

UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

**ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITORIA EN EL JERBU COM A MODEL DE
MALALTIA ISQUEMICA CEREBRAL: ESTUDI DE NEURONES INHIBIDORES
CORTICALS DE CIRCUIT LOCAL I DE MECANISMES DE MORT CEL·LULAR.**

**Memòria per a optar al Grau de Doctor, presentada per Avelina Tortosa i
Moreno.**



A handwritten signature in black ink, which appears to be "Avelina Tortosa i Moreno". The signature is written in a cursive style and is positioned at the bottom right of the page.

Dr. Isidro Ferrer Abizanda, Professor Titular del Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona,

CERTIFICA: que la Tesi Doctoral "ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITORIA EN EL JERBU COM A MODEL DE MALALTIA ISQUEMICA CEREBRAL: ESTUDI DE NEURONES INHIBIDORES CORTICALS DE CIRCUIT LOCAL I DE MECANISMES DE MORT CEL·LULAR", presentada per Avelina Tortosa i Moreno per a optar al Grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la meua direcció i compleix els requisits necessaris per a ser llegida davant el Tribunal corresponent.



Dr. Isidro Ferrer Abizanda

Barcelona, 13 d'octubre de 1993

Dr. Jaume Peres i Serra, Professor Associat del Departament de Medicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona,

CERTIFICA: que la Tesi Doctoral "ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITORIA EN EL JERBU COM A MODEL DE MALALTIA ISQUEMICA CEREBRAL: ESTUDI DE NEURONES INHIBIDORES CORTICALS DE CIRCUIT LOCAL I DE MECANISMES DE MORT CEL·LULAR", presentada per Avelina Tortosa i Moreno per a optar al Grau de Doctor en Medicina, ha estat realitzada sota la meva direcció i compleix els requisits necessaris per a ser llegida davant el Tribunal corresponent.



Dr. Jaume Peres i Serra

Barcelona, 13 d'octubre de 1993

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIO | 1 |
| I.1 EPIDEMIOLOGIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL | 2 |
| I.2 FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL | 4 |
| I.2.1 LLINDARS D'ISQUEMIA | 4 |
| I.2.2 BIOQUIMICA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL | 6 |
| I.2.2.1 ACIDOSI | 6 |
| I.2.2.2 DISFUNCIO DE NEUROTRANSMISSORS | 7 |
| I.2.2.2.1 AMINES BIOGENIQUES | 8 |
| I.2.2.2.2 NEUROTRANSMISSOR AMINOACIDS | 9 |
| I.2.2.2.2.1 MECANISME D'ACCIO DEL GLUTAMAT | 9 |
| I.2.2.2.2.2 TEORIA DE L'EXCITOTOXICITAT EN LA ISQUEMIA | 10 |
| I.2.2.2.2.3 ALTRES AMINOACIDS | 12 |
| I.2.2.3 CALCI | 13 |
| I.2.2.4 LIPOLISI | 16 |
| I.2.2.5 RADICALS LLIURES | 16 |
| I.3 NEUROPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL | 19 |
| I.3.1 VULNERABILITAT CEL·LULAR | 20 |
| I.3.2 VULNERABILITAT REGIONAL | 23 |
| I.4 NEURONES GABA-ERGIQUES | 25 |
| I.5 PROTEINES CAPTADORES DE CALCI | 27 |
| I.5.1 PARVALBUMINA | 29 |
| I.6 MORT CEL·LULAR DURANT EL DESENVOLUPAMENT | 32 |

| | | |
|------------|---|----|
| I.7 | PROTEINA PRECURSORA BETA-AMILOIDE | 34 |
| I.8 | MECANISMES DE NEUROPROTECCIO | 36 |
| I.8.1 | SINTESI PROTEICA I MORT CEL·LULAR RETARDADA INDUIDA PER ISQUEMIA | 37 |
| I.8.2 | FACTORS TROFICS | 39 |
| I.8.3 | ANTAGONISTES RECEPTORS NMDA | 40 |
| I.8.4 | ANTAGONISTES DEL CALCI | 42 |
| I.8.5 | FRUCTOSA-1,6-BISFOSFAT | 43 |
| I.9 | NECESSITAT D'UN MODEL EXPERIMENTAL | 46 |
| II. | HIPOTESI I OBJECTIUS | 48 |
| II.1 | HIPOTESI DE TREBALL | 49 |
| II.2 | OBJECTIUS CONCRETS | 50 |
| III. | RESULTATS | 52 |
| | | |
| Capítol 1: | PARVALBUMIN IMMUNOREACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS OF THE GERBIL AFTER TRANSIENT FOREBRAIN ISCHAEMIA: A QUALITATIVE AND QUANTITATIVE SEQUENTIAL STUDY | 53 |
| III.1.1 | ABSTRACT | 55 |
| III.1.2 | INTRODUCTION | 57 |
| III.1.3 | ANIMALS AND METHODS | 59 |
| III.1.4 | RESULTS | 64 |
| III.1.5 | DISCUSSION | 76 |

| | |
|------------------------------|----|
| III.1.6 REFERENCES | 81 |
| III.1.7 TABLE I | 91 |

| | |
|--|-----|
| Capítol 2: DOSE-RELATED EFFECTS OF CYCLOHEXIMIDE ON DELAYED NEURONAL DEATH IN THE GERBIL HIPPOCAMPUS AFTER BILATERAL TRANSITORY FOREBRAIN ISCHEMIA | 92 |
| III.2.1 SUMMARY | 94 |
| III.2.2 INTRODUCTION | 95 |
| III.2.3 MATERIAL AND METHODS | 97 |
| III.2.4 RESULTS | 100 |
| III.2.5 DISCUSSION | 106 |
| III.2.6 REFERENCES | 109 |

| | |
|--|-----|
| Capítol 3: FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE FAILS TO AMELIORATE DELAYED NEURONAL DEATH IN THE CA1 AREA AFTER TRANSIENT FOREBRAIN ISCHAEMIA IN GERBILS | 121 |
| III.3.1 SUMMARY | 123 |
| III.3.2 INTRODUCTION | 124 |
| III.3.3 MATERIALS AND METHODS | 125 |
| III.3.4 RESULTS | 127 |
| III.3.5 DISCUSSION | 129 |
| III.3.6 REFERENCES | 132 |

| | |
|--|-----|
| Capítol 4: PARVALBUMIN AND CALBINDIN D-28K IMMUNOREACTIVITY, AND POSTISCHEMIC CELL DEATH IN THE DEVELOPING HIPPOCAMPUS OF THE GERBIL | 136 |
| III.4.1 SUMMARY | 138 |
| III.4.2 INTRODUCTION | 139 |
| III.4.3 MATERIAL AND METHODS | 141 |
| III.4.4 RESULTS | 143 |
| III.4.5 DISCUSSION | 149 |
| III.4.6 REFERENCES | 152 |

| | |
|---|-----|
| Capítol 5: X-RAY-INDUCED CELL DEATH IN THE DEVELOPING HIPPOCAMPAL COMPLEX INVOLVES NEURONS AND REQUIRES PROTEIN SYNTHESIS | 159 |
| III.5.1 ABSTRACT | 161 |
| III.5.2 INTRODUCTION | 162 |
| III.5.3 MATERIAL AND METHODS | 164 |
| III.5.4 RESULTS | 167 |
| III.5.5 DISCUSSION | 174 |
| III.5.6 REFERENCES | 178 |

| | |
|--|-----|
| Capítol 6: INCREASED B-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN EXPRESSION IN ASTROCYTES IN THE GERBILS HIPPOCAMPUS FOLLOWING ISCHEMIA. ASSOCIATION WITH PROLIFERATION OF ASTROCYTES | 185 |
| III.6.1 ABSTRACT | 187 |

| | |
|-------------------------------------|-----|
| III.6.2 INTRODUCTION | 188 |
| III.6.3 MATERIALS AND METHODS | 190 |
| III.6.4 RESULTS | 193 |
| III.6.5 DISCUSSION | 202 |
| III.6.6 REFERENCES | 210 |
| | |
| IV.DISCUSSIO GENERAL | 222 |
| | |
| V. CONCLUSIONS | 237 |
| | |
| VI. ANNEXOS | 242 |
| | |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 244 |

ABREVIACIONS

- APP: Proteïna precursora beta-amiloide.
- CaBP: Calbindina D28K.
- FBP: Fructosa-1,6-bisfosfat.
- GABA: Acid gamma-aminobutíric.
- GAD: Glutamat decarboxilasa.
- GFAP: Proteïna fibril·lar glial acídica.
- HSP: Proteïnes d'estrés (Heat-shock proteins).
- 5-HT: 5-Hidroxitriptamina.
- MAP: Proteïna associada a microtúbul.
- MCR: Mort cel·lular retardada.
- ME: Microscopia electrònica.
- MO: Microscopia òptica.
- NGF: Factor de creixement nerviós.
- NMDA: N-metil-D-aspartat.
- PBA: Proteïna beta-amiloide.
- PVC: Patologia vascular cerebral.
- RE: Reticle endoplasmàtic.
- SNC: Sistema nerviós central.

I. INTRODUCCIO

I.1 EPIDEMIOLOGIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

Les malalties cerebrovasculars constitueixen la patologia neurològica més freqüent i representen la tercera causa de mort en els països desenvolupats. Entre elles la patologia vascular isquèmica constitueix el grup més important ja que representa les 3/4 parts del total de pacients.

La incidència en el nostre país oscil·la entre 150 i 250 casos per 100.000 habitants/any (Lopez-Pousa i Gonzalez Martin, 1986) amb un predomini de barons. Aquests valors situen la incidència d'Espanya per sobre de la d'altres països mediterranis (Balaguer Vintró i cols., 1984) i per sota de la mitjana mundial (Kurtzke, 1980; Anderson i cols., 1990).

La prevalència d'aquestes patologies és de 600 casos/100.000 habitants (Kurtzke, 1980) i es situa en 2800 casos/100.000 habitants en la població europea de més de 65 anys (OMS, 1971). No es disposa a l'actualitat de dades referents al nostre país.

La taxa de mortalitat oscil·la entre el 10% i el 34%, siguent major en els accidents vasculars cerebrals hemorràgics. La patologia cerebrovascular isquèmica presenta una mortalitat del 10-26% (Sancho i cols., 1988).

Durant els darrers anys s'ha experimentat un notable avanç en el coneixement de la fisiopatologia d'aquestes entitats i en l'atenció al pacient, el que ha condicionat un descens de la mortalitat (Sancho J i cols., 1988). Malgrat això,

segueix sent una de les principals causes d'incapacitat física i psíquica en el món occidental.

I.2 FISIOPATOLOGIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

El dany cerebral secundari a la isquèmia és sempre conseqüència d'una disminució del flux sanguini cerebral o del contingut d'oxigen a la sang, o una combinació d'ambdues. Els canvis que s'observen en el teixit nerviós són més o menys extensos i greus en relació a la localització i duració de la isquèmia. En patologia humana, la causa més freqüent d'isquèmia cerebral és la isquèmia focal deguda a l'oclusió d'un vas. No obstant, determinades situacions patològiques com una aturada cardíaca també poden ocasionar lesions isquèmiques globals.

El grau de lesió del teixit és molt difícil de predir ja que depèn de múltiples mecanismes entre els que s'inclouen la circulació colateral, la perfusió residual durant la isquèmia, la disponibilitat d'oxigen i el grau de vulnerabilitat regional i cel·lular. Així, com a conseqüència de la disminució del flux cerebral durant la isquèmia es produeixen alteracions a nivell cel·lular que poden ser reversibles o irreversibles en funció del grau i duració de la isquèmia, i de la susceptibilitat cel·lular i regional. No obstant, el mecanisme final del dany cel·lular es degut a una insuficient producció d'energia com a conseqüència de múltiples alteracions tissulars (Welch, Barkley, 1986).

I.2.1 LLINDARS D'ISQUEMIA

Es poden descriure dos llindars de flux cerebral segons els quals la lesió de la cèl·lula pot ser o no reversible. En primer lloc, el llindar de flux per a l'alteració

funcional neuronal, a partir del qual es produeixen canvis cel·lulars que poden ser reversibles si es restitueix el flux cerebral. Per altra banda, existeix un segon llindar a partir del qual s'altera la funcionalitat de la membrana, fet que comporta una lesió irreversible de la cèl·lula i condueix a la seva mort (Astrup i cols., 1981).

Des del punt de vista hemodinàmic i metabòlic es poden descriure tres zones diferents dins de l'àrea d'isquèmia. En primer lloc, la zona central d'isquèmia, en la qual el flux cerebral disminueix per sota del llindar de funcionalitat de la membrana (8-10 ml/min/100 g de cervell). En aquesta àrea es produeixen importants alteracions hidroelectrolítiques, amb un augment de l'acidosi per acúmul d'àcid làctic que comportarà canvis cel·lulars irreversibles (Astrup i cols., 1977). Per altra part, al voltant d'aquesta àrea es descriu la zona de penombra isquèmica, on el flux es situa en nivells entre 10 i 15 ml/min/100 g de cervell (Astrup i cols., 1981). Les cèl·lules d'aquesta àrea presenten canvis potencialment reversibles si es restableix el flux. La perfusió residual de la zona de penombra permet mantenir uns nivells normals d'ATP, encara que també s'observa una discreta elevació del lactat i del consum de monofosfat i difosfat d'adenosina. En aquest sentit, el coneixement del flux crític i les alteracions metabòliques que poden determinar el dany cel·lular en la zona penombra és important en el tractament de pacients amb isquèmia cerebral focal per tal d'intentar reduir els marges d'aquesta regió. Finalment, es descriu una zona colateral al voltant de l'àrea de penombra, on el teixit conserva la viabilitat i presenta generalment hiperèmia (Welch i Barkley, 1986).

La recuperació dels teixits després de la isquèmia depèn de múltiples factors entre els que s'inclouen el grau d'isquèmia, la circulació colateral, la duració de la isquèmia i l'edema cerebral. També s'han relacionat amb el dany secundari a la isquèmia, el pH tissular, el contingut de glucosa preisquèmia, la disfunció de neurotransmissors, la generació de radicals lliures, els nivells de calci intracel·lular i l'acció de determinades prostaglandines (Welch i Barkley, 1986).

I.2.2 BIOQUIMICA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

I.2.2.1 ACIDOSI

El control del pH del medi intra i extracel·lular és primordial per al funcionament normal de la cèl·lula ja que petits canvis poden ocasionar greus alteracions en múltiples funcions de l'organisme. Les variacions en els valors del pH extracel·lular poden modificar el flux cerebral local i, consegüentment, l'alliberament d'oxigen als teixits. Així mateix, alguns mecanismes de transport a través de la membrana plasmàtica (per exemple, el transport de glucosa i l'alliberament i captació de neurotransmissors) depenen també del pH. Per altra part, el pH intracel·lular regula l'acció de múltiples enzims citoplasmàtics, especialment els de la glucòlisi, i la producció d'ATP a nivell mitocondrial (Levy i cols., 1977). Per tot això existeixen múltiples mecanismes intracel·lulars destinats a mantenir un pH estable (Welch i Barkley, 1986).

Durant la isquèmia cerebral es produeix una important alteració de la regulació intracel·lular dels hidrogenions. Per una part, la manca d'oxigen estimula la glucòlisi anaeròbica per tal de disminuir el consum d'ATP, el que comporta un acúmulo d'àcid làctic i CO₂. Així mateix, durant la fase de reperfusió es produeix un augment del consum de glucosa el que afavoreix un major acúmulo d'àcids lliures. En aquest sentit sembla que el manteniment d'un petit flux durant la isquèmia cerebral podria ser més perjudicial que la isquèmia completa ja que mantindria un substrat continu per a la producció d'àcid làctic a través de la glucòlisi. Estudis realitzats per dilucidar l'efecte de l'hiperglicèmia a la isquèmia, han suggerit que nivells elevats de glucosa durant la fase d'isquèmia i de reperfusió poden ocasionar un major dany neuronal ja que afavoririen el manteniment de l'acidosi (Pulsinelli i cols., 1980).

I.2.2.2 DISFUNCIO DE NEUROTRANSMISSORS

La causa principal del dany neuronal secundari a la isquèmia és la manca de producció d'ATP. Malgrat que durant la fase de reperfusió es recupera la producció energètica, en moltes ocasions aquest fet no és suficient per evitar el dany cel·lular. Probablement l'acció de determinades substàncies durant la fase de reperfusió, com els neurotransmissors aminoàcids i amines biogèniques, és la que condiciona en part el dany neuronal. Així, l'augment d'amines biogèniques i neurotransmisors excitadors s'ha relacionat amb la progressió de les alteracions cel·lulars després de la isquèmia.

I.2.2.2.1 AMINES BIOGENIQUES

Les amines biogèniques actuen com a neurotransmissors i com a agents vasoactius. Varis estudis han especulat sobre la seva funció en la patogènia de la isquèmia cerebral sense que s'hagi pogut arribar a una conclusió definitiva. Així, durant la isquèmia es produeix una alteració a nivell sinàptic com a conseqüència de la manca d'energia, la qual cosa facilita l'alliberament massiu de catecolamines i 5-hidroxitriptamina (5-HT). Així mateix, durant la fase de reperfusió s'ha observat un augment de la síntesi de catecolamines (Gaudet i cols., 1978). Aquestes substàncies poden actuar a varis nivells. Per una part regulen el flux cerebral ja que afavoreixen al vasospasme i així poden augmentar l'àrea d'isquèmia. També actuen a nivell intravascular afavorint l'agregabilitat plaquetar i d'aquesta manera ocasionen un estasi intravascular que pot condicionar una progressió de l'àrea d'isquèmia (Spatz i cols., 1992).

Per altra part, l'excés de catecolamines lliures ocasiona una augment de l'autooxidació amb la producció de radicals superòxid els quals són tòxics per si mateixos, però a més també actuen afavorint la peroxidació dels lípids de la membrana (Fridovich, 1978) i la seva destrucció. Així mateix, l'excés d'amines biogèniques pot interferir la fosforilació oxidativa normal de la cadena respiratòria mitocondrial i, per tant, dificultar la producció d'ATP.

També s'ha observat després de la isquèmia una elevació moderada de l'AMP cíclic. Això podria ser conseqüència d'una excessiva estimulació de l'adenilciclase deguda a l'augment d'amines a l'espai postsinàptic (Hossmann, 1988). Es

desconeix amb exactitud la rellevància d'aquest fet però ja que els nucleòtids cíclics actuen com a segon missatger, la seva alteració pot condicionar canvis importants en el funcionament normal de la cèl·lula (Welch, Barkley, 1986).

