry was done with the Imagetool 3.0 program. **Results:** Expression of Fas and FasL in non ischemic tissue cells was observed (38.1% and 46.9%, respectively). The expression of Fas and FasL increased in the ischemic cerebral tissue (60.1% and 64.3%, respectively) ($p < 0.05$). The densitometry values were significantly higher for the group with ischemia. **Conclusions:** The Fas/FasL markers are expressed in normal cerebral tissue. Their expression increases in the presence of ischemia. It is suggested that both molecules may play a physiological role in the SNC, apoptosis being one of them. In addition, they participate in the cerebral tissue damage mechanisms during ischemia.

Key Words: Apoptosis, Brain ischemia. Fas (CD95), FasL (CD95L), Neuronal death

INTRODUCCIÓN

Fas (CD95), es una molécula homotrimérica de 45 Kd, que forma parte de la familia de los receptores de TNF. Se encuentra en el organismo como una proteína integral. Es inductor de apoptosis, pero también promueve señales de supervivencia (1). Fas se expresa en tejidos humanos normales (2-4), tales como timo, ovario, corazón e hígado (1). Por su parte, FasL (CD95L) (ligando de Fas), es un homotrímero de 40 Kd, constituye una proteína integral de membrana y puede encontrarse en forma soluble, se expresa en tejidos linfoides y no linfoides (3), igualmente, en neuronas y astrocitos en cerebros de ratas y humanos (3,5). La interacción Fas/FasL tiene numerosas consecuencias para células y tejidos, la más importante es que desencadena fenómenos apoptóticos en los linfocitos T y B inmaduros y maduros y destrucción de células blanco por acción de linfocitos citotóxicos (1)

La apoptosis, es un mecanismo de muerte celular que ocurre sobretodo en dos tipos de células: los linfocitos a lo largo de toda la vida, y en las neuronas durante el periodo prenatal, en las cuales, el proceso es esencial para la correcta maduración y funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), permitiendo así, la selección de poblaciones neuronales adecuadas y el refinamiento de las conexiones sinápticas, eliminando aquellas que son imperfectas (6). Por otra parte, la apoptosis ha sido involucrada en procesos de regeneración, proliferación y degeneración patológica del SNC (4) demostrándose su presencia en la corteza cerebral, después de un trauma agudo de cráneo (7, 8), y en otros trastornos como la enfermedad de Alzheimer y el Mal de Parkinson (8, 9)

Estudios recientes plantean que la apoptosis juega un papel importante en la fisiopatología de la isquemia cerebral focal y que, además de la necrosis, es un mecanismo de muerte involucrado en el daño neuronal post-isquémico (10-13). Para que ocurra la apoptosis es necesario que se transmitan señales intracelulares. Uno de los mecanismos moleculares involucrados en estas señales es la interacción Fas-FasL. Se ha sugerido que Fas y FasL juegan un papel protector en el tejido cerebral normal formando una barrera inmunitaria (4,14,15). La expresión de ambas moléculas se eleva significativamente en diversos trastornos neurológicos agudos y crónicos (8) sugiriendo la posibilidad de que el sistema Fas/FasL pueda jugar un papel importante en las respuestas inflamatorias y degenerativas en el sistema nervioso central (7, 4). Así, estudios previos sugieren que las señales de muerte mediadas por Fas intervienen en el daño neuronal después de una isquemia cerebral global (16, 17). Otros estudios han reportado aumento de la expresión de Fas después de una isquemia cerebral (18), lo que pudiera estar relacionado con la producción de citoquinas inflamatorias e invasión de linfocitos, macrófagos y microglías, capaces de inducir la expresión de este marcador en el tejido (19).

Hasta el presente no existen pruebas irrefutables, que demuestren que la apoptosis juega un rol fundamental en las enfermedades neurológicas y no se ha logrado hasta el momento, demostrar la existencia de un marcador cualitativo de certeza de muerte, debida a hipoxia aguda o eventos isquémicos (20), igualmente, no se conoce con precisión el patrón de expresión de Fas y FasL en el tejido cerebral normal e isquémico, aún cuando, diversas evidencias, que avalan su participación en el proceso, se han venido acumulando en los últimos años (6). Por esta razón, se planteó hacer un estudio en un modelo experimental de isquemia cerebral global en ratas, en la búsqueda de los marcadores de apoptosis, Fas y FasL, con el fin de evaluar su expresión en el tejido cerebral normal, así como determinar su comportamiento ante un proceso isquémico y de esta manera, hacer un aporte a futuras investigaciones en el área, para continuar el avance en el estudio de los eventos fisiopatológicos involucrados en la muerte neuronal por isquemia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Veinte (20) ratas Sprague Dawley, machos, con peso promedio de 300 gr, fueron distribuidas en dos grupos, un grupo control sin isquemia (n=10) y un grupo al que se le indujo isquemia cerebral global (n=10). Ambos grupos fueron sometidos a las mismas condiciones de ambiente y de alimentación, ritmo de luz:oscuridad 12:12 horas, comida y agua *ad libitum*.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a lo indicado por el National Institute of Health y la U.S. Public Health Office (21) sobre el uso de animales de experimentación y fueron avalados por la Dirección de Investigación y Producción Intelectual de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UC.

Los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (60 mg.Kg⁻¹ i.p.) y, una vez verificada la profundidad de la anestesia, por ausencia del reflejo de retiro, se procedió de la siguiente manera: A las ratas del grupo sin isquemia, se les abrió rápidamente el cráneo y se les extrajo, de inmediato, el hemisferio cerebral izquierdo. A las ratas del grupo con isquemia, se les indujo hipoxia,

por paro respiratorio, al administrar D-tubocurarina ($0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$, i.p.) siguiendo metodología reportada con anterioridad (22). Se vigiló, cuidadosamente, el momento en que ocurrió el paro respiratorio y, a los 10 minutos, se extrajo rápidamente el hemisferio cerebral izquierdo. Los hemisferios cerebrales fueron fijados con Formol 10%. A la mitad de las ratas del grupo sin isquemia y con isquemia se les determinó Fas y a la mitad restante se les hizo determinación de FasL.

Estudio Inmunohistoquímico de la Expresión de Fas y FasL Los tejidos fueron parafinados y, posteriormente, se hizo cortes de $5 \mu\text{m}$ de espesor. Se colocaron en láminas portaobjetos tratadas con poli-L-lisina y se sometieron a tinción con hematoxilina-eosina. Se utilizó la técnica de Inmuno-Peroxidasa por el método indirecto. Las muestras fueron hidratadas con solución amortiguadora de fosfato (PBS) y secuencialmente incubadas, en cámara húmeda a temperatura ambiente, en diferentes etapas, con: 1) Anticuerpo Monoclonal Primario, anti CD95 (R&D Systems® EEUU), a una dilución 1/1000, durante 40 minutos, para la determinación de Fas; y Anticuerpo Monoclonal Primario antiCD95L (Abcam, Inglaterra), a una dilución 1/100, durante 90 minutos, para la determinación de FasL; 2) Anticuerpo Secundario biotinado, antiinmunoglobulina de rata (BRAR) generado en conejo (Vector Labs® EEUU), a una dilución 1/30, por 30 minutos y, 3) Sistema revelador enzimático con solución Cromógeno "Novared" (Vector Labs® EEUU) por 4 minutos. Los cortes fueron lavados con agua corriente y contrastados con Hematoxilina de Meyer (Chemical Webster, EEUU), por 5 minutos. Entre cada incubación se realizó un lavado con PBS durante 5 minutos. Las láminas fueron sometidas, luego, a deshidratación por pasos sucesivos de 3 minutos con alcohol 70%, alcohol 100%, y a dos pasos sucesivos en xilol 100%. Finalmente, se utilizó medio de montaje Entellan permanente hidrofóbico (Merck®). Se realizaron controles negativos en cada experimento en los que no se añadió el anticuerpo primario y, en su lugar, se colocó PBS. Las láminas fueron procesadas el mismo día, por cuatro investigadores de manera, coordinada, independiente y simultánea, para detener la reacción enzimática al mismo tiempo. Posteriormente, las láminas se observaron al microscopio óptico.