En alguns models animals s'ha intentat manipular els nivells de catecolamines i 5-HT per tal de disminuir el dany cel·lular, però els resultats han sigut poc satisfactoris (Gustafson i cols., 1989).

I.2.2.2.2 NEUROTRANSMISSOR AMINOACIDS

En humans, el glutamat i altres neurotransmissor excitadors són essencials per a la funció neuronal normal encara que no es coneix amb exactitud quina és la seva acció en la bioquímica cerebral (Rothman i cols., 1986). Varis estudis han demostrat que en determinades circumstàncies poden actuar com a neurotòxics (Rothman i Olney, 1986; Choi i cols., 1987). En aquest sentit, s'ha observat que durant la isquèmia es produeix un augment en la concentració de glutamat extracel·lular (Drejer i cols., 1985, Rothman i cols., 1986, Mitani i cols., 1989, Albers i cols., 1989, Ueda i cols., 1992) el qual s'ha implicat en la patogènia del dany neuronal secundari a la isquèmia.

I.2.2.2.2.1 MECANISME D'ACCIO DEL GLUTAMAT

Des del punt de vista fisiopatològic, s'ha observat que l'augment de la concentració de glutamat a l'espai extracel·lular ocasiona un doble efecte. En

primer lloc, degut a l'activació dels receptors de glutamat lligats als canals iònics (NMDA), es produeix una entrada ràpida de Na^+ , K^+ i Ca^{2+} a l'interior de la neurona. Aquesta entrada d'ions s'acompanya del pas d'aigua per tal de compensar el canvi d'osmolaritat intracel·lular, el que condiciona un edema cel·lular. Per altra part, l'augment de glutamat ocasiona de forma retardada una obertura dels canals de calci voltatge-dependents, el que facilita una entrada de calci mantinguda (Rothman i cols., 1986). L'augment de calci intracel·lular afavorirà el desencadenament d'una sèrie de reaccions químiques que portaran, en última instància, a la mort cel·lular (Hass, 1983)

I.2.2.2.2 TEORIA DE L'EXCITOTOXICITAT EN LA ISQUEMIA

El concepte d'excitotoxicitat va néixer a partir d'un estudi realitzat amb cries de rates a les que s'injectava glutamat i altres aminoàcids excitadors via sistèmica, i s'estudiava el dany ocasionat a les cèl·lules de la regió cerebral periventricular. Des del punt de vista anatomopatològic es va observar que la regió més afectada d'aquestes cèl·lules corresponia a l'espai postsinàptic tant del soma com de les dendrites, sense trobar-se cap lesió ni a l'axó ni a l'espai presinàptic. Aquestes troballes suggerien una relació directa entre l'activació postsinàptica mediada pels aminoàcids excitadors i el dany neuronal (Meldrum, 1989).

Per altra part, estudis destinats a conèixer els mecanismes que ocasionen el dany cel·lular secundari a l'estat epilèptic varen demostrar que estava mediat per l'acció del glutamat. Aquest aminoàcid produïa una excitació cel·lular mantinguda

en àrees especialment sensibles, afavorint l'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula. En les cèl·lules del miocardi i del fetge s'havia observat que l'augment de calci intracel·lular ocasionava una important toxicitat. Aquestes troballes varen suggerir que aquest era el mecanisme a través del qual el glutamat actuava com a neurotòxic (Meldrum, 1989).

Així mateix, el dany cel·lular secundari a la isquèmia és, en determinats aspectes, similar a l'observat a l'estat epilèptic. Així, durant la reperfusió s'ha observat una descàrrega neuronal excessiva en les cèl·lules piramidals de CA1, amb un augment de glutamat a l'espai sinàptic que, mitjançant l'activació dels receptors NMDA entre altres, ocasiona una entrada massiva de calci. Aquestes troballes van suggerir que el mecanisme d'excitotoxicitat podia jugar també un important paper en la gènesi de la mort neuronal secundària a la isquèmia (Cheung i cols., 1986).

Altres observacions recolzen també la teoria del glutamat com agent causal del dany cel·lular induït per la isquèmia. En primer lloc, varis estudis han demostrat un augment dels nivells de glutamat a l'espai sinàptic durant la fase d'isquèmia i postisquèmia. En segon lloc, s'ha observat que la interrupció de les vies glutamatèrgiques pot disminuir la pèrdua neuronal selectiva a l'hipocamp després de la isquèmia cerebral (Pulsinelli i cols., 1985). Així mateix, el dany neuronal secundari a la isquèmia i el secundari a l'augment de glutamat sembla que estan mediat pel Ca^{2+} (Meldrum, 1989). Per últim s'ha observat que el bloqueig postsinàptic dels receptors de glutamat pot atenuar el dany neuronal secundari a la hipòxia-isquèmia (Albers i cols., 1989). L'administració d'elevades

concentracions de magnesi, les quals bloquegen la transmissió sinàptica i els receptors NMDA, disminueix el dany induït per la isquèmia en les neurones de la regió CA1 de l'hipocamp (Rothman i cols., 1983).

No es coneixen amb exactitud les causes de l'augment dels nivells de glutamat a l'espai sinàptic encara que probablement és degut a múltiples factors, Així, l'elevació de glutamat pot ser conseqüència tant d'un excés d'alliberament com d'una alteració en la recaptació neuronal i glial, o bé una combinació de les dues (Drejer i cols., 1985). Per altra part, no es coneixen els nivells neurotòxics de glutamat extracel·lular, però en estudis realitzats *in vitro* s'ha observat que l'exposició de cultius neuronals a nivells baixos de glutamat són suficients per ocasionar la mort cel·lular (Choi i cols., 1987).

I.2.2.2.2.3 ALTRES AMINOACIDS

L'àcid gamma-aminobutíric (GABA) és un altra aminoàcid que també es veu alterat per la isquèmia cerebral. S'ha observat un augment dels nivells de GABA cerebrals en animals sotmesos a anòxia cerebral. No es coneix amb exactitud el significat d'aquest increment ni la rellevància d'aquest fenomen, ja que el GABA no tan sols té efectes neurotransmissors sinó també metabòlics (Welch i Barkley, 1986).

1.2.2.3 CALCI

El calci exerceix una important funció en la regulació de l'homeostasi cel·lular. Actua com el gallet més important en l'alliberació de neurotransmissors, així com també en el control de l'excitabilitat neuronal, la integració dels senyals elèctrics, la plasticitat sinàptica, l'expressió gènica i la mort cel·lular programada (Schanne i cols., 1979; Peters, 1986; Desphande i cols., 1987; Andiné i cols., 1988; Choi, 1988; Lockshin i Zakeri, 1990; Miller, 1991).

En condicions normals, la concentració de calci en el medi extracel·lular és superior a la del medi intracel·lular (10^{-3} i 10^{-6} mmol, respectivament), per tal de crear un gradient de concentració el qual es manté per diferents mecanismes. En primer lloc, en condicions fisiològiques, la membrana plasmàtica presenta una permeabilitat molt baixa al calci (Schanne i cols., 1979), la qual pot augmentar si s'activa la cèl·lula (Siesjö, 1988). Així mateix, les organel·les intracitoplasmàtiques, mitocòndries i reticle endoplasmàtic (RE), poden emmagatzemar Ca^{2+} en el seu interior. En aquest sentit, les mitocòndries capten calci mitjançant un transportador electrogènic. La velocitat de captació està directament relacionada amb la concentració de calci en el citosol. La sortida de la mitocòndria té lloc mitjançant un intercanvi iònic: 2 ions de Na^{+} per un ió de Ca^{2+} . La velocitat d'aquest intercanvi depèn de la concentració de Na^{+} intracitoplasmàtica (Siesjö, 1988). Per altra part, el RE és també una organel·la important en l'homeostasi del calci i, en aquest sentit, acumula calci a través d'un transportador ATP-dependent. L'alliberació de calci des del RE està mediada per l'inositol trifosfat, un missatger hidrosoluble sintetitzat mitjançant l'activació de la fosfolipasa C. Així mateix,

determinats receptors de membrana associats a la fosfolipasa C es poden activar pel glutamat i afavorir l'entrada de calci a la cèl·lula (Miller, 1991).

En determinades situacions en que es produeix un augment del nivell de calci intracel·lular, l'entrada a les organel·les intracel·lulars resulta massa lenta, el que fa que el calci s'uneixi a substàncies tamponadores citoplasmàtiques tals com les proteïnes fixadores de calci: calmodulina, parvalbúmina, calbindina i calretinina, entre d'altres (Miller, 1991). La calmodulina participa en la regulació dels nivells de calci del citoplasma a través de la seva unió a l'enzim de la membrana plasmàtica Ca^{2+} -ATPasa afavorint la seva expulsió (Cheung, 1979; Baker i DiPolo, 1984). L'acció de les altres proteïnes no és del tot ben coneguda encara que se sap que contribueixen a la modulació dels nivells intracel·lulars de calci (Miller, 1991).

En condicions normals, l'excitació de la cèl·lula sigui quina sigui la causa, ocasiona una despolarització de la membrana que condiciona l'obertura dels canals de calci i el consegüent augment de la concentració de calci intracel·lular. Aquest increment ocasiona de forma directa o mitjançant la seva unió a proteïnes fixadores, l'activació de determinats enzims citoplasmàtics tals com quinases i fosfatases. Per altra part, el calci exerceix un efecte activador sobre els enzims mitocondrials piruvat-deshidrogenasa, oxiglutarat-deshidrogenasa i isocitrat-deshidrogenasa dependent del NAD, augmentant la producció d'ATP (Siesjö, 1988).

En situacions de isquèmia es produeix una alteració dels mecanismes reguladors del calci degut a una deplecció dels fosfats d'alta energia. La disminució energètica desencadena l'inici de l'anomenada cascada isquèmica (Figura 1) (Hass, 1983; Hara i cols., 1993). Així, al disminuir l'ATP, la bomba Ca^{2+} -ATPasa deixa d'actuar, el que ocasiona un acúmulo de Ca^{2+} intracel·lular. Aquest augment activa la fosforilasa A_2 produint un increment d'àcids grassos lliures en el citosol. Per altra part, la degradació de les membranes plasmàtica i mitocondrial per les fosfolipases, ocasiona una major permeabilitat per als petits ions permetent, en funció del gradient, l'entrada de calci i d'altres ions (H^+ , K^+ i Na^+) a les mitocòndries (Cheung, 1986). Si el període d'isquèmia no és suficientment prolongat i durant el període post-isquèmia es restableixen els mecanismes de respiració mitocondrial, és possible expulsar l'excés de calci i evitar el dany neuronal (Tsuda i cols., 1989). Però en situacions d'isquèmia prolongada, l'acció del glutamat afavoreix l'entrada de calci de forma retardada a través de l'activació dels canals iònics voltatge dependents, el que ocasiona un acúmulo de calci intracel·lular (Kirino, 1982, Pulsinelli, 1982, Araki 1989). S'ha observat que les àrees que presenten una mort cel·lular retardada en relació a la isquèmia, com la regió CA1 de l'hipocamp, són també les que presenten un acúmulo de calci en fases més tardanes postisquèmia (Dienel, 1984; Simon i cols., 1984; Suzuki i cols., 1985; Sakamoto i cols., 1986). Deshpande i cols., (1987) varen observar un acúmulo retardat de calci en les neurones de CA1 de l'hipocamp després de 10 minuts d'isquèmia. En aquest sentit, s'ha especulat que l'acúmulo de calci podria ser el responsable de la mort cel·lular retardada (Sakamoto i cols., 1986, Deshpande i cols., 1987, Araki, 1990a; Joó i cols., 1992) encara que altres estudis suggereixen que s'acumula en la fase terminal de cèl·lules prèviament desvitalitzades (Cheung i cols., 1986).

I.2.2.4 LIPOLISI

En condicions normals els fosfolípids de les membranes estan degradant-se i sintetitzant-se constantment, el que ocasiona una síntesi contínua d'àcids grassos lliures. En situacions de deplecció energètica, es produeix una inhibició de la resíntesi i un augment de la seva degradació a conseqüència de l'increment de calci, el que comporta un acúmulo d'àcids grassos lliures. Aquest augment condiciona una disminució de l'activitat de l'enzim Ca^{2+} -ATPasa, un alentiment de l'aclariment de glutamat de l'espai extracel·lular i una alteració de l'homeostasi iònica (Nerdergaard i cols., 1988).

I.2.2.5 RADICALS LLIURES

Els radicals lliures són substàncies molt reactives en els sistemes biològics capaços d'induir reaccions de polimerització i peroxidació lipídica, que poden resultar letals per la cèl·lula. Es produeixen com a resultat de la fosforilació oxidativa en la cadena de transport electrònic de la mitocòndria i els lisosomes, i durant la formació de prostaglandines i leucotriens. En condicions normals, a l'interior de les cèl·lules existeixen enzims (superòxid dismutasa i catalasa) per a catabolitzar els radicals lliures més freqüents: el superòxid i el peròxid d'hidrogen. A més, també hi ha agents reductors (àcid ascòrbic, glutatió i alfa-tocoferol) que actuen com a antioxidants i protegeixen a les cèl·lules de les accions dels radicals lliures (Butterfield i McGraw, 1978; Flamm i cols., 1978).

En situacions d'isquèmia s'ha demostrat un augment de Fe intracel·lular provinent de la degradació de la ferritina, els citocroms i de varis enzims que en contenen. El Fe s'uneix a l'ADP i catalitza varies reaccions que ocasionen la formació de radicals lliures (Rehncroma, 1980). Per altra part, durant la isquèmia s'ha observat una disminució dels nivells d'àcid ascòrbic (Flamm i cols., 1978) i glutatió, el que podria ser indirectament un índex de l'augment de radicals lliures (Rehncrona i cols., 1980).

Una de les accions atribuïdes als radicals lliures és la peroxidació lipídica, la qual pot tenir un paper important en la mort cel·lular induïda per isquèmia ja que afavoreix la destrucció de membranes (Weiloch i cols., 1982).

La formació de radicals lliures té lloc durant la fase de reperfusió després d'un període d'isquèmia si aquesta ha estat intensa, mentre que no s'observa si la isquèmia ha sigut incompleta (Kontos, 1989). Durant la reperfusió que segueix a la isquèmia la generació de radicals lliures depèn de varis mecanismes. En primer lloc, durant la isquèmia es redueixen alguns components de la cadena de transport electrònic mitocondrial. En la fase de reperfusió l'arribada d'O₂ afavoreix la reoxidació d'aquests components i la formació de radicals lliures (Kontos, 1989; Hara i cols., 1993). Per altra banda, durant la isquèmia es produeix una degradació de nucleòtids, formant-se adenina i hipoxantina, que en la fase de reperfusió i amb la presència de l'enzim xantina oxidasa poden ser degradats a xantina i àcid úric amb la conseqüent formació de radicals lliures (Betz, 1985). Així mateix, s'observa un augment de la concentració d'àcid araquidònic i altres àcids grassos insaturats que en la fase de reperfusió són ràpidament metabolitzats via ciclooxigenasa-PG-

hidroperoxidasa sintetasa, formant-se prostaglandines i leucotriens, generant radicals lliures (Kontos, 1989). Finalment també es poden generar radicals lliures a través de l'autooxidació de catecolamines i hemoglobina durant la reperfusió, així com també a través de les cèl·lules fagocítiques que generen radicals lliures via NADPH oxidasa.

A conseqüència de tots aquests mecanismes, durant la fase de reperfusió es produeix un augment dels radicals lliures, els quals tenen efectes neurotòxics ja que poden actuar tant a nivell vascular com cel·lular. No es coneix amb exactitud el seu lloc d'acció però se sap que són un dels principals mecanismes de l'edema cerebral i dany neuronal postisquèmia (Hayashi i Tsubokawa, 1991). Així mateix, els radicals lliures afavoreixen l'alliberament d'aminoàcids excitadors mantenint un cercle viciós en la patogènia de la isquèmia cerebral (Hara i cols., 1993).

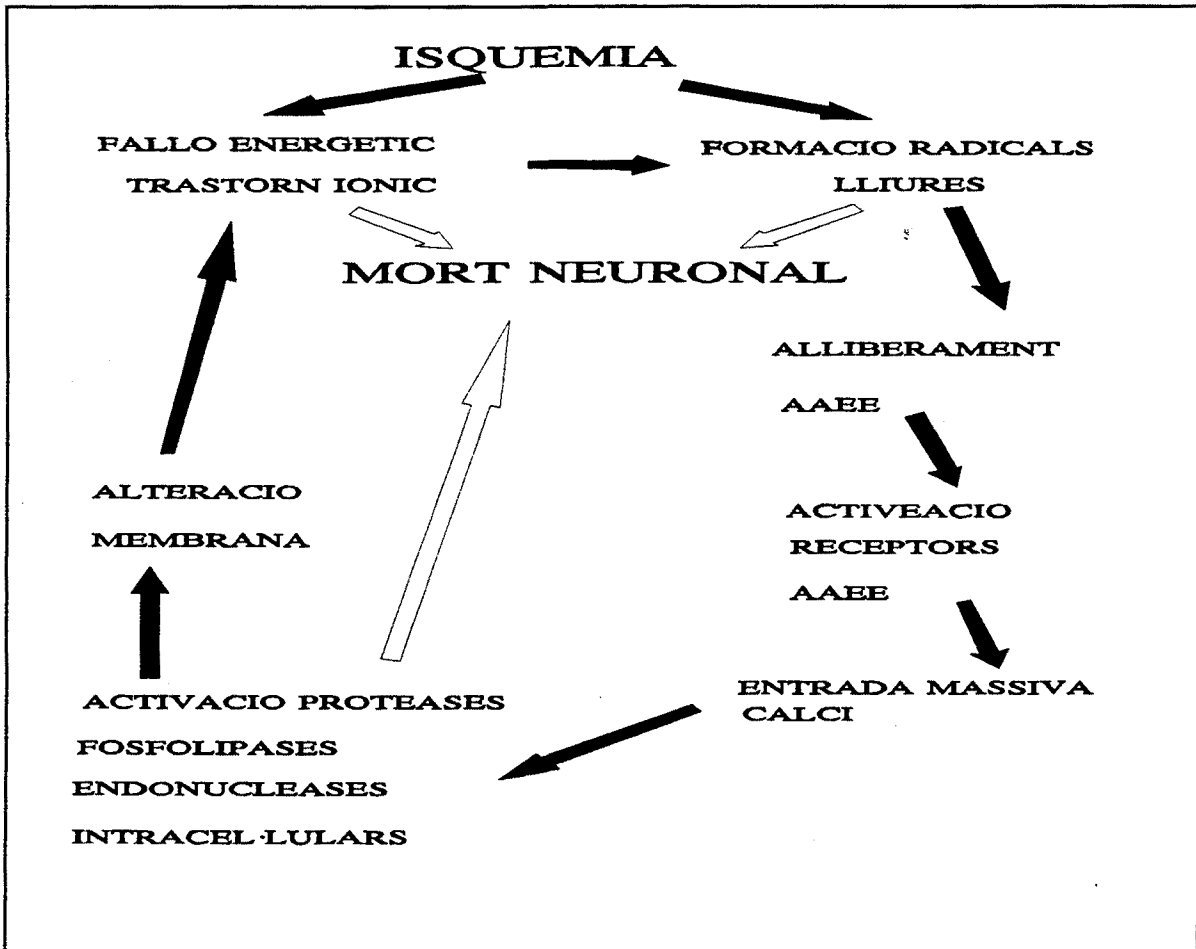


Figura 1. Mecanisme hipotètic del dany neuronal isquèmic. AAEE: aminoàcids excitadors.