Se consideró como positiva la expresión de CD95 y CD95L, cuando las membranas celulares y el tejido tomaron una coloración pardo rojiza. Se consideró expresión negativa cuando el corte tomó una coloración violeta.

Se hizo recuento de las células positivas y negativas, evaluando cuatro campos de cada corte histológico en un total de cinco láminas por grupo de estudio. La observación y análisis de los cortes fue realizado por tres investigadores de forma independiente.

Análisis Densitométrico de la Expresión de Fas y FasL Con el fin de hacer mas objetivos los resultados observados en el recuento celular, se realizó densitometría a los cortes histológicos positivos y negativos de expresión de ambas moléculas. Para ello, los cortes fueron fotografiados con una cámara digital (Sony®) con una resolución de 4,8 Megapixels. Las imágenes se procesaron digitalmente. La lectura densitométrica fue realizada con el programa Imagetool 3.0. Para ello, las imágenes coloreadas fueron previamente convertidas a una escala de grises, y luego se realizó inversión de dicha escala, de tal manera que las áreas pardo rojizas de mayor intensidad

mostrarán una mayor densidad óptica, expresada en unidades densitométricas. Estos datos se trasladaron a un programa estadístico (Statistica 6.0) para establecer la base de datos, realizar cálculos y analizar los resultados.

Análisis Estadístico. El recuento de células fue expresado en frecuencia relativa (%). Los valores densitométricos fueron presentados como media aritmética \pm Error estándar (EE) de unidades densitométricas. Por medio del Test de Kolmogorov-Smirnov se determinó que la distribución de los datos no era gaussiana y se procedió al análisis de los datos utilizando el test de Wilcoxon. Se consideraron significativas las diferencias cuando $P < 0,05$

RESULTADOS

Expresión de Fas en tejido cerebral normal e isquémico. En Fig.1 se observa la expresión de Fas en tejido cerebral normal e isquémico, en porcentaje de células positivas y negativas, se observa que Fas se expresa en ambos grupos de estudio.

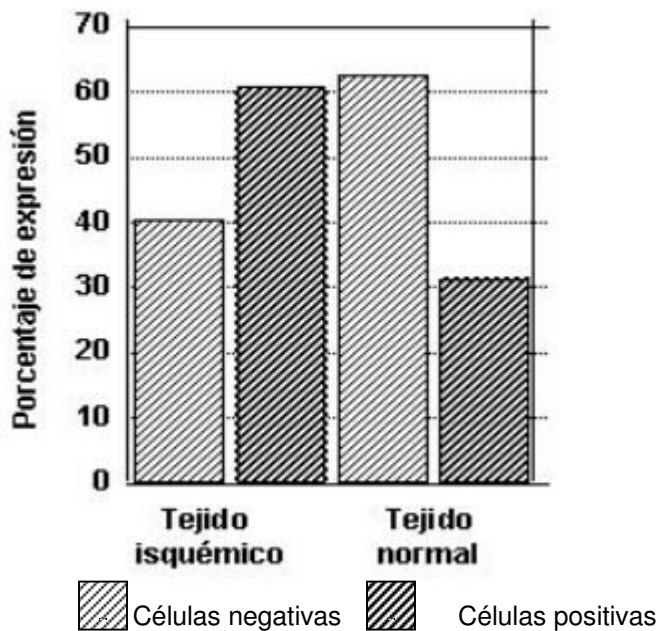


Fig. 1 Expresión de Fas en tejido cerebral normal e isquémico

En tejido cerebral normal esta expresión es de 38,1% del total de células y en tejido isquémico, 60,1% del total de las células expresaron este marcador.

En el perfil densitométrico (Fig. 2) se muestra que los valores densitométricos del tejido cerebral normal, fueron significativamente menores que los observados en el tejido isquémico ($P=0,000001$).

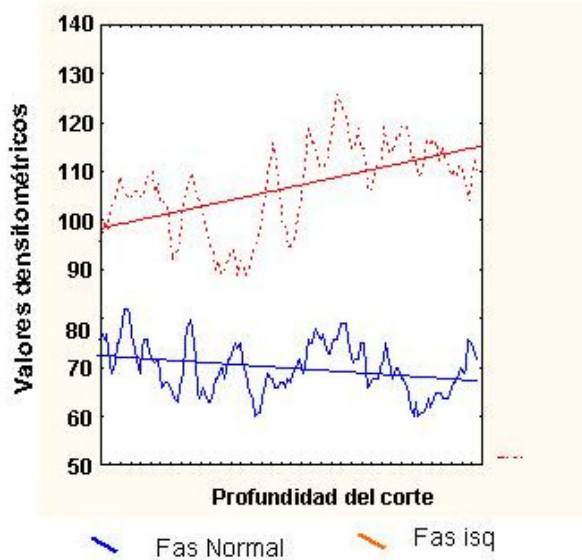


Fig. 2 Perfil densitométrico de la expresión de Fas en tejido cerebral e isquémico de ratas

En la Fig 3 se representa la imagen de un control negativo de expresión de Fas, en la que se observa la típica coloración violeta de las células que no expresan dicho marcador.

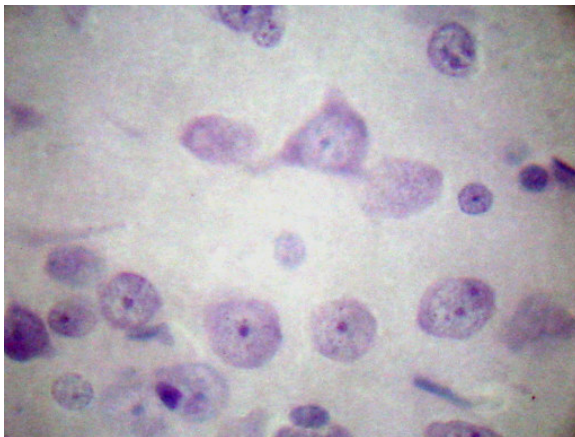


Fig. 3 Control Negativo de la expresión de FasL. (40x). Técnica Avidina-Biotina-Peroxidasa

En la Fig 4 se evidencia la expresión basal de Fas en tejido cerebral normal y en la Fig. 5 se observa el aumento de dicha expresión en tejido isquémico.

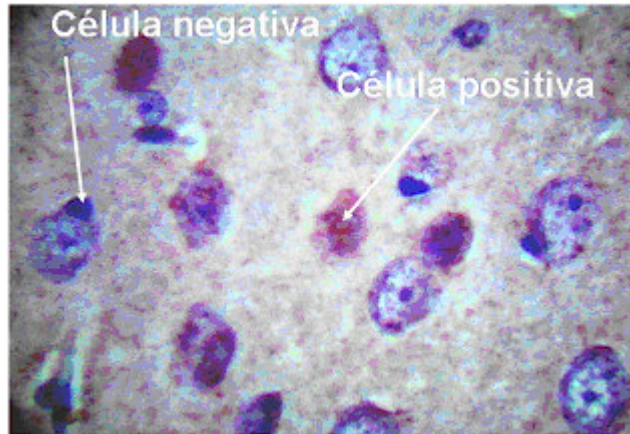


Fig 4. Expresión de Fas (CD95) en tejido cerebral normal de ratas (40x)