I.3 NEUROPATHOLOGIA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

La isquèmia cerebral es caracteritza per una disminució del flux sanguini cerebral que ocasiona una alteració funcional i/o estructural de la neurona. La severitat de la lesió neuronal està en relació amb el grau d'isquèmia i a la seva duració. L'afectació del teixit cerebral depèn no sols de la severitat i duració de la isquèmia sinó també de la zona afectada (Brierley i Graham, 1984).

Des del punt de vista anatomopatològic, els canvis observats després d'un episodi d'isquèmia es caracteritzen per la microvacuolització del citoplasma com a conseqüència de dilatacions del reticle endoplasmàtic i de l'aparell de Golgi així com de la destrucció de les crestes i matriu mitocondrial. Posteriorment s'observen canvis en el nucli secundaris a la fragmentació de la cromatina. La progressió de les lesions intracel·lulars comporta una desestructuració de la membrana plasmàtica, del citoplasma i del nucli, que desembocarà finalment a la lisi cel·lular. Aquestes canvis tenen lloc no tan sols com a conseqüència de la isquèmia sinó també en relació a la fase de reperfusió (Brierley i Graham, 1984).

I.3.1 VULNERABILITAT CEL·LULAR

Les neurones són les cèl·lules nervioses més vulnerables al dèficit d'oxigen, encara que no totes presenten la mateixa sensibilitat. Així, les neurones filogenèticament més antigues són més resistents que les més noves. Per altra part, algunes neurones contenen determinades substàncies que s'han relacionat

amb una menor vulnerabilitat a la isquèmia. En aquest sentit, estudis recents han demostrat que en àrees molt sensibles a la isquèmia no totes les neurones degeneren davant el mateix episodi d'isquèmia. A la regió CA1 de l'hipocamp de rates (Schlander i cols., 1988) i jerbus (Nitsch i cols., 1989a i b; Nitsch, 1990), algunes interneurons GABA-èrgiques sobreviuen després d'isquèmia global transitòria. Aquesta menor vulnerabilitat s'ha relacionat amb la presència de parvalbúmina, una proteïna captadora de calci (Nitsch i cols., 1989b; Nitsch, 1992).

Estudis realitzats amb animals d'experimentació han permès un millor coneixement de la diferent vulnerabilitat regional davant la isquèmia, així com els canvis anatomopatològics en relació al temps de supervivència (Levine i Sohn, 1969; Kahn, 1972; Ito i cols., 1976). En aquest sentit, a partir de 6 hores postisquèmia és possible visualitzar els primers canvis anatomopatològics a les neurones de la regió CA4, que es caracteritzen per una microvacuolització del citoplasma. Aquestes alteracions són degudes a un efecte directe de la isquèmia. Si aquesta ha estat molt prolongada és possible visualitzar ja de forma inicial alteracions similars a les neurones de CA1. Però si la isquèmia no ha estat molt important, les modificacions de la regió de CA1 apareixen de forma retardada. Per altra part, a partir de les 24 hores postisquèmia s'observen alteracions reactives a la isquèmia a la regió CA2 i CA3 de l'hipocamp. Es caracteritzen per una inflor del citoplasma i un desplaçament del nucli cap a l'exterior. Aquests canvis directament relacionats o reactius a la isquèmia poden ser reversibles si l'anòxia no ha estat molt greu i a partir dels 21 dies postisquèmia les neurones poden mostrar un aspecte histològic normal (Ito i cols., 1975; Kirino, 1982).

A partir del 3^r-4^t dia de supervivència s'observen, per microscòpia òptica, les primeres alteracions a la regió CA1 de l'hipocamp (Ito i cols., 1975; Kirino, 1982; Crain i cols., 1988; Araki i cols., 1989). Es caracteritzen per una degeneració dels poliribosomes, amb proliferació del reticle endoplasmàtic i de l'aparell de Golgi, i per un acúmulo de material dens al citoplasma. Posteriorment s'observa una condensació del nucli amb una desestructuració cel·lular que culmina amb la mort neuronal (Morimoto i Yanagihara, 1981; Pulsinelli i cols., 1982; Kirino i Sano, 1984; Kirino i cols., 1984). Aquest fenomen d'aparició retardada se l'ha anomenat "fenomen de maduració" (Ito i cols., 1975) o "mort cel·lular retardada" (MCR) (Kirino, 1982). La MCR de CA1 té unes característiques pròpies que la diferencien de la degeneració cel·lular aguda directament relacionada o reactiva a la isquèmia (Figura 2).

Estudis ultraestructurals amb microscopia electrònica han demostrat canvis anatomopatològics a la regió CA1 de l'hipocamp visibles a partir de les 6 hores de supervivència postisquèmia (Deshpande i cols., 1992; Graham, 1992). Es caracteritzen per una dilatació de la part més distal de les dendrites i mitocòndries de les neurones de l'*estrat molecular* i *oriens*. Aquestes alteracions van progressant i després de 24 hores de reperfusió s'observa una microvacuolització de les dendrites amb pèrdua de microtúbuls. Estudis realitzats amb tècniques d'immunocitoquímica permeten visualitzar la progressiva pèrdua d'immunoreactivitat en els microtúbuls a partir de les 24 hores de reperfusió (Kitagawa i cols., 1989; Kudo i cols., 1990; Yanagihara i cols., 1990; Yoshimi i cols., 1991). En el citoplasma es visualitza una proliferació del reticle

endoplasmàtic i una desestructuració dels ribosomes. Més endavant aquests canvis seran més evidents i visibles ja per microscòpia òptica.

A part de les neurones, les cèl·lules glials també s'afecten de forma directa durant la isquèmia. En general, els canvis a l'astròglia tenen lloc quan les neurones s'han afectat de forma irreversible. La reacció astroglial és proporcional a la gravetat de la destrucció neuronal. Tècniques de immunohistoquímica amb proteïna glial fibril·lar acídica (GFAP) permeten demostrar la magnitud de la reacció astrocitària (Graham, 1992). En aquest sentit, a partir de les 48 hores postisquèmia s'observa una hiperplàsia i hipertròfia dels astròcits a l'hipocamp (Petito i cols., 1990). Per altra part, a les àrees més vulnerables s'observen de forma precoç canvis reactius en la micròglia (Morioka i cols., 1991; Gehrmann i cols., 1992). Aquests canvis precedeixen a les alteracions neuronals de la regió CA1 de l'hipocamp i del nucli ventral del tàlem. Així mateix, s'observen canvis reactius a la micròglia a altres regions poc vulnerables a la isquèmia com la regió CA3 de l'hipocamp. Sembla que l'acció de la micròglia no és tan sols la de fagocitar els restes cel·lulars de les neurones mortes sinó que, probablement, participa d'una forma activa en la progressió del dany neuronal secundari a la isquèmia (Gehrmann i cols., 1992).

I.3.2 VULNERABILITAT REGIONAL

Determinades àrees del cervell són més sensibles en front a la isquèmia i es poden afectar en situacions d'hipòxia-isquèmia poc greus i de curta durada. En

estudis realitzats amb individus que havien sofert una aturada cardio-respiratòria s'observà que les àrees més vulnerables a la isquèmia són la regió CA1 de l'hipocamp, seguit de les regions CA3 i CA4, i en menor grau la regió CA2. Així mateix, les neurones del nucli dorsolateral de l'estriat i la capa 3 del neocòrtex són també molt vulnerables a la isquèmia, mentre que les capes 5 i 6 serien discretament menys sensibles i les capes 1,2 i 4 són les que presenten una major resistència (Brierley i Graham, 1984). Aquesta major vulnerabilitat de l'hipocamp en front a la isquèmia pot explicar-se en part per la distribució anatòmica dels vasos que la irriguen. L'aport sanguini de l'hipocamp prové d'unes artèries de disposició tortuosa, la qual cosa podria dificultar l'arribada de sang a aquesta zona en situacions de baixa perfusió (teoria vascular). Per altra part, les neurones més susceptibles a la isquèmia sembla que presenten algunes característiques físiques i/o químiques que els hi condiciona una major vulnerabilitat (Kirino, 1982). En aquest sentit, les neurones més vulnerables a la isquèmia contenen un elevat contingut de receptors NMDA i, a més, es troben en àrees sinàpticament interrelacionades. En determinades situacions patològiques, com a la isquèmia cerebral, es produeix una excessiva alliberació de glutamat, el qual per estimulació dels receptors NMDA afavoreix una entrada massiva d'ions i aigua a l'interior de la cèl·lula. Tot això desencadena una sèrie de reaccions i alteracions intracel·lulars que aboquen en la mort neuronal (Crain i cols., 1988). Alguns estudis han observat que la destrucció de la via aferent excitadora de l'hipocamp pot protegir en part la degeneració postisquèmia de les cèl·lules piramidals de CA1. Això fa pensar que el mecanisme excitotòxic és un dels que intervenen en la progressió de la isquèmia, encara que segurament existeixen també altres factors (Kaplan i cols., 1989).

I.4 NEURONES GABA-ÈRGIQUES

Les neurones GABA-èrgiques són un grup heterogeni de neurones no piramidals que es caracteritzen per contenir el neurotransmissor GABA (Kosaka i cols., 1987 i 1988; Katsumaru i cols., 1988; Hendry i cols., 1989). Són neurones intrínseques de circuit local (Hendry i Jones, 1981; Fairen i cols., 1984) i la seva acció neurofisiològica es basa en que el GABA és el principal neurotransmissor inhibitor del sistema nerviós (Curtis i Johnston, 1974; Iversen, 1978; Krnjevic, 1974; Bland i cols., 1980). Mitjançant diferents tècniques s'ha pogut determinar la seva localització en el cervell. La visualització de les neurones GABA a través de tècniques d'immunocitoquímica amb anticossos contra l'enzim de síntesi glutamat decarboxilasa és una de les més utilitzades (Ribak, 1978a; Ribak i cols., 1979 i 1982; Hendrickson, 1982; Hendry i cols., 1983; Houser i cols., 1983). Altres formes de determinació han estat l'autoradiografia de la recaptació selectiva de GABA-[H³] (Hökfelt i Ljungdahl, 1972; Chronwall i Wolff, 1980; Hendry i Jones, 1981; Miller, 1988) i la determinació per histoquímica de GABA-T (Nagai i cols., 1983).

En el còrtex cerebral les neurones GABA-èrgiques es distribueixen per totes les capes, des de la II a la VI, sense predomini en cap d'elles (Parnavelas i McDonald, 1983; Miller, 1988). Els axons d'aquestes neurones formen sinàpsi principalment amb el soma de les neurones piramidals i també amb les dendrites i soma de cèl·lules no piramidals (Parnavelas i McDonald, 1983; Miller, 1986; Miller, 1988).

En el cervell de rata s'ha estudiat la distribució de les neurones GABA-èrgiques a l'hipocamp . Així, es localitzen predominantment a la capa piramidal de les regions CA1 i CA3, a la part profunda de l'*estratum radiatum* i a la part superficial de l'*estratum oriens* (Ganrani i cols., 1986). Es distribueixen en forma de plexe al voltant del soma i dendrites proximals de les neurones piramidals constituint el plexe de cèl·lules en cistella descrit per Ramon y Cajal (1911) i Lorente de Nó (1934). Cada cèl·lula en cistella té un plexe axònic que rodeja els cossos cel·lulars i la porció inicial de l'axó de vàries neurones piramidals del seu propi estrat i àrees veïnes (Strublely i cols., 1978). Això ocasiona un marcat efecte inhibitor sobre aquestes neurones, atribuït a l'efecte del GABA (Andersen i cols., 1964; Curtis i cols., 1970). A la fascia dentada les cèl·lules GABA-èrgiques es distribueixen principalment per la part profunda de la capa granular i, en menor quantia, en el límit entre la capa granular i l'hilus, i en l'estrat molecular (Gamrani i cols., 1986).

Les neurones GABA-èrgiques solen presentar colocalització amb determinats neuropèptids (colecistocinina, pèptid intestinal vasoactiu i somatostatina) i proteïnes fixadores de calci. La presència d'aquestes substàncies permet distingir diferents subpoblacions neuronals (Celio, 1990).

Des del punt de vista neurofisiològic les neurones GABA-èrgiques es caracteritzen per un elevat *firing rate* (Celio, 1986), ja que es tracta de neurones molt actives metabòlicament, amb un elevat contingut de l'enzim mitocondrial citocrom oxidasa.

I.5 PROTEINES CAPTADORES DE CALCI

El calci és un element imprescindible en el metabolisme cel·lular ja que és necessari en múltiples reaccions de l'organisme. Entre aquestes cal destacar la contracció muscular, l'estimulació i exocitosi de les glàndules endocrines, el manteniment de la integritat de les membranes i el transport axoplàsmic. Moltes de les seves accions no són del tot ben conegudes, encara que probablement actua com a segon missatger intracel·lular, de forma similar a l'AMPc (Celio, 1990).

Per a dur a terme cadascuna d'aquestes funcions cal mantenir uns nivells de calci intracel·lulars idonis. Concentracions excessivament elevades poden comportar alteracions importants en el metabolisme cel·lular i provocar la seva mort (Haynes, 1991). En aquest sentit, les proteïnes fixadores de calci són, entre altres, importants elements intracel·lulars encarregats de la correcta homeostasi del calci. La seva acció és primordial ja sigui com a cofactors de múltiples enzims, o bé com a tampons d'aquest element per evitar concentracions tòxiques (Celio, 1986).

La troponina C va ser la primera proteïna fixadora de calci de la qual es va conèixer el seu mecanisme d'acció. Se sap que actua com a reguladora de la contracció muscular mitjançant la seva unió amb la tropomiosina (Ebashi, 1960). Posteriorment i també en el múscul es va descriure la calmodulina. Es tracta d'una proteïna que també participa en la regulació de la contracció muscular mitjançant la seva unió amb el calci. En un primer moment es pensava que les proteïnes fixadores de calci sols es trobaven en el múscul, però l'aïllament de calmodulina en altres teixits de l'organisme va suggerir que la seva acció era més versàtil

(Cheung, 1980). A més de la troponina C i la calmodulina, actualment es coneixen altres proteïnes amb elevada afinitat pel calci: la calbindina D-28k (CaBP), la S-100 i la parvalbúmina. Totes elles, s'han descrit en diferents teixits de l'organisme, tals com el múscul, el ronyó, el testicle, la mucosa intestinal i, a excepció de la troponina C, també en el sistema nerviós central (SNC). En el SNC, la S-100 es troba en els astròcits, mentre que la calmodulina, CaBP i parvalbúmina es troben en determinats grups neuronals.

La parvalbúmina i la CaBP són proteïnes transport/tampó ja que actuen com a transportadors i com a tampons intracel·lulars del calci. La seva funció és menys versàtil que la de la calmodulina. L'acció més coneguda de la parvalbúmina és la de facilitar la relaxació en el múscul de contracció ràpida, captant el calci que queda lliure en el sarcolema i transportant-lo cap el reticle endoplasmàtic (Celio i Heizmann, 1981). Per altra part, es coneix que la CaBP actua facilitant el transport de calci a través de la mucosa intestinal (Wassermann i Taylor, 1966; Harmayer i De Luca, 1969). En el SNC, les neurones CaBP es troben en el neocòrtex i hipocamp de la majoria d'espècies en un subgrup d'interneurones inhibidores que utilitzen el GABA com a neurotransmissor. La funció de la CaBP no és del tot coneguda, però es pensa que actua com un tampó de calci intracel·lular i permet que determinades neurones tinguin un millor control dels nivells de Ca^{2+} i de la capacitat d'excitabilitat (Sloviter, 1989).

Al igual que les neurones parvalbúmina, les cèl·lules amb immunoreactivitat per la CaBP poden presentar una major resistència a determinades situacions

patològiques, com l'epilèpsia d'origen criptogènic o la isquèmia cerebral transitòria (Freund i cols., 1990; Sloviter i cols., 1991; Goodman i cols., 1993).

I.5.1 PARVALBUMINA

La parvalbúmina és una proteïna àcida de baix pes molecular que es troba en un subgrup d'interneurons GABA-èrgiques tant del neocòrtex com de l'hipocamp (Celio i Heizmann, 1981; Celio, 1986; Celio i cols., 1988; Kita i cols., 1990; van Brederode i cols., 1991). A l'hipocamp, les cèl·lules amb immunoreactivitat per a la parvalbúmina es troben primordialment a l'*estratum piramidale* i *estratum oriens*, en menor número a l'*estratum radiatum*. A la fascia dentada es distribueixen sobretot per la capa granular i l'hilus, encara que també és possible observar alguna neurona amb immunoreactivitat per a la parvalbúmina a la capa molecular (Kosaka i cols., 1987; Celio, 1990). Els cossos neuronals tenen primordialment forma poligonal i poden ser de diferents mides (Celio, 1990; Braak i cols., 1991; Höchli i cols., 1991). Morfològicament es tracta de neurones en cistella o cèl·lules axo-axòniques (Chandelier) (Kosaka i cols., 1987, DeFelipe 1989, Hendry i cols., 1989, Nitsch i cols., 1990, Blümcke 1991) encara que també se n'han descrit d'altres formes (Braak i cols., 1991).

Els axons que emergeixen de les cèl·lules de la capa piramidale i granular es distribueixen per l'estrat lacunos-molecular (Celio, 1990). A la capa piramidale s'observa una densa xarxa de terminacions immunoreactives per a parvalbúmina que rodegen els cossos neuronals de les cèl·lules piramidals (Katsumaru i cols.,

1988; Celio, 1991; Braak i cols., 1991; Höchli i cols., 1991). Les dendrites de les cèl·lules de la capa piramidal, es projecten cap a l'*estratum oriens* i *estratum radiatum* (Katsumaru i cols., 1988; Celio, 1991).