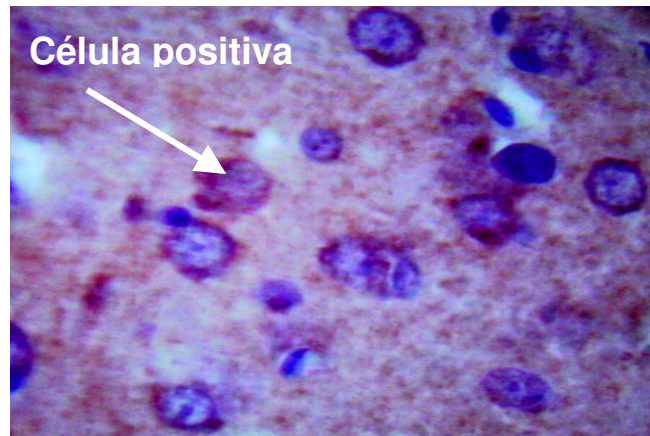


Fig. 5. Expresión de Fas (CD95) en tejido cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral total

Expresión de FasL en tejido cerebral normal e isquémico En el Fig. 6 se observa la expresión de FasL (CD95L) en tejido cerebral normal e isquémico, en porcentaje de células positivas y negativas.

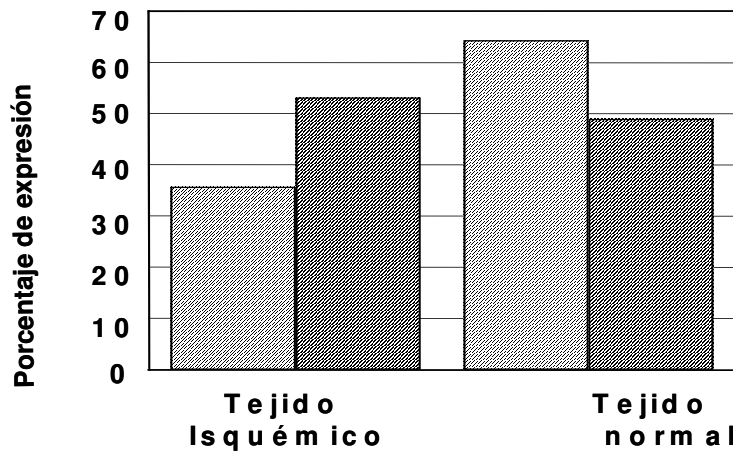


Fig. 6. Frecuencia relativa de expresión de FasL en tejido cerebral normal e isquémico en ratas

▨ Células Negativas ▨ Células Positivas

Se muestra que FasL se expresa en tejido cerebral normal en 46,9% de células. En tejido isquémico, 64,3% de las células expresaron FasL.

Estos resultados coinciden con los observados al realizar el perfil densitométrico (Fig. 7) donde se muestra que los valores densitométricos del tejido cerebral normal, fueron significativamente menores que los observados en el tejido isquémico ($P=0,000001$)

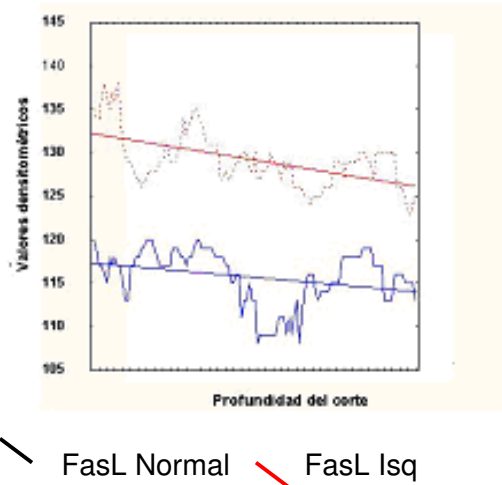


Fig. 7 Perfil Densitométrico de la expresión de FasL en tejido cerebral normal e isquémico de ratas

Comparación de la expresión de Fas y FasL en tejido cerebral normal e isquémico. En la tabla 1 se puede evidenciar que la expresión de FasL es significativamente mayor que la expresión de Fas tanto en tejido cerebral normal ($P=0,000037$) como isquémico ($P=0,022967$). Por otra parte, las dos moléculas aumentan, de manera significativa, su expresión en tejido cerebral isquémico ($P= 0,000001$).