Malgrat la morfologia i distribució de les neurones parvalbúmina és similar en les diferents espècies, existeixen algunes variacions (Kosaka i cols., 1987; Katsumaru, 1988; Sloviter, 1989; Celio, 1990; Nitsch i cols., 1990; Soriano i cols., 1990; Höchli i cols., 1991; Braak i cols., 1991; Ferrer i cols., 1991 i 1992b; Sloviter i cols., 1991). Així, en el jerbu, a diferència de la rata i els humans, la via perforant, una projecció excitadora del còrtex entorrinal a la fascia dentada, conté neurones amb immunoreactivitat per a la parvalbúmina (Scotti i Nitsch, 1991). La presència d'aquestes neurones inhibidores pot ocasionar una menor excitació de les neurones de la fascia dentada. Aquesta particularitat s'ha relacionat amb la generació i manteniment de les convulsions, a les quals és tant susceptible aquesta espècie (Loskota i cols., 1974; Cohn, 1979; Dam i cols., 1981; Paul i cols., 1981). Per altra part, els jerbus contenen menys neurones parvalbúmina a la regió CA1 i les seves dendrites són menys immunoreactives que a CA3 i a la fascia dentada (Seto-Oshima i cols., 1990).

Des del punt de vista fisiològic, les neurones de l'hipocamp que contenen parvalbúmina són neurones *fast spiking*. Aquestes cèl·lules són capaces de descarregar a altes freqüències i no s'adapten a situacions de despolarització mantinguda. Aquesta propietat s'ha relacionat amb la presència de la proteïna parvalbúmina la qual actuarà com a tampó intracel·lular del calci suprimint

l'elevació de Ca^{2+} secundari a les descàrregues repetitives i bloquejant l'adaptació deguda a l'activació mantinguda (Kawaguchi, 1987; Blümcke, 1991).

La capacitat d'actuar com a tampó intracel·lular del calci s'ha relacionat amb una menor vulnerabilitat d'aquestes neurones en front a situacions adverses (Nitsch i cols., 1989; Freund i cols., 1991; Nitsch i cols., 1992). Estudis realitzats després d'isquèmia cerebral transitòria han suggerit una major resistència de les neurones que contenen parvalbúmina (Nitsch i cols., 1989; Nitsch, 1990; Johansen i cols., 1990; Nitsch, 1992), encara que altres treballs contradiuen aquestes teories (Freund i cols., 1990).

I.6 MORT CEL·LULAR DURANT EL DESENVOLUPAMENT

La mort cel·lular natural és un procés normal durant el desenvolupament del sistema nerviós de múltiples espècies. Els primers estudis realitzats varen demostrar mort cel·lular durant el desenvolupament en ocells, rèptils i amfibis, però més tard s'ha demostrat el mateix fenomen durant la fase embrionària i vida postnatal dels mamífers (Lockshin i Zakeri, 1990; Ferrer i cols., 1992). En aquests, s'ha observat en la medulla espinal, la retina i les seves connexions, el nucli parabigeminal, el cerebel (Oppenheim, 1991), l'hipocamp (Ferrer i cols., 1990), el neocòrtex, la subplaca cortical i la futura substància blanca subcortical (Ferrer i cols., 1992). En el complex hipocampal, la mort durant el desenvolupament predomina en la subplaca cortical i placa cortical del subiculum, i a l'*estrat oriens* i capa piramidal de les regions CA1 i CA3 (Ferrer i cols., 1992).

El mecanisme de producció d'aquest fenomen no es coneix amb exactitud, però se sap que es tracta d'un mecanisme actiu regulat per múltiples gens els quals s'activen davant determinats estímuls i desencadenen una sèrie de processos que acabaran amb la mort de la cèl·lula (Oppenheim, 1991; Ellis i cols., 1991). L'activació o supressió d'aquests gens depèn de mecanismes no del tot coneguts que poden estar relacionats amb l'acció de factors hormonals i/o factors tròfics els quals actuarien sobre cèl·lules predisposades i desencadenarien el procés de mort neuronal (Lockshin i Zakeri, 1990; Oppenheim i cols., 1990; Oppenheim, 1991). Estudis realitzats amb el nematode *Caenorhabditis elegans*, han demostrat que l'activació dels gens *ced-3* i *ced-4* comporta la síntesi de mRNA i proteïnes que s'encarregarien del procés de mort cel·lular (Ellis i cols., 1991). La mort cel·lular

natural durant el desenvolupament és un procés actiu que requereix que els mecanismes de síntesi proteica restin intactes. Així, l'administració de substàncies inhibidores de la síntesi de proteïnes, com per exemple la cicloheximida, disminueix de forma significativa la mort natural durant el desenvolupament en el neocòrtex de rates (Ellis, i cols., 1991; Oppenheim, 1991; Ferrer, 1992).

Per altra part, l'alteració de factors tròfics cel·lulars pot també modificar el procés natural de mort durant el desenvolupament (Lockshin i Zakeri, 1990; Oppenheim i cols., 1990; Ellis i cols., 1991). El factor de creixement nerviós (NGF) s'ha relacionat amb la conservació cel·lular, i la seva absència pot desencadenar el procés de mort. Alguns autors han demostrat que l'administració intratecal de NGF en rates disminueix la mort natural programada (Ellis i cols., 1991). Aquest fenomen podria indicar que determinades cèl·lules inicien el procés de mort davant l'absència de NGF.

La mort natural durant el desenvolupament és una mort de tipus nuclear, molt similar a l'apoptosi (Ferrer i cols., 1991; Oppenheim, 1991; Gerschenson i Rotello, 1992). Es caracteritza per l'activació d'endonucleases que ocasionen la fragmentació de la cromatina nuclear en segments d'una longitud específica. Des del punt de vista anatomopatològic, el nucli adopta un aspecte fragmentat i encongit, altament basòfil, envoltat d'un petit halo eosinòfil que correspon al citoplasma (Ferrer i cols., 1991; Ellis i cols., 1991; Oppenheim, 1991).

I.7 PROTEÏNA PRECURSORA BETA-AMILOIDE

La proteïna precursora Beta-amiloide (APP) és una molècula de gran mida, que forma part d'una família de polipèptids codificats tots ells pel mateix gen, el qual es localitza en el cromosoma 21. El gen de l'APP s'expressa a pràcticament tots els teixits de l'organisme (Selkoe et al., 1988). No es coneix bé quines són les seves funcions però a nivell cerebral es pensa que és una proteïna destinada als axons i terminals nervioses la qual pot estar relacionada amb la preservació de les connexions neuronals. Es sintetitza en el soma cel·lular i després és transportada cap al final de l'axó, on s'insereix a la membrana cel·lular de forma similar a un receptor de superfície (Kang et al., 1987; Koo et al., 1990). Una funció atribuïda a la APP és el manteniment del creixement i de la supervivència cel·lular. En aquest sentit, estudis realitzats amb un pèptid sintètic homòleg a la proteïna Beta-amiloide (P β A) han demostrat que augmenta la supervivència i estimula les ramificacions neurítiques de les neurones de l'hipocamp de rata en cultius cel·lulars (Whitson et al., 1990). Altres autors han descrit que en condicions adequades, la P β A a dosis baixes pot augmentar la supervivència de neurones de rates en cultius en fresc (Yankner et al., 1990). Per altra part, la idea d'una funció neurotròfica de la P β A es veu recolzada pel fet de que la APP té unes característiques estructurals similars al precursor del factor de creixement epidèrmic (Allsop et al., 1988).

A nivell del sistema nerviós, l'expressió de APP s'ha vist augmentada en determinades situacions d'estrès cel·lular, com ara la injecció d'àcid ibotènic i kaínic (Siman et al., 1989; Nakamura et al., 1992), l'axotomia (Palacioes et al.,

1992), l'administració de colquicina (Shigematsu i Mc Geer, 1992) i la isquèmia cerebral (Stephenson et al., 1992).

I.8 MECANISMES DE NEUROPROTECCIO

Durant els darrers anys, la investigació per al tractament de la isquèmia cerebral s'ha encaminat cap a l'estudi de fàrmacs que puguin influenciar el procés metabòlic que té lloc després de la isquèmia. Moltes d'aquestes substàncies s'han demostrat efectives solament en models experimentals i molt poc o no s'han pogut analitzar en humans (Grotta, 1987; Goldstein i cols., 1989; Rosenbaum i cols., 1991). Així, diversos estudis han proposat l'administració d'antagonistes del calci com a tractament per a disminuir els efectes adversos de la isquèmia, encara que molts d'ells han estat fets sols en models experimentals i amb resultats molt heterogenis (Cheung, i cols., 1986; Berger i Hakim, 1988; Grotta i cols., 1990; Kostron i cols., 1990; Hara i cols., 1990; Rosenbaum i cols., 1991). Per altra part, alguns treballs han suggerit que l'administració d'antagonistes del glutamat podria disminuir el dany cel·lular secundari a la isquèmia (Albers i cols., 1989; Haba i cols., 1991; Warner i cols., 1991; Lysko i cols., 1992).

En estudis experimentals, també s'han utilitzat altres substàncies basant-se en la fisiopatologia de la isquèmia cerebral. Així, s'ha analitzat l'efecte de diversos inhibidors de la síntesi proteica (cicloheximida, anisomicina i actinomicina) (Goto i cols., 1990; Shigeno i cols., 1990; Papas i cols., 1992. Desphande i cols., 1992) així com també l'acció de factors tròfics (NGF i bFGF) (Shigeno i cols 1991; Yamada i cols., 1992) o la fructosa-1,6-difosfat (Farias i cols., 1989; Gregory i cols., 1989; Farias i cols., 1990; Gregory i cols., 1990; Trimarchi i cols., 1990), relacionats tots ells amb una disminució del dany neuronal induït per la isquèmia.

I.8.1 SINTESI PROTEICA I MORT CEL·LULAR RETARDADA INDUIDA PER ISQUEMIA

En varis estudis s'ha observat que després d'isquèmia cerebral transitòria es produeix una inhibició de la síntesi proteica de forma global en tot el cervell i, primordialment, a la regió CA1 de l'hipocamp (Kleihues i Hossmann, 1971; Takahashi i cols., 1984; Dienel i cols., 1985; Kiessling i cols., 1986; Dwyer i cols., 1987; Araki i cols., 1990; Inuzuka i cols., 1990; Widmann i cols., 1991; Mies i cols., 1992). Malgrat això, també s'ha observat durant la primera hora postisquèmia un augment transitori de la síntesi de proteïnes a la regió CA1 de l'hipocamp (Charriaut-Marlangue i cols., 1992). Per altra part, malgrat la inhibició de síntesi proteica que té lloc després de la isquèmia, s'ha observat un augment de la síntesi de proteïnes de xoc o estrès (HSP) (Nowak, 1985; Jacewicz i cols., 1986; Dienel i cols., 1986; Vass i cols., 1988; Chopp i cols., 1991; Nowak, 1991; Kirino i cols., 1991; Desphande i cols., 1992; Li i cols., 1992; Welsh i cols., 1992). No es ben coneguda la funció d'aquestes proteïnes, però la seva inducció s'ha relacionat amb un increment de la resistència en front a determinades agressions (Lindquist i Craig, 1988). A nivell cerebral la inducció de HSP 70kDa després d'isquèmia transitòria s'ha relacionat amb una menor vulnerabilitat cel·lular (Kirino i cols., 1991). En jèrbus s'ha observat que la regió CA1 de l'hipocamp, la qual és la més sensible a la isquèmia, presenta una menor immunoreactivitat per HSP 70 KDa que les regions CA2 i CA3, les quals són més resistents. Aquestes troballes reforcen la teoria que la síntesi de proteïnes de xoc representa un mecanisme de protecció cel·lular (Vass i cols., 1988).

Per altra part, en altres estudis s'ha observat que l'administració de substàncies inhibidores de la síntesi proteica podria disminuir el dany induït per isquèmia. Així, s'ha postulat que la MCR és un procés actiu similar a la mort natural durant el desenvolupament, mediat per la síntesi de proteïnes *killer* (Goto i cols., 1990; Shigeno i cols., 1990). Goto i cols., (1990) varen observar que l'administració de cicloheximide a rates després d'una isquèmia cerebral transitòria, a diferents dosis i temps de supervivència, disminuïa en tots els casos la mort cel·lular retardada a CA1. Així mateix Shigeno i cols., (1990), varen observar resultats similars després de l'administració d'anisomicina a rates una hora abans de la isquèmia. Malgrat aquests resultats, treballs posteriors han demostrat que l'efecte beneficiós de la cicloheximida no és tant homogeni i en un estudi d'isquèmia en jerbus sols es va observar milloria si s'administrava 1 hora abans o durant la primera hora postisquèmia (Papas i cols., 1992). La injecció de cicloheximida en un temps posterior augmentava la mortalitat dels jerbus i el dany secundari a la isquèmia (Deshpande i cols., 1992; Papas i cols., 1992). L'explicació d'aquest fenomen podria ser que l'administració de cicloheximida en les fases precoces o prèvies a la isquèmia inhibiria la síntesi de proteïnes *killer* i així disminuiria el dany neuronal. Contràriament, en fases de reperfusió més avançades, en les quals ja està inhibida la síntesi de proteïnes per la pròpia isquèmia, l'administració d'aquestes substàncies potenciaria aquest fenomen i afavoriria la mort (Papas i cols., 1992).

1.8.2 FACTORS TROFICS

Diversos estudis han demostrat que després d'un dany neuronal es produeix un augment transitori dels nivells de NGF tant a l'hipocamp com al neocòrtex (Nieto-Sampedro i cols., 1982; Hashimoto i cols., 1992). En aquest sentit, s'han observat canvis similars després d'isquèmia cerebral transitòria i s'ha especulat que la pèrdua neuronal de CA1 podria ser conseqüència, entre altres, de la deplecció del NGF. Per altra part, s'ha observat un augment tardà després de la isquèmia dels nivells de NGF, tant a l'hipocamp com al neocòrtex, al cap d'una setmana d'haver-se produït una anòxia cerebral (Lorez i cols., 1989; Hashimoto i cols., 1992). Aquest augment podria ser conseqüència d'una producció de NGF per part de la neuròglia reactiva que apareix a la zona infartada (Lorez i cols., 1989; Hashimoto i cols., 1992) i, per tant, no seria un indicador de recuperació cel·lular.

Per altra banda, alguns estudis han suggerit que la mort cel·lular retardada observada a la regió CA1 podria ser en part conseqüència de la deplecció inicial de NGF a les regions de CA2 i CA3. Aquestes àrees envien eferències excitadores a la regió CA1 i la manca d'aquest estímul podria afavorir la degeneració neuronal (Hashimoto i cols., 1992).

Alguns autors han proposat que la injecció intratecal de NGF podria prevenir la mort cel·lular retardada induïda per la isquèmia. En aquest sentit, s'ha postulat que l'augment de la concentració de NGF a l'hipocamp permetria la seva acció en neurones amb pocs receptors per a NGF. Així mateix, s'ha suggerit que algunes

neurones podrien expressar els seus receptors en relació a la concentració de NGF. Així, estudis realitzats amb dosis baixes de NGF no han observat cap efecte beneficiós (Beck i cols., 1992) i per aquest motiu es pensa que l'efecte beneficiós podria estar en relació a la dosi administrada (Buchan i cols., 1990; Shigeno i cols., 1991; Yamamoto i cols., 1992).

I.8.3 ANTAGONISTES RECEPTORS NMDA

L'activació dels receptors NMDA durant la isquèmia s'ha relacionat amb el mecanisme d'excitotoxicitat. Per això s'ha suggerit que els antagonistes dels receptors NMDA podrien disminuir el dany neuronal secundari a la isquèmia.

Segons el mecanisme d'acció podem distingir dos tipus d'antagonistes dels receptors NMDA. En primer lloc els antagonistes competitius els quals actuen bloquejant directament la zona de reconeixement del glutamat. En segon lloc, els antagonistes no competitius, els quals bloquejarien els canals iònics de tal manera que disminuiria la seva conductància (Kemp i cols., 1987; Albers i cols., 1988; Barnes, 1988).

Els antagonistes competitius veuen dificultada la seva acció per la presència a l'espai sinàptic d'una elevada concentració d'agonistes NMDA, la qual cosa impediria la seva unió (Watkins i cols., 1987; Albers i cols., 1989). Per altra part, els antagonistes no competitius tals com la PCP, MK-801, SFK-10.047, ketamina i benzomorfan, poden veure dificultada la seva acció per l'estat de despolarització

de la membrana, ja que són altament dependents del voltatge (Kemp i cols., 1987; Albers i cols., 1989). De totes formes, en estudis realitzats amb humans, els antagonistes no competitius són més ben tolerats, sobretot a dosis baixes (Albers i cols., 1989).

Estudis *in vivo* i *in vitro* han demostrat que l'administració d'antagonistes dels receptors NMDA en situacions d'hipòxia-isquèmia actuaría com a neuroprotector (Lightfoote, i cols., 1977; Olney i cols., 1986; Rothman i cols., 1987; Church i cols., 1988; Marcoux i cols., 1988; Gill i Kemp, 1989; Urban i cols., 1990; Uemura i cols., 1991; Warner i cols., 1991; Hewitt i Corbett, 1992; Lysko i cols., 1992) augmentant la supervivència i funcionalitat de les cèl·lules en situació d'hipòxia-isquèmia.

Actualment, el fàrmac més estudiat i que proporciona resultats més satisfactoris és el MK-801. A l'estudiar el seu mecanisme d'acció s'ha observat que pot produir hipotèrmia i s'ha especulat que algun dels seus efectes podria estar més en relació amb aquesta disminució de la temperatura que no amb l'efecte antagonista del glutamat (Lightfoote, i cols., 1977; Church i cols., 1988; Marcoux i cols., 1988; Gill i Kemp, 1989; Uemura i cols., 1991; Warner i cols., 1991; Hewitt i Corbett, 1992). Darrers estudis realitzats amb SKF-10.047, un altre antagonista no competitiu, mostren que poseeix una major eficàcia ja que té una acció més ràpida, els seus efectes apareixen fins i tot si s'administra després de la isquèmia, i no produeix una hipotèrmia tant marcada (Lysko i cols., 1992).