Tabla 1 Valores densitométricos de la expresión de Fas y FasL en tejido cerebral normal e isquémico.

	Tejido cerebral Normal	Tejido cerebral Isquémico	P
Expresión de Fas (Unidades densitométricas)	74,9 ± 9,7	105,8 ± 8,9	0,000001
Expresión de FasL (Unidades densitométricas)	115,6 ± 3,1	128,7 ± 3,4	0,000001
P	0,000037	0,022967	

En la Fig. 8 se ve la imagen de un control negativo de expresión de FasL, se observa la típica coloración violeta. En la Fig, 9 se evidencia la expresión basal de FasL en tejido cerebral normal y en la Fig. 10 se observa el aumento de dicha expresión en tejido isquémico.

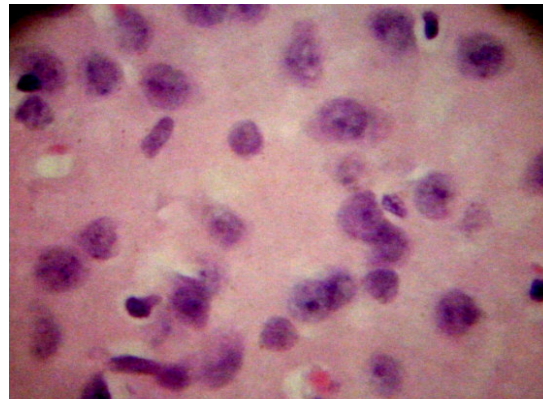


Fig. 8 Control Negativo de la expresión de FasL. (40x). Técnica Avidina-Biotina-Peroxidasa

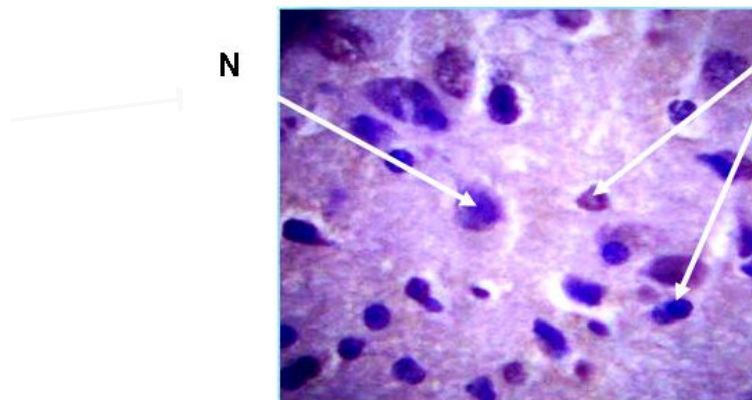


Fig. 9 Expresión de FasL (CD95L) en tejido cerebral no Isquémico de ratas. (40x.) N : Célula negativa; P: celula positiva

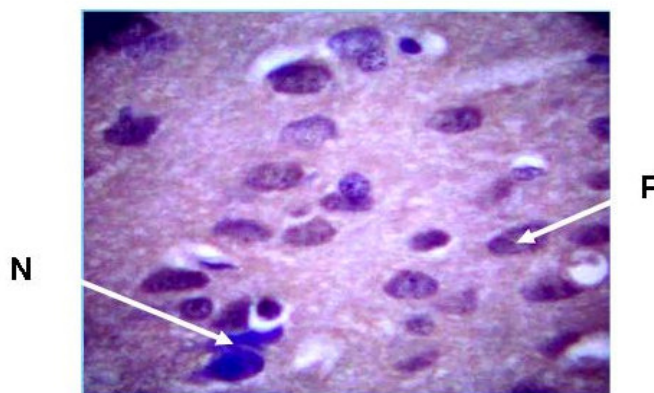


Fig. 10 Expresión de FasL (CD95L) en tejido cerebral de ratas sometidas a isquemia cerebral. (40x.) N : Célula negativa; P: celula positiva