Cal destacar però, que varis estudis demostren que els efectes neuroprotectors d'aquestes substàncies tenen una sèrie d'inconvenients. En primer lloc, el seu efecte beneficiós es limita a una zona molt concreta del cervell. En segon lloc, es requereixen dosis molt elevades i que en alguns casos poden ser tòxiques. Per altra part, els resultats presenten una elevada variabilitat individual, el que dificulta la seva interpretació. Finalment, les cèl·lules piramidals preservades no són histològicament normals (Urban i cols., 1990; Warner i cols., 1991). Tot això suggereix que caldrien més estudis per a determinar la viabilitat d'aquests fàrmacs i el seu possible ús en la patologia humana.

I.8.4 ANTAGONISTES DEL CALCI

L'administració d'antagonistes dels canals de calci en la prevenció i tractament de la isquèmia cerebral està basada en el seu efecte vasodilatador i en la capacitat de bloquejar l'entrada massiva de calci en situacions d'isquèmia (Greenberg, 1987). El seu mecanisme d'acció en la isquèmia cerebral global estaria relacionada amb el fenomen de "no reflux" que té lloc després de la isquèmia. Aquest fenomen consisteix en una progressiva disminució del flux cerebral que s'observa després de la fase d'hiperèmia que segueix a la isquèmia cerebral global (Astrup i cols., 1981). Aquest fet ha rebut varies explicacions al llarg del temps, però els darrers treballs suggereixen que és degut a un vasospasme cerebral secundari a la entrada massiva de calci en el múscul llis vascular anòxic (Van Neuten i cols., 1980). Aquests estudis també suggereixen

que la vasodilatació que ocasionen els antagonistes del calci afavoreix la recuperació cerebral postaturada cardíaca (White i cols., 1983).

Els estudis experimentals amb antagonistes del calci han mostrat també un efecte neuroprotector, tant en la isquèmia focal (Heffez i Passonneau, 1985; Kucharczyk i cols., 1989) com en la isquèmia cerebral global (Steen i cols., 1985). Per altra part, l'ús preventiu d'antagonistes del calci en animals d'experimentació ha mostrat bons resultats (Steen i cols., 1985). Així, l'administració experimental de fàrmacs bloquejants del calci després d'una aturada circulatoria controlada amb circulació extracorpòrea s'ha associat a un manteniment del flux cerebral després de l'aturada (White i cols., 1983).

Els estudis realitzats fins aquest moment suggereixen un efecte beneficiós dels agents bloquejants dels calci en la isquèmia cerebral, sobretot si s'administren de forma precoç, encara que són necessaris més treballs per a determinar l'abast exacte d'aquest benefici.

I.8.5 FRUCTOSA-1,6-BISFOSFAT

La fructosa-1,6-bisfosfat (FBP) és un metabòlit intermedi de la glucòlisi que es sintetitza mitjançant l'enzim fosfofructoquinasa a partir de la fructosa-6-fosfat. Actua com a modulador de vèries vies metabòliques intracel·lulars a través de l'activació de diversos enzims tals com fosfofructoquinasa, piruvatoquinasa i lactat deshidrogenasa. En aquest sentit, inhibeix la glucògenolisi i la gluconeogènesi, així

com també bloqueja la utilització de la glucosa per qualsevol altra via que no sigui la glucòlisi, la qual cosa estimula la producció d'ATP. També afavoreix la síntesi d'àcids grassos i fosfolípids (Giacosa i cols., 1987). Alguns estudis han suggerit que la seva administració exògena en situacions d'hipòxia miocàrdica pot millorar la supervivència postinfart tant en humans (Markov i cols., 1984; Marchionni i cols., 1985) com en animals d'experimentació (Markov i cols., 1980). No es coneix quin és el seu mecanisme d'acció ni tampoc si després d'administrar-la exògenament és capaç de travessar la membrana plasmàtica o bé si actua interaccionant amb un receptor d'aquesta. De totes maneres, no s'han descobert zones específiques d'unió a la membrana (Giacosa i cols., 1987; Gregory i cols., 1989).

A part del seu efecte en la isquèmia miocàrdica, altres estudis han suggerit un efecte beneficiós també en la isquèmia renal en rates (Didlake i cols., 1985), en la recuperació d'una aturada cardio-respiratòria en humans (Jones i cols., 1980), en hepatitis induïda per tòxics (De Oliveira i cols., 1992), en la recuperació d'un coma hipoglucèmic (Farias i cols., 1989) i també en el dany cerebral secundari a isquèmia tant *in vivo* (Farias i cols., 1990; Trimarchi i cols., 1990) com *in vitro* (Gregory i cols., 1989; Gregory i cols., 1990).

S'han postulat varis possibles mecanismes d'acció de la FDP per explicar l'augment d'ATP i el manteniment de la glucòlisi en situacions d'hipòxia. En primer lloc, podria tractar-se d'un efecte a nivell de la membrana plasmàtica impeding l'entrada massiva de calci a l'interior de la cèl·lula en situacions d'isquèmia (Bickler i Kelleher, 1992). Per altra banda, el fet que millori els símptomes d'un coma

hipoglicèmic suggereix que, malgrat la presència de fosfats, és capaç de travessar membranes biològiques (Farias i cols., 1989). En aquest sentit, la seva acció podria ser deguda a que mantingués la via de la glucòlisi a partir de fer un *by-pass* a la reacció sintetitzada per la fosfofructoquinasa (Markov, 1986). Finalment, altres estudis han suggerit que el seu efecte beneficiós pot estar relacionat amb una inhibició de la producció de radicals lliures (Markov i cols., 1987; Farias i cols., 1990).

No tots els estudis realitzats fins ara en hipòxia cerebral han demostrat un efecte beneficiós de la FBP. Així, en un model experimental d'hipòxia neonatal en porquets no es va observar cap milloria amb la seva administració (Le Blanc i cols., 1991). Aquests resultats contradictoris i la dificultat d'explicar la capacitat de travessar barreres biològiques obliga a la realització de nous estudis per tal de poder conèixer millor les accions de la FBP.

I.9 NECESSITAT D'UN MODEL EXPERIMENTAL

Des de fa més de 150 anys, els científics han dissenyat models animals per a l'estudi de la patologia vascular cerebral (PVC) i s'han esforçat en imitar, el millor possible, les condicions fisiopatològiques que envolten aquesta patologia en humans. L'ús de models animals ha representat un avanç en el coneixement de la fisiopatologia de la PVC i en l'assaig de noves terapèutiques. Malgrat això, en moltes ocasions pot resultar difícil extrapolar els resultats a la patologia vascular humana. Per altra part, és imprescindible la realització dels estudis amb gran rigurositat i amb un control estricte del major número de paràmetres que poden interferir en els resultats (Pulsinelli, Buchan, 1989).

Sembla lògic pensar que els millors models per a l'estudi de la PVC són els animals més semblants a l'home. Malgrat que la seva manipulació és més senzilla, l'ús d'animals d'experimentació de gran mida (primats, gossos, etc) comporta importants dificultats degut a la gran variabilitat anatòmica que presenten, així com a l'elevat cost econòmic i als aspectes ètics. Per aquest motiu, els animals més usats en l'estudi de la PVC són els rosegadors: rates i jerbus. Per les seves característiques anatòmiques, el jerbu petit de Mongòlia (*Meriones unguiculatus*) és el model més usat. Es tracta d'un rosegador petit, originari dels deserts de la Xina i Mongòlia. Es caracteritza per la manca de polígon de Willis amb falta de comunicació entre el sistema carotidi i el sistema vètrebro-basilar en el 80 % dels casos (Levine, Sohn, 1969; Kahn, 1972; Ito i cols., 1976). Aquesta característica fa que l'oclusió d'ambdues artèries caròtides comuns ocasioni una isquèmia bihemisfèrica. En el cas d'oclusió unilateral de l'artèria caròtida comú es produeix

en el 30-40% dels casos un infart hemisfèric unilatreal (Dodson i cols., 1977; Ginsberg i Busto, 1989). Un estudi realitzat per Berry i cols., a l'any 1975 va demostrar que la majoria de jerbus tenen absència de comunicació entre el sistema arterial posterior i el sistema carotidi. Aquestes característiques anatòmiques permeten reproduir lesions similars en diferents animals, el que representa una avantatge important pel seu ús com a model experimental d'isquèmia.

Per contra, la petita mida dels jerbus (50-80 gr) comporta gran dificultat en la seva manipulació i en la realització de monitoritzacions rutinàries. Així mateix, la susceptibilitat d'aquesta espècie per a patir crisis comicials pot dificultar l'anàlisi dels símptomes secundaris a la isquèmia.

II. HIPOTESI I OBJECTIUS

II.1 HIPOTESI DE TREBALL

A la introducció s'ha analitzat la importància de la patologia vascular cerebral en el món occidental i les seves repercussions socials. L'objectiu central d'aquesta tesi ha estat l'estudi de determinats aspectes de la patologia vascular cerebral isquèmica mitjançant l'ús d'un model experimental prèviament validat.

A la gènesi de la mort cel·lular secundària a la isquèmia s'han implicat múltiples factors, entre ells l'augment de les concentracions intracel·lulars de calci. En aquest sentit, la presència de determinades substàncies tamponadores, com les proteïnes fixadores de calci, poden proporcionar una major resistència a les cèl·lules en front a situacions adverses com la isquèmia.

Per altra part, les cèl·lules de l'hipocamp presenten, després d'una isquèmia cerebral transitòria, una mort retardada per maduració. Aquest fenomen de mort pot estar relacionat amb la síntesi de determinades proteïnes que condicionen la mort cel·lular d'una forma activa, de manera similar al que succeeix a l'apoptosi.

II.2 OBJECTIUS CONCRETS

1. Analitzar les repercussions de la isquèmia cerebral global transitòria a l'hipocamp del jerbu a diferents temps de supervivència postisquèmia. Estudiar la mort cel.lular retardada a la regió CA1 de l'hipocamp.
2. Estudiar qualitativament i quantitativa les neurones que contenen immunoreactivitat per a parvalbúmina a l'hipocamp del jerbu normal i comparar-ho amb altres espècies: rata, eriçó, gat i humans.
3. Analitzar les neurones que contenen parvalbúmina a l'hipocamp del jerbu després d'isquèmia global transitòria. Estudi qualitatiu i quantitatiu d'aquestes cèl·lules a diferents temps de supervivència postisquèmia. Comparar la seva vulnerabilitat en front a la isquèmia amb la vulnerabilitat de les neurones piramidals.
4. Analitzar els efectes de la cicloheximida, administrada a diferents dosis i temps, sobre la mort cel·lular retardada a la regió CA1 de l'hipocamp del jerbu, per tal d'estudiar la relació entre mort cel·lular retardada i síntesi de proteïnes.
5. Analitzar els mecanismes de mort induïda per radiacions durant el desenvolupament de l'hipocamp com a model d'apoptosi. Estudiar el comportament en front a l'administració de cicloheximida i NGF.

6. Comparar els efectes de la cicloheximida a la mort cel·lular retardada i a la mort tipus apoptosi induïda per radiacions durant el desenvolupament.
7. Analitzar els efectes de l'administració de fructosa-1,6-bisfosfat a la mort cel·lular retardada com a agent neuroprotector.
8. Estudiar el patró de vulnerabilitat de l'hipocamp en front a la isquèmia durant el desenvolupament postnatal del jerbu.
9. Estudiar el patró de desenvolupament postnatal de les subpoblacions neuronals de l'hipocamp que contenen parvalbúmina i calbindina. Relacionar-ho amb el dany secundari a la isquèmia durant aquest període.
10. Estudiar els canvis en la immunoreactivitat per a proteïna precursora beta-amiloide a l'hipocamp del jerbu després d'isquèmia global transitòria.

III. RESULTATS

Capítol 1

**PARVALBUMIN IMMUNOREACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS OF THE GERBIL
AFTER TRANSIENT FOREBRAIN ISCHAEMIA: A QUALITATIVE AND
QUANTITATIVE SEQUENTIAL STUDY.**

A. Tortosa, I. Ferrer

Neuroscience 1993; 55: 33-43.

III.1 PARVALBUMIN IMMUNOREACTIVITY IN THE HIPPOCAMPUS OF THE GERBIL AFTER TRANSIENT FOREBRAIN ISCHAEMIA: A QUALITATIVE AND QUANTITATIVE SEQUENTIAL STUDY.

A. Tortosa *, I. Ferrer

Unidad de Neuropatología, Servicio Anatomía Patológica, Hospital Príncipes de España, Universidad de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain

(*) Neurologist, Doctoral Fellow at the Unit of Neuropathology.

Address correspondence to: Prof. I. Ferrer
Unidad Neuropatología
Servicio Anatomía Patológica
Hospital Príncipes de España
Universidad de Barcelona
08907 Hospitalet de Llobregat
Spain
FAX: 34 3 2045065

Running title: parvalbumin in the gerbil hippocampus

III.1.1 ABSTRACT

Parvalbumin immunoreactivity is examined in the hippocampus of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) in controls and in animals subjected to 20 minutes of forebrain ischaemia produced by bilateral clipping of the carotids. In comparison to other species, the hippocampus of the gerbil is characterized by strong immunoreactivity of the (presumably excitatory) perforant pathway, and weak immunoreactivity (low numbers of neurons and scarce dendritic arbors) in nonpyramidal nerve cells (inhibitory neurons) of the CA1 area. These properties may play some role in the development and maintenance of seizures in this susceptible species.

Parvalbumin immunoreactivity is rapidly and ephemerally increased in the hippocampus 15 minutes after reperfusion. Later on, there is a transitory decrease of parvalbumin immunoreactivity which is followed by an increase six hours later in the *stratum granulare*, *hilus* and CA3 area, and not until the first and second day in the CA1 area. This increase significantly surpasses the number of immunoreactive neurons in control animals in CA1 and CA3 from 48 hours after reperfusion onwards. The effect is similar using different anaesthetics and does not occur in sham-operated animals. In contrast with these findings, the number of parvalbumin-immunoreactive neurons in the somatosensory cortex is not affected in our model of forebrain ischaemia. On the other hand, GABA-immunoreactive neurons in CA1 are preserved during the first week after reperfusion, although an increase in the number of these cells occurs at the end of this period. Delayed neuronal death occurs in the CA1 area 48 h after ischaemia, and marked reduction

in the number of CA1 neurons is found by the end of the first week. 80% of the remaining cells in CA1 at day 7, and 83% at day 15, are parvalbumin-immunoreactive nonpyramidal neurons in contrast to 3% parvalbumin-immunoreactive cells in control animals. These findings indicate that GABAergic neurons in CA1 are preserved after forebrain ischaemia, and that parvalbumin in CA1 neurons is associated with survival.

Key words: ischaemia, calcium-binding protein, parvalbumin, gerbil, neuronal death.

III.1.2 INTRODUCTION

Delayed neuronal cell death occurs in the hippocampus of the rat and gerbil following transient ischaemia (10, 12, 24, 25, 34-37, 50,51, 56, 69, 70). Neuron loss is not generalized but follows a characteristic regional pattern: neurons in the hilus and CA1 area are the most vulnerable, whereas CA3 pyramidal cells and dentate gyrus neurons are relatively resistant to ischaemia. A similar pattern occurs in humans following cerebral ischaemia (6, 49). In addition, not all the neurons in a given area are equally vulnerable; for example, somatostatin-containing neurons in the hilus are the most susceptible, whereas cholecystokinin-immunoreactive neurons in the dentate gyrus are the most resistant (16, 17, 27).

The reasons for the differences in regional and neuronal vulnerability to ischaemia are not clearly understood, and various theories have been proposed, among which calcium toxicity, glutamate toxicity (9, 12, 68), impairment of protein synthesis (40, 67) and programmed neuronal death (18, 59, 60) are the best-documented. It is our aim to study each of these proposals in consecutive papers.

It has been suggested that neuronal damage may be related to an impairment in the control of calcium homeostasis which involves different intracellular organelles and different calcium-binding proteins (43). According to this theory, neurons containing certain calcium-binding proteins are best equipped to buffer intracellular cytotoxic levels of Ca^{++} (2, 54, 62, 63). Parvalbumin is one of these calcium-binding proteins (8, 20-22, 48) which is found in certain

nonpyramidal neurons in the hippocampus (2, 5, 8, 15, 23, 47, 62-64) that use GABA as a neurotransmitter (8, 30-32, 38). In the hippocampus of the rat and gerbil certain populations of GABAergic neurons are resistant to ischaemia (44, 55); subsequent studies have shown that most of them are also parvalbumin-immunoreactive cells (45).

In the present study we investigate parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil compared with other species, and the sequence of qualitative and quantitative modifications of parvalbumin immunoreactivity after 20 minutes of forebrain ischaemia.

III.1.3 ANIMALS AND METHODS

Adult (aged from 4 to 10 months) Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) of both sexes, bred in our own colony, were anaesthetised with halotane mixed with room air (3% for induction; 1.5% for maintenance). A midline incision was made in the neck, and small clips were placed in the common carotid arteries. Once the arteries were clipped the anaesthetic was retired and the animals were left in the cage for 20 minutes. After this time, the gerbils were reanaesthetised, the clips removed and the incisions sutured with silk. The absence of blood flow during the occlusion and the reperfusion after the removal of the clips were controlled visually. Postischaemic gerbils exhibited a restless behaviour and torsion of the neck for several hours. Animals which did not suffer this behaviour were not included in the present study. During all this procedure the body temperature was maintained at 36-37°C (7, 17, 33). The animals were killed at different periods postischaemia: 5, 15, 30 and 60 minutes, 2, 6, 24 and 48 hours, and 3, 7 and 15 days. The gerbils were killed with diethyl-ether anaesthesia and the brains were perfused, with a 21G canula through the heart, with 0.9% saline and 1% heparine for 2 minutes, and fixed with 150 cc of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 20 minutes. Immediately afterwards, the brains were removed from the skull and immersed in a similar fresh solution for 24 h. The brains of one group of animals (group A) were embedded in paraffin, and 10-micron-thick dewaxed sections were stained with hematoxylin and eosin. The brains of another group (group B) were cryoprotected with 30% saccharose, cut onto slabs, frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until used for parvalbumin immunocytochemistry.

A third group of gerbils (group C) was used for gammaaminobutyric acid (GABA) immunocytochemistry. In this case, the brains were perfused with 150 cc of 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer for 20 minutes and, after removal from the skull, were immersed in a similar solution for 24 h, and cut with a vibratome.

Normal gerbils (group D), and sham-operated animals (group E) were processed in the same manner and used as controls.