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular que interviene en numerosos procesos fisiológicos (1), siendo esencial en la maduración y adecuado funcionamiento del sistema nervioso central durante la etapa del desarrollo (6). Entre las moléculas que participan en la apoptosis se encuentran Fas (CD95) y su ligando FasL (CD95L). Existen controversias en lo que a la expresión de Fas y FasL, en el tejido cerebral, se refiere; por un lado, estudios previos han demostrado que ambos marcadores se expresan en neuronas y glías del tejido cerebral normal (3-5, 23, 24), en el cual parecen cumplir un papel protector (4, 14, 15). Sin embargo, otros autores señalan, por ejemplo, que la molécula Fas sólo se expresa en tejido lesionado (19). En nuestro modelo se pudo demostrar que Fas y FasL se expresan en el tejido cerebral normal de rata, lo que sugiere, que estas moléculas podrían participar, tal como lo reportan otros autores, en procesos fisiológicos del SNC.

Los estudios experimentales sobre isquemia cerebral han permitido avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en la muerte neuronal, es así como se ha podido demostrar que la muerte, en estas situaciones, ocurre principalmente por necrosis y por apoptosis (11, 13). Así se ha demostrado la presencia de Fas y FasL en tejido cerebral isquémico (8, 13, 17, 18, 25), principalmente en la zona de penumbra isquémica (16) y en áreas postisquémicas después de isquemia cerebral reversible (26).

gualmente, se ha mostrado un aumento de la expresión de Fas (7, 27) y de FasL (8, 9) en otros trastornos neurológicos agudos como en los traumatismos cerebrales. Por otra parte, hay reportes que indican que el sistema Fas/FasL está directamente involucrado en la muerte celular después de isquemia miocárdica (28). En el presente estudio se determinó que la expresión de Fas y FasL, aumenta de manera significativa en el tejido cerebral isquémico, lo que coincide con los hallazgos descritos por otros autores y sugiere la participación de estas dos moléculas en procesos de daño neuronal agudo (7, 8, 27).

El presente estudio, permitió demostrar que los marcadores de apoptosis, Fas y FasL, están presentes en el tejido cerebral normal y que su expresión aumenta en presencia de isquemia, lo cual sugiere, su participación en el proceso de muerte neuronal que ocurre durante los eventos isquémicos. Los resultados sugieren la participación de la apoptosis en los mecanismos de daño neuronal por isquemia y evidenciarían, en parte, que la activación de la vía extrínseca, mediada por el sistema Fas/FasL, ocurriría durante este proceso patológico.

AGRADECIMIENTO. *Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según oficios N° 209-2004 y 211-2004.*

BIBLIOGRAFIA

1. Orta S. Corado J. Sistema Inmunitario y la muerte celular. En: Inmunología Actual. Bases fisiológicas para la comprensión de las alteraciones del sistema inmunitario. Sección XI. Alfa Impresiones. Primera Edición. 2003; 227-235.
2. Gniadecki R. Depletion of membrane cholesterol causes ligand-independent activation of Fas and apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320(1):165-169.

3. Lee SH, Shin MS, Park WS, Kim SY, Dong SM, Lee HK, et-al. Immunohistochemical analysis of Fas ligand expression in normal human tissues. *APMIS*. 1999; **107**(11):1013-1019
4. Choi C, Benveniste E. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004; **44**(1):65-81
5. Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, et-al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol*. 1999; **162**(4):1889-1895
6. Consentino C. Apoptosis y Sistema Nervioso. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. ISSN 1025-5583. 1997; **58**(2):1-7
7. Qiu J, Whalen M, Lowenstein P, Fiskum G, Fahy B, Darwish R, et-al. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J Neurosci*. 2002; **22**:3504-3511
8. Grosjean M, Lenzlinger P, Stahel P, Yatsiv I, Shohami E, Trentz O, et-al. Immunohistochemical characterization of Fas (CD95) and Fas Ligand (FasL/CD95L) expression in the injured brain: relationship with neuronal cell death and inflammatory mediators. *Histol Histopathol*. 2007; **22**:235-250
9. Beer R, Franz G, Schopf M, Reindi M, Zelger B, Schmutzhard E, et-al. Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; **20**:669-677
10. Rosenbaum D., Gupta G., D'Amore J., Singh W., Zhang H., Kessler J. Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2000; **61**:686-692.
11. Padosch SA; Bottiger BW. Neuronal apoptosis following cerebral ischaemia: pathophysiology and possible therapeutic implications. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2003; **16**:439-445
12. Padosch S., Vogel P., Bottiger B. Neuronal apoptosis following cerebral ischemia, Basis, physiopathology and treatment strategies. *Anaesthesist*. 2001; **50**:905-920.
13. Sairanen T, Karjalainen-Lindsberg M, Paetau A, Ijas p, Lindsberg p. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemia stroke- a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain*. 2006; **129**:189-199
14. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*. 1999; **27**(1):62-74.
15. Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R. Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia*. 2000; **32**(1):25-41
16. Martín-Villalba A., Hahne M., Kieber S., Vogel J., Falk W., Schenkel J., Krammer P. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ*. 2001; **8**:659-661.
17. Jin K., Graham S., Mao X., Nagayama T., Simon R., Greenberg D. Fas (CD95) may mediate delayed cell death in hippocampal CA1 sector after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; **21**:1411-1421.
18. Ferrer I., Planas A. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; **62**:329-339.
19. Chulhee Ch, Joo Y, Jeongi L, Jung-Hee L, Eui-Cheoi S, Young A, Chui K, Se-Jong K, Joo-Deuk K. Fas Ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increase with IL-1, IL-6, TNF-, or IFN-Á. *J Immunol*. 1999; **162**:1889-1895
20. Oechmichen M, Meissner C. Cerebral hypoxia and ischemia : the forensic point of view : a review. *J Forensic Sc*. 2006; **51**:880-887
21. National Institute Of Health. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH publications 1996; N° 80-23.

22. Oria C.; Eblen A. Efectos extrarrenales de la furosemida sobre compartimientos líquidos del tejido cerebral normal e Isquémico. *Rev Neurol.* 2001; España. 32:414-416
23. Medana I, Zhaoxia L, Alexander F, Jurg T, Hartmut W, Harald N. Fas Ligand (CD95L) Protects Neurons against perforin-mediated T lymphocyte cytotoxicity *J Immunol.* 2001; 167:674-681
24. Sung L, Tong Z, Chulhee Ch, Zheng W, Eddy B. Differential regulation and function of Fas expression on glial cells. *J Immunol.* 2000; 164:1277-1285
25. Zhang Y, Guo Y, Jia Q, Wang Y, Zhang H. Mechanism of anti-apoptotic action of dipfluzine on neuronal damage of the rat hippocampal CA1 region subjected to transient forebrain ischemia. *Yao Xue Xue Bao.* 2005; 40:97-104
26. Martin Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, et-al. CD95 ligand (Fas-L/Apo-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci.* 1999; 19:3809-3817.
27. Padosch S., Popp E., Vogel P., Bottiger B. Altered protein expression levels of Fas/CD95 and Fas ligand in differentially vulnerable brain areas in rats after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2003; 338:247-251.
28. Jeremias I, Chupad C, Martin-Villalba A, Hazabeti H, Schenkel J, Boekstegers P, et-al. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation.* 2000; 102:915-920