For parvalbumin immunocytochemistry, sections 50 microns thick were obtained with a cryostat and processed free-floating following the avidin and biotin method (ABC procedure). After blocking endogenous peroxidases and incubating in 3% normal horse serum, the sections were incubated at 4°C overnight with a monoclonal anti-parvalbumin antibody (Sigma clone no PA-235, produced using carp muscle parvalbumin as immunogen) at a dilution of 1:2500 in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) containing 0.2 % Triton X-100 and 1% normal horse serum. For the ABC procedure, the sections were incubated for 1 h in biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector) at a dilution of 1:200, and ABC (Vectastain ABC kit, Vector Labs) at a dilution of 1:100. Peroxidase was visualized with 0.05% diamino-benzidine and 0.01% hydrogen peroxide. After rinsing in PBS, the sections were mounted, dehydrated at room temperature, cleared and coverslipped. A few sections were counterstained with hematoxylin. Some sections from control, sham-operated and ischaemic gerbils with different survival periods were incubated in different dilutions of the primary antibody (from 1:500 to 1:2500) in an attempt to modify the labelling of the CA1 parvalbumin immunoreactive cells (see later).

Some sections were incubated in a solution without the primary antibody to rule out false positive results.

Sections for GABA immunocytochemistry were obtained with a vibratome and processed free-floating using a polyclonal antibody raised in rabbit with GABA-glutaraldehyde as immunogen (Incstar). The sections were incubated at 4°C overnight at a dilution of 1: 3000, for 1 h with a biotinylated antirabbit serum used at a dilution of 1:100, and finally with ABC at a dilution of 1:50.

The number of animals used in every group was as follows: group A: 22; group B: 40; group C: 21; group D: 8; and group E: 6.

For practical purposes, morphological (including quantitative) studies were focused on the rostral hippocampus because the number of parvalbumin-immunoreactive cells varies rostrocaudally in the hippocampus of the gerbil (personal observations).

The number of parvalbumin-immunoreactive neurons in animals of the group B was counted separately in the areas CA1 and CA3 of the rostral hippocampus in control, sham-operated and ischaemic gerbils at different periods after reperfusion. Parvalbumin-immunoreactive neurons were counted directly from the ocular of the microscope along segments of 1020 microns in the CA1 and CA3 areas. These segments were arbitrarily chosen; they correspond to the long side of the reticula of the ocular at a magnification of x 100. The relation between the total number of neurons and parvalbumin-immunoreactive cells in control, 7 and

15 days postischaemic gerbils was examined in immunocytochemical sections counterstained with hematoxylin. Since the penetration of the antibody into the section is normally restricted to the upper 10 microns on both sides, the relation between the total number of neurons and the number of parvalbumin-immunoreactive cells here obtained is, therefore, only approximate.

The number of parvalbumin-immunoreactive cells was also counted in the medial part of the somatosensory cortex using the same tissue sections in controls and ischaemic gerbils killed at different intervals postischaemia. Counts were made directly from the microscope using an ocular grid. Results were expressed as the number of neurons per 0.5 mm².

The number of neurons and the number of degenerating (dying) cells were counted in dewaxed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin. The counts were made separately, along segments of 290 microns, in the CA1 and CA3 areas of the rostral hippocampus, through the ocular of the microscope at a magnification of x 400. Neurons were easily recognized because of their large cytoplasm and nucleus, and prominent nucleoli. Dying cells were recognized in the present study by their shrunken cytoplasm and, most particularly, by their punctate nuclei.

GABA-immunoreactive neurons in CA1 were counted using the same parameters as for parvalbumin-immunoreactive cells. The numbers of parvalbumin-immunoreactive cells, GABA-immunoreactive neurons, total neurons and dying cells in the CA1 and CA3 areas of the rostral hippocampus were obtained by

counting three consecutive sections in four animals at every period examined. Statistical data were analyzed with the Mann-Whitney U test. Differences in the proportion of parvalbumin-immunoreactive cells in relation to the total number of neurons at different periods of survival were examined with the Chi-Square test.

In order to examine possible differences related to the anaesthetic used (17), a number of animals was anaesthetised with diethyl-ether, or with ketamine (30mg/ KG), diazepam (4mg/Kg) and atropine (1mg/Kg).

Finally, in order to compare parvalbumin immunoreactivity of the hippocampus in the gerbil and other species, we also examined tissue preparations, from our files, of rats, cats, hedgehogs and humans which were processed for parvalbumin immunocytochemistry as detailed above.

III.1.4 RESULTS

a. Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil

A few parvalbumin-immunoreactive cells were found in the *strata pyramidale, oriens* and *lacunare* in the CA1 area of the normal hippocampus of the gerbil. However, a large number of parvalbumin-immunoreactive cells were seen in the CA3 area, *stratum granulare* of the dentate gyrus and *hilus*. Parvalbumin-immunoreactive cells were bitufted or multipolar neurons with slender dendritic processes distributed in the plexiform layers, and punctate terminals forming a dense mesh in the pyramidal and granular layers. In addition, a dense band of parvalbumin immunoreactivity along the *stratum moleculare* characterized the hippocampus of the gerbil (Fig. 1 A). A similar pattern was not found in the rat (Fig. 1 B), cat, hedgehog or man (not illustrated).

Another distinctive feature was the small number of beaded, immunoreactive dendrites in the upper and inner plexiform layers of the CA1 area in the gerbil (Fig. 1 C) when compared to the rat, cat, hedgehog and human (Fig. 1 D-G). These differences were not dependent on the concentrations of the primary antibody (from 1:2500 to 1:500), and were specific for this area since a similar immunostaining in CA3, dentate gyrus and hilus was observed among the different species. Surprisingly, a marked increase in the number of parvalbumin immunoreactive neurons and enhancement of parvalbumin immunoreactivity was found in the CA1 area a few days after forebrain ischaemia in the gerbil (Fig. 1 E) (see later).

b. General effects of forebrain ischaemia:

After 20 minutes of forebrain ischaemia produced by bilateral clipping of the carotids (see methods), the animals exhibited a restless behaviour with torsion of the neck and continuous circling for about 8 hours. Later on, no gross abnormalities were observed. A few animals exhibited generalized convulsions about five hours after the 20 minutes of ischaemia.

Histological abnormalities in dewaxed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin were best seen in the second or third day after ischaemia. The cytoplasm of most neurons in the CA1 area was dark and shrunken, and punctate aggregates of chromatin were observed (Fig. 2 A-C). The number of neurons in the CA1 area progressively dwindled in the following days, as the number of reactive astrocytes increased in the same area. By the end of the first week, marked neuron loss and gliosis in CA1 were the most remarkable remains of ischaemia.

Other brain regions were concurrently affected after ischaemia, including the striatum and thalamus, but the neocortex was spared.

Differences were not found between non-operated and sham-operated controls.

c. Parvalbumin immunoreactivity after forebrain ischaemia:

Although the hippocampus of gerbils killed 5 minutes after 20 minutes of ischaemia did not differ from that of control animals, a marked increase of parvalbumin immunoreactivity was found in the CA1 area 15 minutes after the 20 minutes of ischaemia. However, one hour later, immunoreactive cells practically disappeared in the CA1 area, whereas neurons in the CA3 area slightly decreased, and the punctate terminals of the *strata pyramidale*, and *granulare*, together with the perforant pathway (*stratum moleculare*), exhibited normal parvalbumin immunoreactivity. Six hours after ischaemia, a few immunoreactive cells were seen in the CA1 area, but parvalbumin-immunoreactive neurons were numerous in the CA3 area, *stratum granulare* and *hilus*. From the first and second day onwards, marked parvalbumin immunoreactivity was found in CA1, and this increase surpassed the typical moderate immunoreactivity of this area in control gerbils. A mild reduction of parvalbumin immunoreactivity occurred during the second week after ischaemia, although the final regional immunoreactivity was greater in gerbils which had suffered from ischaemia than in controls.

The morphology and distribution of parvalbumin immunoreactivity in the CA1 area of the gerbil at different intervals after ischaemia are shown in Fig. 3. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the CA1 area 15 minutes (Fig. 3 B), 7 days (Fig. 3 E) or 15 days (Fig. 3 F) after 20 minutes of forebrain ischaemia were bitufted and multipolar neurons located in the *stratum pyramidale* and *stratum oriens*; a few heavily stained neurons were also encountered in the *stratum radiatum*. These cells exhibited heavily immunoreactive dendrites distributed in the

plexiform layers. Punctate terminals in the *stratum pyramidale* were also more strongly immunoreactive at these stages than at 5 minutes (Fig. 3 A), 1 h (Fig. 3 C) and 6 h (Fig. 3 D) after 20 minutes of ischaemia. The morphology and distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in CA3 and dentate gyrus were similar in normal and ischaemic gerbils throughout the period examined. Parvalbumin immunoreactive cells in the neocortex were preserved.

d. Gaba immunocytochemistry after ischaemia:

Vibratome sections processed for GABA immunocytochemistry showed a uniform profile of GABA-immunoreactive cells and fibres in control, sham-operated and ischaemic gerbils killed at different intervals after ischaemia (Fig. 4). GABA-immunoreactive cells were found in the *strata oriens, pyramidale* and *radiatum/lacunare* of the CA1 and CA3 areas, and in the *strata granulare* and *hilus* of the dentate gyrus. Although the quality of the immunostaining was lower than that of parvalbumin, immunoreactive cells were easily recognized as non-pyramidal neurons. In addition, large numbers of immunoreactive puncta surrounded the cytoplasm of unlabelled cells in the *stratum pyramidale*, and a mesh of immunoreactive fibres was present in the upper and inner plexiform layers of the hippocampus and dentate gyrus.

Abnormalities in the morphology and distribution of GABA-immunoreactive neurons were not seen 15 minutes and 1 hour after ischaemia (Fig. 4 B and C), when compared to controls (Fig. 4 A), but a moderate increase in the number of

GABA immunoreactive neurons was found at the end of the first week following ischaemia (Fig. 4 D).

e. Quantitative studies:

No significant differences in the number of parvalbumin-immunoreactive neurons were seen between controls and gerbils at 5 minutes after 20 minutes of forebrain ischaemia (Mann-Whitney U test). As shown in Table I, the number of parvalbumin-immunoreactive neurons in the CA1 area of the rostral hippocampus significantly increased 15 minutes after 20 minutes of ischaemia, but decreased below normal values 1 hour later. A progressive increase followed during the next hours to reach peak values at the end of the first week. Strikingly, the number of parvalbumin-immunoreactive neurons in CA1 in ischaemic gerbils greatly surpassed the number of parvalbumin-immunoreactive neurons in normal animals 24 h after ischaemia (Mann-Whitney U test, $p < 0.001$) and hence forth ($p < 0.001$ at day 7). The number of parvalbumin-immunoreactive cells in the CA3 area in ischaemic gerbils significantly did not surpass the number of parvalbumin-immunoreactive cells in normal animals until day 7 ($p < 0.001$).

In contrast with these findings, the number of parvalbumin immunoreactive neurons in the somatosensory cortex was not modified after ischaemia (Table I).

The numbers of GABA-immunoreactive neurons in the CA1 area were not modified during the first 48 h after ischaemia, but significantly increased 7 days after ischaemia (Mann-WhitneyU test, $p < 0.01$) (Fig. 5).

The total number of neurons in the CA1 area rapidly lessened during the second and third days after ischaemia whilst the number of degenerating cells (recognized in the present study by their punctate nuclei in dewaxed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin) dramatically increased (Fig. 5). Degenerating cells were not seen in the CA3 area, and, accordingly, the number of neurons in the rostral region of CA3 remained unchanged (data not shown).

Immunocytochemical sections counterstained with hematoxylin disclosed that 80% of the remaining neurons in the CA1 area at day 7 postischaemia, and 83% at day 15, were parvalbumin immunoreactive neurons, in contrast to 3% parvalbumin-immunoreactive neurons in control animals (Chi-Square test; control versus 7 days, $p < 0.0001$; control versus 15 days, $p < 0.0001$).

f. Anaesthetics:

No significant differences in the general pattern of parvalbumin immunoreactivity were observed in other groups of animals subjected to cerebral ischaemia and in sham-operated controls anesthetized with other agents. The pattern was similar in animals treated with halotane, diethylether, or ketamine, diazepam and atropine.

g. Seizures:

Generalized seizures, which were not associated with predictable signs, occurred in a few gerbils about five hours after ischaemia. These animals had a very poor outcome and most died within the immediate few hours.

Morphological and immunocytochemical studies were carried out from a few minutes after the beginning of seizures to the spontaneous death in some cases. No differences were encountered in these animals when compared to gerbils subjected to transient ischaemia who had not suffered from seizures.

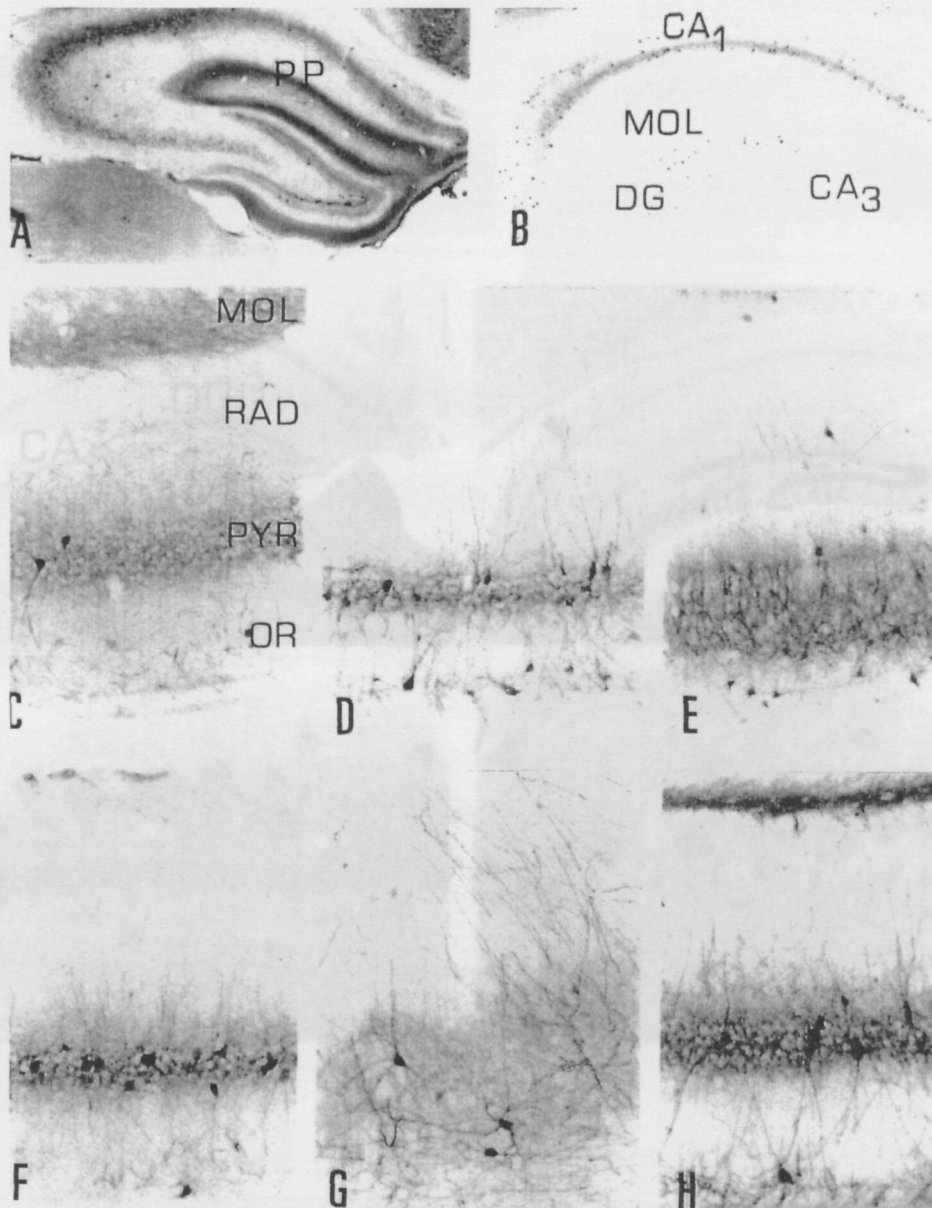


Figure 1: Parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil and other species. A.- Parvalbumin immunoreactivity in the perforant pathway (PP) in the gerbil. B.- Parvalbumin immunoreactivity in the rat showing no reactivity in the *stratum moleculare* (MOL), which corresponds to the perforant path. CA1 and CA3: corresponding subfields of the hippocampus. DG: dentate gyrus. C-G.- High magnification of the rostral CA1 area in the gerbil (C), rat (D), cat (E), hedgehog (F) and man (G). Note weak parvalbumin immunoreactivity in the CA1 area of the gerbil, characterized by fewer parvalbumin-immunoreactive neurons and faintly dendritic arbors, when compared to the other species. PYR: *stratum pyramidale*; OR, RAD, MOL: *str. oriens, radiatum and moleculare* respectively. H.- Parvalbumin immunoreactivity in the CA1 area of the gerbil 7 days after 20 minutes of forebrain ischaemia. A marked increase in the number of immunoreactive cells and dendrites is observed. A and B: x40; E and G: x100; C, D, F and H: x160.

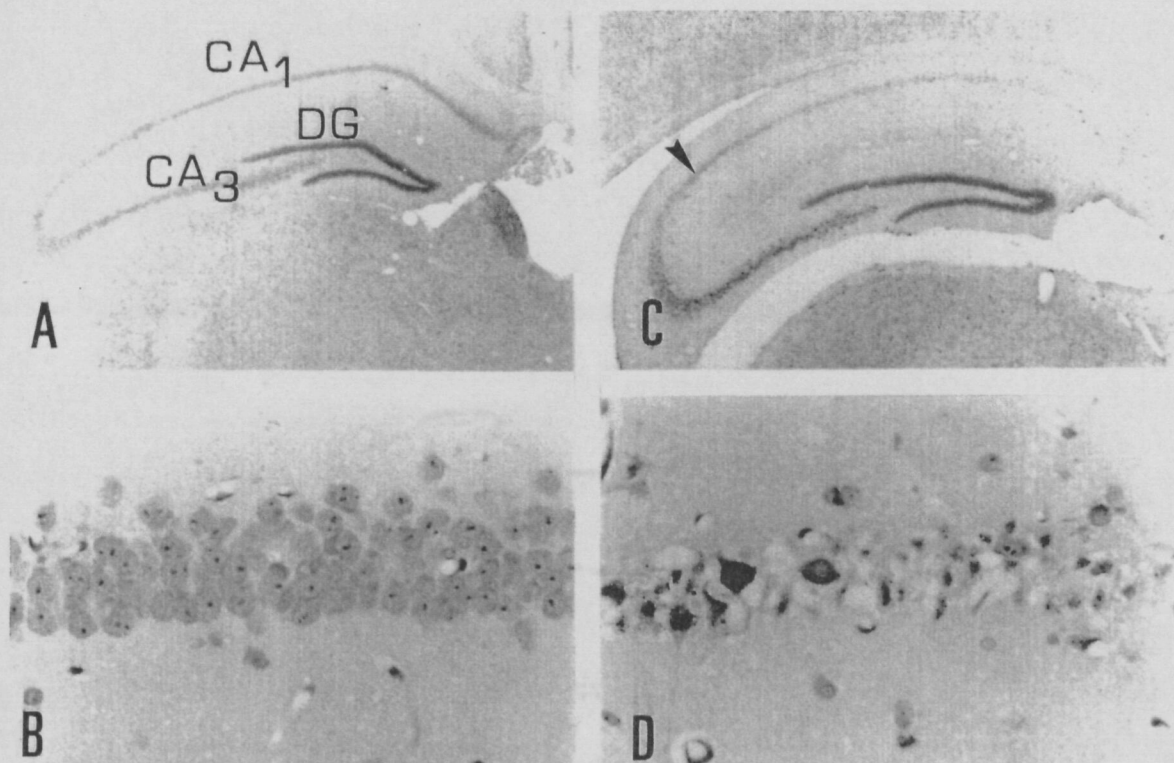


Figure 2: Cell death and neuron loss in the CA1 area of the hippocampus of the gerbil following 20 minutes of forebrain ischaemia. A and B.- Control animals. C and D.- Animals killed four days after reperfusion of the carotid arteries. Nerve cell loss is found along the CA1 area in B (arrow marks the border of the CA1). B and D.- High magnification of the CA1 in control (B) and postischaemic (D) gerbils. Loss of nerve cells, shrinkage of the cytoplasm and punctate degeneration of the nucleus is found in the remaining neurons in D. CA1 and CA3: corresponding areas of the hippocampus; DG: dentate gyrus. Hematoxylin and eosin. A: x25; C: x40; B and D: x400.

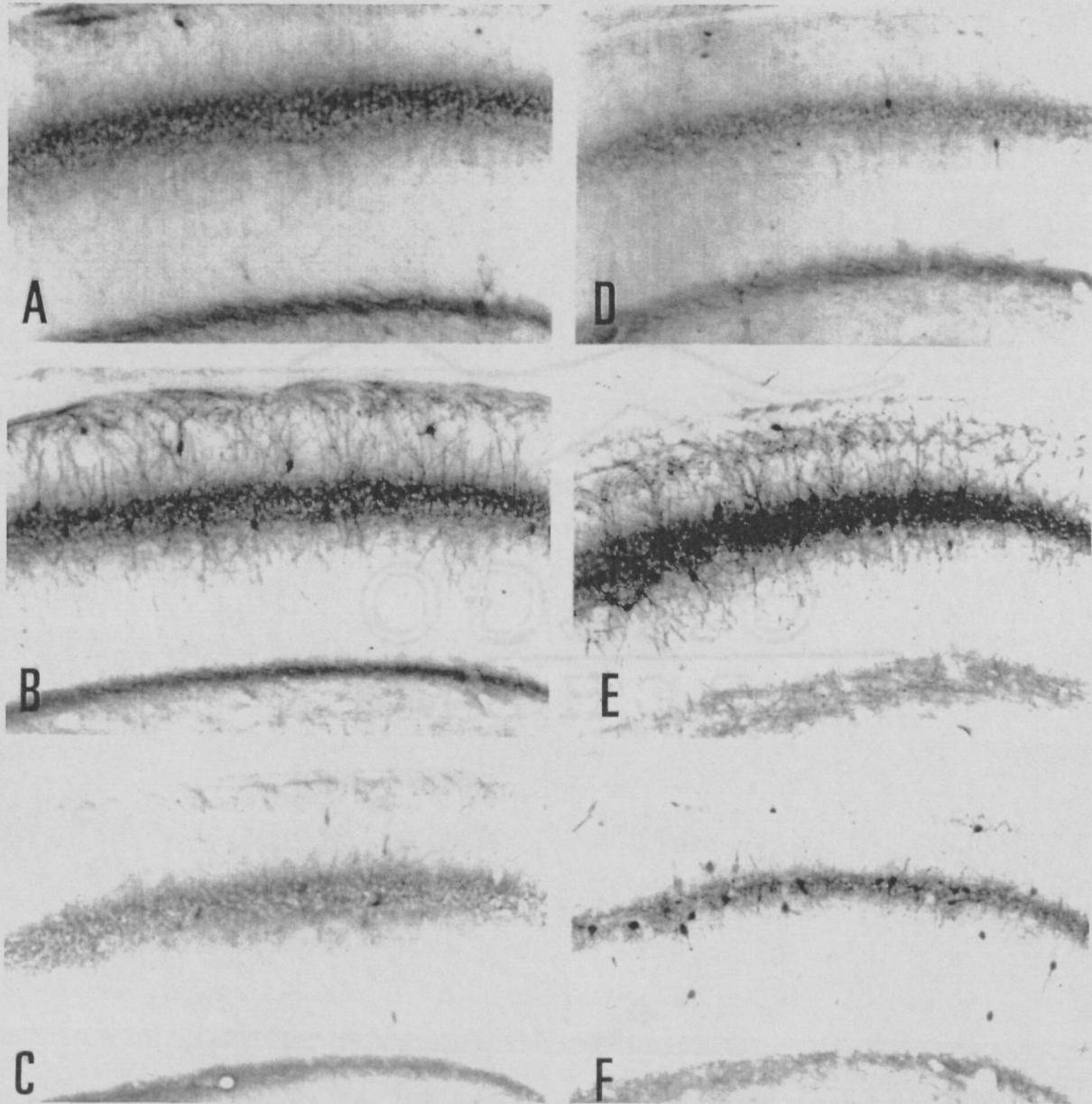


Figure 3: Parvalbumin immunoreactivity in the CA1 area of the rostral hippocampus in the control gerbil (A) and in consecutive periods following 20 minutes of forebrain ischaemia. B.- 15 minutes; C.- 1 hour; D.- 6 hours; E.- 7 days; F.- 15 days. The transient increase of immunoreactivity 15 minutes after reperfusion is followed by a loss of immunoreactivity in the next hour, and later by a progressive recovery during the following days. Increased immunoreactivity, when compared to control animals, is found in the 7th day (E), and to a lesser extent in the second week (F), after reperfusion. x100.

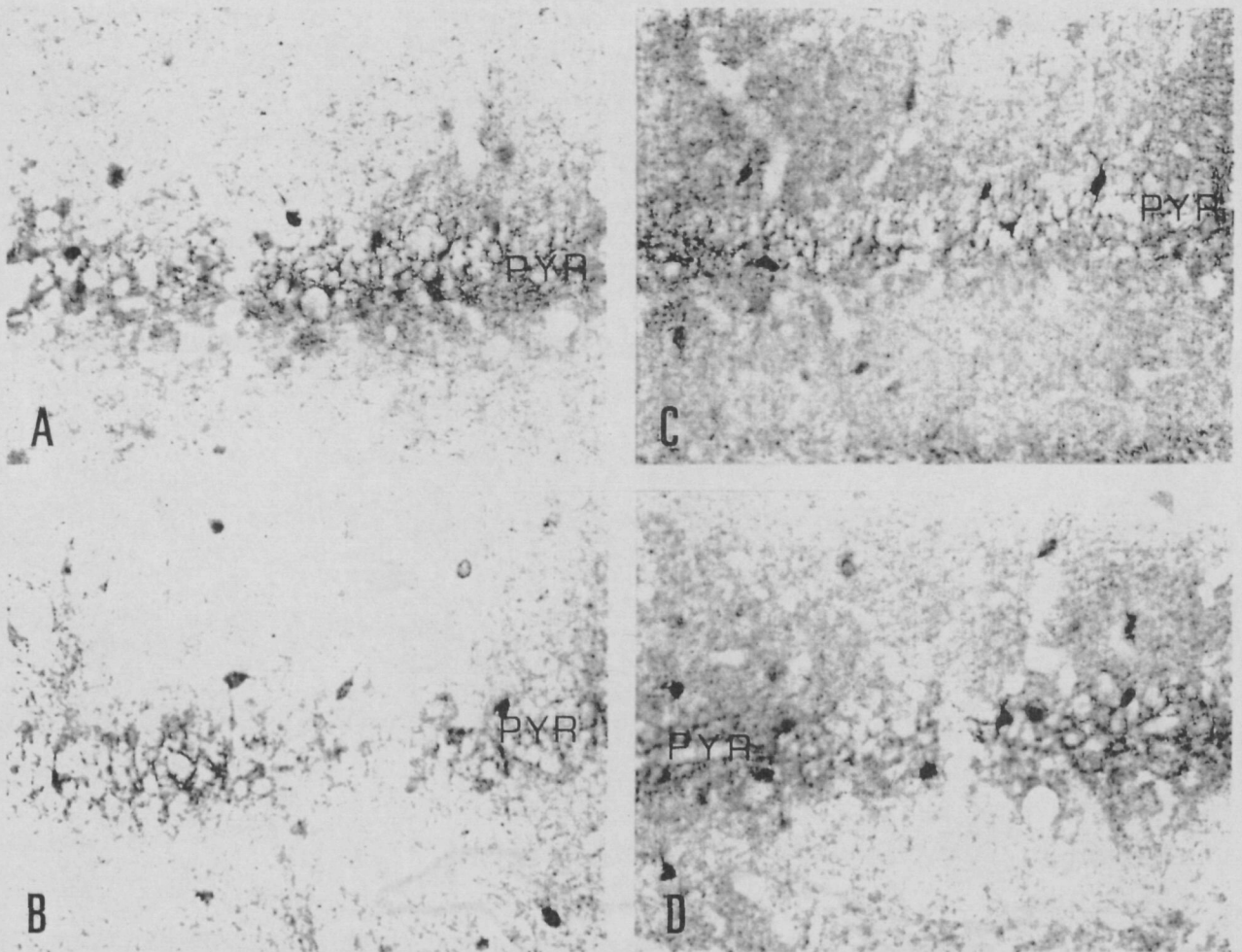


Figure 4: GABA-immunoreactive (GABAergic) neurons in the CA1 area of the hippocampus in controls (A) and ischaemic gerbils 15 minutes (B), 1 h (C) and 7 (D) days following 20 minutes of forebrain ischaemia. PYR: *stratum pyramidale*. x 160.

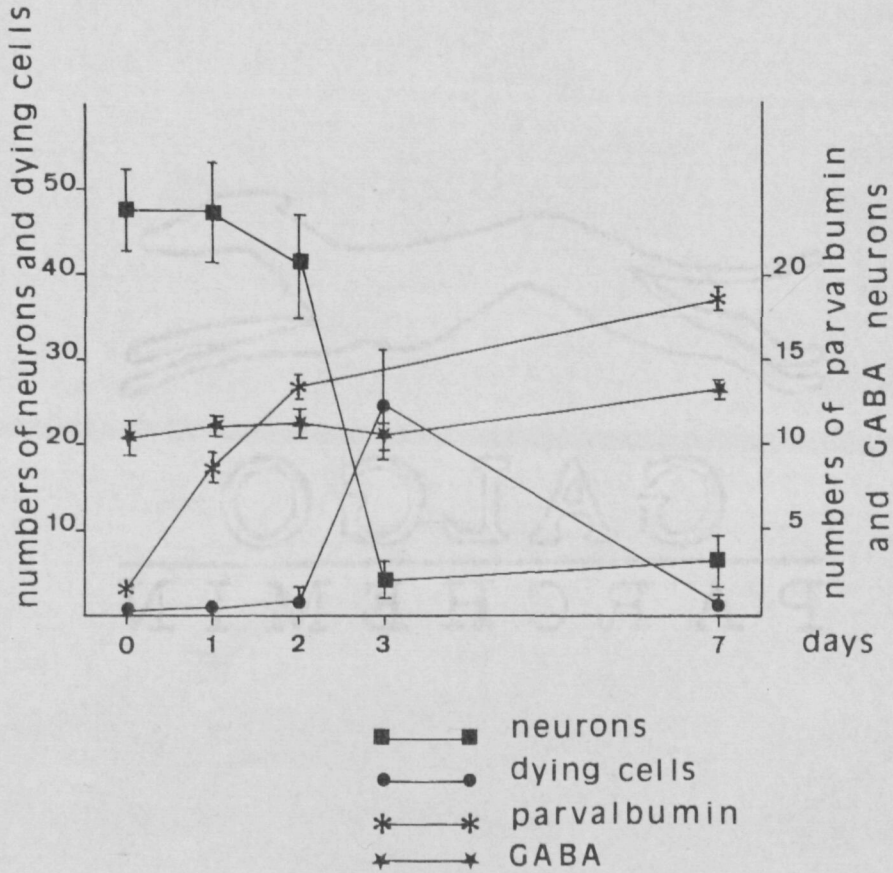


Figure 5: Number of living neurons and number of dying cells, compared to the number of parvalbumin-immunoreactive cells and GABAergic neurons (mean values \pm ES) in the CA1 area of the hippocampus at different periods following 20 minutes of cerebral ischaemia in the gerbil. The numbers of living neurons and dying cells were counted in a segment 290 microns long, whereas parvalbumin-immunoreactive cells and GABAergic neurons were counted in a segment 1020 microns long. Differences in the method employed (cryostat or vibratome sectioning), as well as differences in the sensitivity of the antibodies used may explain the higher numbers of parvalbumin immunoreactive cells when compared to GABA-immunoreactive neurons in the 7th day.

III.1.5 DISCUSSION

The individual morphology and distribution of parvalbumin immunoreactive neurons in the hippocampus are similar in the gerbil and other species (5, 8, 15, 23, 30, 38, 47, 62, 64). However, two distinctive features occur in the hippocampus of the gerbil. One of them is that the perforant path, located in the *stratum moleculare* of the hippocampus and *dentate gyrus*, contains parvalbumin (57). The other is that parvalbumin-immunoreactive neurons in the CA1 area are less numerous and have less immunoreactive dendrites than parvalbumin-immunoreactive neurons in CA3 and dentate gyrus (58). According to previous observations (57), the presence of parvalbumin in the perforant path (a presumably excitatory projection from the entorhinal cortex) may be relevant to the generation and maintenance of repetitive seizures in this very susceptible species (39). On the other hand, if we accept that parvalbumin is associated with a highly active fast-spiking action (32), then a reduced parvalbumin content may impair GABA-mediated inhibition by CA1 interneurons. This can be supported by developmental studies in the rat which have shown that earlier maturation of GABA-mediated inhibition in CA3 in comparison to CA1 is associated with the late appearance of parvalbumin in the CA1 area (6, 43). According to these data, weak parvalbumin immunoreactivity in CA1 interneurons in the gerbil hippocampus can be a contributory factor in seizure activity. Alternatively, weak immunoreactivity could be an expression of low levels of the calcium bound form of the protein which may be hardly recognized by the antibody (see later).

Parvalbumin immunoreactivity is dramatically reduced in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischaemia. A gradual recovery occurs after 24 or 48 h, first in the dentate gyrus and CA3, and later in the CA1 area. This feature is not related to the anaesthesia with halotane since parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus is not altered in sham-operated controls (although they were subjected to similar anaesthetic procedures), whereas changes of parvalbumin immunoreactivity following ischaemia are similar regardless the anaesthetic used (halotane, diethyl-ether, or ketamine, diazepam and atropine). Furthermore, a similar pattern is found in the rat following transient forebrain ischaemia (26). In the rat, parvalbumin immunoreactivity disappears in CA1, CA3 and dentate gyrus around the 4th postischaemic day, but gradually reappears within days. Taken together, these features suggest that, despite differences in the timing between these species, a consistent transitory loss of parvalbumin immunoreactivity occurs in the hippocampus after ischaemia.

Our sequential qualitative and quantitative study shows that, at least in the gerbil brain, this pattern is more subtle than indicated above. During the early period after ischaemia there is a rapid but transitory increase of parvalbumin immunoreactivity in the hippocampus which precedes the typical postischaemic loss of immunoreactivity.

The enhancement of parvalbumin immunoreactivity may be related, at least in part, to intracellular calcium concentrations. Most studies have shown that calcium enters hippocampal neurons during or shortly after ischaemia. This is followed by a recovery, and later by a secondary increase of calcium levels in the

CA1 neurons (13, 14, 29, 41, 53, 61,65, 66). The increase of parvalbumin-immunoreactivity in the hippocampus of the gerbil 15 minutes after 20 minutes of ischaemia is unlikely to be the result of an increase of parvalbumin synthesis. Most feasibly, the increase in parvalbumin immunoreactivity is related to an increase of the calcium bound form of parvalbumin which buffers the massive calcium influx after ischaemia. Later on, the reduction of parvalbumin immunoreactivity probably represents a release of calcium by this protein.

To support this hypothesis, studies of neurons *in vitro* have shown loss of parvalbumin immunoreactivity in the absence of calcium in the culture medium. The immunoreactivity was restored after reincubation with CaCl_2 , a feature suggesting that the antiserum used in that study preferentially recognized the calcium-bound form of parvalbumin (52). We do not know if the same thing happens with the antibody used in the present study and, therefore, further work is needed to investigate this possibility.

A second enhancement of parvalbumin immunoreactivity is associated temporally with the secondary increase of calcium levels in CA1 after ischaemia. Here again, an increase in the calcium-bound form of parvalbumin may account for the increase of immunoreactivity, although increased parvalbumin synthesis can not be ruled out.

It can be argued that these changes are the result, in part, of differences in fixation and length of the buffered saline bath, which is calcium free, and which may modify the quality of the immunoreaction. However, the same results were

reproduced at the same intervals after ischaemia in different animals which were killed and processed at different day intervals. Furthermore, these changes are specific for the hippocampus since the numbers of parvalbumin-immunoreactive neurons in the somasensory cortex remain constant at the different intervals after ischaemia.

It is also possible that changes of parvalbumin immunoreactivity are related to alterations due to ischaemia in CA1, which can result in changes in antigen presentation and antibody penetration. However, no similar modifications were seen in GABAergic interneurons, although some of them contain parvalbumin.

The possibility that differences in parvalbumin staining may be primarily related to differences in intracellular calcium levels is further supported by several indirect data. Recent Ca^{++} autoradiographic studies (1, 42) and cytochemical observations (4, 11, 19) have shown a progressive increase of calcium depositing in the CA1 area from 24 h postischaemia onwards. Electronmicroscopy using the calcium pyroantimonate technique has demonstrated early calcium deposits in dendrites and perikarya, and later in mitochondria, in pyramidal cell dendrites of the CA1 area after ischaemia (28). However, further studies are needed to provide direct evidence that the changes of parvalbumin immunostaining are indicative of changes of intracellular calcium levels.

An increase in the number of CA1 (and to a lesser extent of CA3) parvalbumin-immunoreactive neurons, but not of parvalbumin immunoreactive somatosensory neurons, occurs at 24 h after 20 minutes of forebrain ischaemia.

Since this increase occurs before the appearance of dead cells and neuron loss, the increase in the number of parvalbumin-immunoreactive neurons, at least during the early stages following ischaemia, is not the result of tissue shrinkage. Whether this change might be the result of increased parvalbumin synthesis can not be ruled out and should be studied by using *in situ* hybridization techniques.

Since the secondary increase of calcium is accompanied by the morphological appearance of cell death in CA1, it has been suggested that the influx of calcium is related to delayed neuronal death (65). Our present results, together with previous observations (45), indicate that parvalbumin-immunoreactive neurons in the CA1 area are preserved, whereas projection neurons die. Though under other conditions a small number of parvalbumin-immunoreactive neurons in CA1 definitively disappears after transient ischaemia (16), the present data show that parvalbumin in CA1 neurons is associated with survival.

III.1.6 REFERENCES

1. Araki T., Kato H. and Kogure K. (1990) Neuronal damage and calcium accumulation following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil. *Brain Res* 528: 114-122.
2. Baimbridge K.G. and Miller J.J. (1982) Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res* 245, 223-229.
3. Bergmann I., Nitsch R. and Frotscher M. (1991) Area-specific morphological and neurochemical maturation of nonpyramidal neurons in the rat hippocampus as revealed by parvalbumin immunocytochemistry. *Anat Embryol* 184, 403-409.
4. Bonnekoh P., Kuroiwa T., Kloiber O. and Hossmann K. (1992) Time profile of calcium accumulation in hippocampus, striatum and frontoparietal cortex after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Acta Neuropathol* 84: 400-406.
5. Braak E., Strotkamp B. and Braak H. (1991) Parvalbumin immunoreactive structures in the hippocampus of the human adult. *Cell Tiss Res* 264, 33-48.
6. Brierley J.B. and Graham D.I. (1984) Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. In *Greenfield's Neuropathology* (ed. Hume Adams J., Cosellis J.A.N. and Duchon L.W.), pp. 125-207 Edward Arnold, London.

7. Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y.T. and Ginsberg M.D. (1989) Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett* 101, 299-304.
8. Celio M.R. (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375-345.
9. Choi D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
10. Crain B.J., Westerkam W.D., Harrison A.H. and Nadler J.V. (1988) Selective neuronal death after transient forebrain ischemia in the Mongolian gerbil: a silver impregnation study. *Neuroscience* 27, 387-402.
11. DeLeo J., Toth L., Schubert P., Rudolphi K. and Kreutzberg G.W. (1987) Ischemia-induced neuronal cell death, calcium accumulation, and glial response in the hippocampus of the Mongolian gerbil and protection by propentofylline (HWA 285). *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 745-751.
12. Deshpande J., Bergstedt K., Lindén T., Kalimo H. and Wieloch T. (1992) Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res* 88, 91-105.
13. Deshpande J.K., Siesjö B.K. and Wieloch T. (1987) Calcium accumulation and neuronal damage in rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 89-95.
14. Dienel G.A. (1984) Regional accumulation of calcium in postischemic rat brain. *J Neurochem* 43, 913-925.

15. Ferrer I., Zújar M.J., Admella C., Alcántara S. (1992) Parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the cerebral cortex of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J Anat* 180: 165-174.
16. Freund T.F., Buzsáki G., Leon A., Baimbridge K.G. and Somogyi P. (1990a) Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Exp Brain Res* 83, 55-66.
17. Freund T.F., Buzsáki G., Leon A. and Somogyi P. (1990b) Hippocampal cell death following ischemia, effects of brain temperature and anaesthesia. *Exp Neurol* 108, 251-260.
18. Goto K., Ishige A., Sekiguchi K., Iizuka S., Sugimoto A., Yuzurihara M., Aburada M., Hosoya E. and Kogure K. (1990) Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus. *Brain Res* 534, 299-302.
19. Hashimoto K., Kikuchi H., Ishikawa M. and Kobayashi S. (1992) Changes in cerebral energy metabolism and calcium levels in relation to delayed neuronal death after ischemia. *Neurosci Lett* 137: 165-168.
20. Heizmann C.W. (1984) Parvalbumin, an intracellular calcium-binding protein: distribution, properties and possible roles in mammalian cells. *Experientia* 40, 910-921.
21. Heizmann C.W. and Berchtold M.W. (1987) Expression of parvalbumin and other Ca²⁺-binding proteins in normal and tumor cells: a topical review. *Cell Calcium* 8, 1-41.
22. Heizmann C.W. and Hunziker W. (1990) Intracellular calcium-binding molecules. In *Intracellular calcium regulation* (ed. Bronner F.), pp. 211-248. Alan R Liss, New York.

23. Höchli M., Zetzsche T. and Chan-Palay V. (1991) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the normal human hippocampus. *Dementia* 2, 243-258.
24. Ito U., Spatz M., Walker J.T. and Klatzo I. (1975) Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* 32, 209-223.
25. Johansen F.F., Jorgensen M.B. and Diemer N.H. (1983) Resistance of hippocampal CA1 interneurons to 20 min of transient cerebral ischemia in the rat. *Acta Neuropathol* 61, 135-140.
26. Johansen F.F., Tonder N., Zimmer J., Baimbridge K.G. and Diemer N.H. (1990) Short-term changes of parvalbumin and calbindin immunoreactivity in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 120, 171-174.
27. Johansen F.F., Zimmer J. and Diemer N.H. (1987) Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA1 pyramidal cell loss. *Acta Neuropathol* 73, 110-114.
28. Joó F., Ikeda J., Lohr J., Nagashima G., Mies G., Nowak T.S., Ruetzler C. and Klatzo I. (1992) Possible role of intracellular calcium translocation in the maturation of ischemic damage. In *Maturation phenomenon in cerebral ischemia* (ed. Ito U., Kirino T., Kuroiwa T. and Klatzo I.), pp 41-47. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
29. Kaas I.S. and Lipton P. (1986) Calcium and long-term transmission damage following anoxia in dentate gyrus and CA1 regions of the rat hippocampal slice. *J Physiol* 378, 313-334.

30. Katsumaru H., Kosaka T., Heizmann C.W. and Hama K. (1988a) Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp Brain Res* 72, 347-362.
31. Katsumaru H., Kosaka T., Heizmann C.W. and Hama K. (1988b). Gap junctions on GABA-ergic neurons containing the calcium binding protein parvalbumin in the rat hippocampus (CA1 region). *Exp Brain Res* 72, 363-370.
32. Kawaguchi Y., Katsumaru H., Kosaka T., Heizmann C.W. and Hama K. (1987) Fast spiking cells in the rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Res* 416, 369-374.
33. Kiessling M., Xie Y., Ullrich B. and Thilmann R. (1991) Are the neuroprotective effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide due to prevention of apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 11, S357.
34. Kirino T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Brain Res* 239, 57-69.
35. Kirino T. and Sano K. (1984a) Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol* 62, 201-208.
36. Kirino T. and Sano K. (1984b) Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol* 62, 209-218.
37. Kirino T., Tamura A. and Sano K. (1984) Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 64, 139-147.

38. Kosaka T., Katsumaru H., Hama K., Wu J.Y. and Heizmann C.W. (1987) GABAergic neurons containing the Ca^{2+} binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain Res* 419, 119-130.
39. Loskota W.J., Lomax P. and Rich S.T. (1974) The gerbil as a model for the study of epilepsies. *Epilepsia* 15, 109-115.
40. Magnusson K. and Wieloch T. (1989) Impairment of protein ubiquitination may cause delayed neuronal death. *Neurosci Lett* 96, 264-270.
41. Martins E., Inamura K., Themner K., Malmqvist K.G. and Siesjö B.K. (1988) Accumulation of calcium and loss of potassium in the hippocampus following transient cerebral ischemia: a proton microprobe study. *J Cereb Blood Flow Metab* 8, 531-538.
42. Mies G., Kawai K., Saito N., Nagashima G., Nowak T., Joó F, Ruetzler C, Lohr J and Klatzo I. (1992) Protein synthesis and calcium uptake following complete cerebral ischemia of rat brain. In *Maturation phenomenon in cerebral ischemia* (ed. Ito U., Kirino T., Kuroiwa T., Klatzo I., pp. 129-138, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
43. Miller R.J. (1991) The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis. *Progr Neurobiol* 37, 255-285.
44. Nitsch C., Goping G. and Klatzo I. (1989a) Preservation of GABAergic perikarya and boutons after transient ischemia in the gerbil hippocampal CA1 field. *Brain Res* 495, 243-252.
45. Nitsch C., Scotti A.L., Sommacal A. and Kalt G. (1989b) GABAergic hippocampal neurons resistant to ischaemia induced delayed neuronal death contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Neurosci Lett* 105, 263-268.

46. Nitsch R., Bergmann I., Küppers K., Mueller G. and Frotscher M. (1990a) Late appearance of parvalbumin-immunoreactivity in the development of GABAergic neurons in the rat hippocampus. *Anat Embryol* 118, 147-150.
47. Nitsch R., Soriano E. and Frotscher M. (1990b) The parvalbumin-containing nonpyramidal neurons in the rat hippocampus. *Anat Embryol* 181, 413-425.
48. Persechini A., Moncrief N.D. and Kretsinger R.H. (1989) The EF-hand family of calcium modulated proteins. *Trends Neurosci* 11, 462-467.
49. Petito C.K., Feldmann E., Pulsinelli W.A. and Plum F. (1987) Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37, 1281-1286.
50. Petito C.K. and Pulsinelli W.A. (1984a) Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 194-205.
51. Petito C.K. and Pulsinelli W.A. (1984b) Sequential development of reversible and irreversible neuronal damage following cerebral ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 43, 141-153.
52. Pfyffer G.E., Faivre-Bauman A., Tixier-Vidal A., Norman A.W. and Heizmann C.W. (1987) Developmental and functional studies of parvalbumin and calbindin D28k in hypothalamic neurons grown in serum-free medium. *J Neurochem* 49, 442-451.
53. Sakamoto N., Kogure K., Kato H. and Ohtomo H. (1986) Disturbed Ca²⁺ homeostasis in the gerbil hippocampus following brief transient ischemia. *Brain Res* 364, 372-376.

54. Scharfman H.E. and Schwartzkroin P.A. (1989) Protection of dentate hilar cells from prolonged stimulation by intracellular calcium chelation. *Science* 246, 257-260.
55. Schlander M., Hoyer S. and Frotschter M. (1988) Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons in the aging rat hippocampus are more resistant to ischemia than CA1 pyramidal cells. *Neurosci Lett* 91, 241-246.
56. Schmidt-Kastner R. and Freund T.F. (1991) Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40, 599-636.
57. Scotti A.L. and Nitsch C. (1991) The perforant path in the seizure sensitive gerbil contains the Ca²⁺ binding protein parvalbumin. *Exp Brain Res* 85, 137-143.
58. Seto-Oshima A., Aoki E., Semba R., Emson P.C. and Heizmann C.W. (1990) Appearance of parvalbumin-specific immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of the developing rat and gerbil brain. *Histochemistry* 94, 579-589.
59. Shigeno T., Mima T., Takakura K., Graham D.I., Kato G., Hashimoto Y. and Furukawa S. (1991) Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J Neurosci* 11, 2914-2919.
60. Shigeno T., Yamasaki Y., Kato G., Kusaka K., Mima T., Takakura K., Graham D.I. and Furukawa S. (1990) Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurosci Lett* 120, 117-119.
61. Simon R.P., Griffith T., Evans M.C., Swan J.H. and Meldrum B.S. (1984) Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 4, 350-361.

62. Sloviter R.R. (1989) Calcium-binding protein (calbindin D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: Localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280, 183-196.
63. Sloviter R.S., Sollas A.L., Barbaro N.M. and Laxer K.D. (1991) Calcium-binding protein (Calbindin -D28K) and Parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 308, 381-396.
64. Soriano E., Nitsch R. and Frotscher M. (1990) Axo-axonic chandelier cells in the rat fascia dentata: a Golgi-EM and immunocytochemical studies. *J Comp Neurol* 293, 1-25.
65. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba Y. and Wagner H.G. (1985) Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res* 63, 59-68.
66. Tsuda T., Kogure K., Ishii K. and Orihara H. (1989) Postischemic changes of calcium and endogenous antagonist in the rat hippocampus studied by proton-induced X-ray emission analysis. *Brain Res* 484, 228-233.
67. Widmann R., Kuroiwa T., Bonnekoh P., Hossmann K.A. (1991) (14C) Leucine incorporation into brain proteins in gerbils after transient ischemia: relationship to selective vulnerability of hippocampus. *J Neurochem* 56, 789-796.
68. Wieloch T. (1985) Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. In *Progress in Brain Research*, Vol. 63 (ed. Kogure K., Hossmann K.A., Siesjö B.K., Welsch F.A.) , pp. 69-85. Elsevier, Amsterdam.

69. Yamamoto K., Hayakawa T., Mogami H., Akai F. and Yanagihara T. (1990) Ultrastructural investigation of the CA1 region of the hippocampus after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol* 80, 487-492.
70. Yamamoto K., Morimoto K. and Yanagihara T. (1986) Cerebral ischemia in the gerbil: Transmission electron microscopic and immunoelectron microscopic investigation. *Brain Res* 384, 1-10.

ACKNOWLEDGEMENTS We wish to thank Dr. J. Vazquez Cruz for his help in developing the experimental model we have used in the present study. This work was supported in part by a grant FIS 93-131. Dr. A. Tortosa has a grant from the Pi i Sunyer Foundation. We greatly appreciate the skillful technical assistance of Miss R. Rivera who has a grant from the CIRIT. We wish to thank Mr. T. Yohannan for editorial assistance.

III.1.7 TABLE I

| | CA1 | | CA3 | | SS | |
|---------|-------|---------|-------|----------|-------|------|
| | x | ES | x | ES | x | ES |
| Control | 1.50 | 0.28 | 6.91 | 0.71 | 123.0 | 0.18 |
| 15' | 8.15 | 0.78 * | 8.25 | 0.66 ** | 119.9 | 1.29 |
| 30' | 4.90 | 0.78 ** | 6.65 | 0.67 | 121.7 | 3.07 |
| 1 h | 0.37 | 0.15 * | 4.83 | 0.71 (^) | 121.8 | 1.92 |
| 6 h | 1.25 | 0.16 * | 6.30 | 0.50 | 123.5 | 2.37 |
| 24 h | 8.11 | 0.96 * | 7.26 | 0.47 | 122.1 | 2.01 |
| 48 h | 13.61 | 1.17 ** | 9.45 | 0.64 ** | 124.7 | 1.29 |
| 7 d | 18.48 | 0.76 ** | 13.73 | 0.58 * | 121.2 | 1.34 |

Number of parvalbumin-immunoreactive neurons (mean values plus/minus error standard: $x \pm ES$) in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, and in the medial part of the somatosensory (SS) cortex in control gerbils at different periods following 20 minutes of ischaemia produced by clipping the carotid arteries. Each value in CA1 and CA3 was obtained by counting the number of parvalbumin-immunoreactive cells in a segment 1020 microns long of the rostral hippocampus in three consecutive sections of four animals ($n = 12$) at every period. The values of parvalbumin-immunoreactive neurons in the SS are expressed as the number of neurons per 0.5 mm^2 .

Significant differences with the immediately upper value are marked with asterisks. Mann-Whitney U test, * $p < 0.001$; ** $p < 0.01$. (^) $p < 0.001$ related to 15 minutes after ischaemia.

Capítol 2

DOSE-RELATED EFFECTS OF CYCLOHEXIMIDE ON DELAYED NEURONAL DEATH IN THE GERBIL HIPPOCAMPUS AFTER BILATERAL TRANSITORY FOREBRAIN ISCHEMIA.

A. Tortosa, R. Rivera, I. Ferrer

J Neurol Scie 1993, in press

III.2 DOSE-RELATED EFFECTS OF CYCLOHEXIMIDE ON DELAYED NEURONAL DEATH IN THE GERBIL HIPPOCAMPUS AFTER BILATERAL TRANSITORY FOREBRAIN ISCHEMIA.

A. Tortosa, R. Rivera, I. Ferrer

Unidad de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Príncipes de España
Universidad de Barcelona, 08907
Hospitalet de Llobregat
Spain.

Correspondence to: Prof. I. Ferrer (address above)

FAX -34 3 2045065

Key words: delayed neuronal death, ischemia, cycloheximide, heat shock proteins, gerbil, hippocampus.

III.2.1 SUMMARY

Degeneration of dendrites followed by punctate chromatin condensation in the CA1 area of the hippocampus is a characteristic of delayed neuronal death following bilateral forebrain ischemia.

The effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide on delayed neuronal death following 20 minutes of bilateral forebrain ischemia were examined in the gerbil hippocampus at the fourth day of reperfusion. Low doses of cycloheximide beginning 10 minutes after ischemia (1.0 microg/gb. wt. in saline followed by 1.0 microg/g every 24 h) reduced the number of dying cells in the CA1 area, whereas high doses (2.0 microg/g, followed by 1.0 microg/g every 12 h) increased the number of dying cells. No effects were seen when a single dose of cycloheximide was injected 1 h before ischemia. These results indicate that the effects of cycloheximide are dose dependent, low doses reduce, high doses increase cell death. These findings also indirectly suggest that protein synthesis may play a role in the extent of delayed neuronal death. Some involved proteins could be heat shock proteins, which are induced after ischemia and had been correlated with increased resistance to injury. However, changes of heat shock immunoreactivity in the postischemic hippocampus were not seen in the present study following cycloheximide injection.

III.2.2 INTRODUCTION

Delayed neuronal cell death occurs in the CA1 area of the hippocampus in the gerbil a few days after transient forebrain ischemia (Ito et al., 1975; Kirino, 1982; Kirino et al., 1984; Kirino and Sano, 1984 a; Crain et al., 1988; Araki et al., 1989), and characteristically involves projection neurons, whereas GABAergic, parvalbumin-immunoreactive nonpyramidal neurons of the stratum pyramidale are preserved (Nitsch et al., 1989 a and b; Nitsch, 1992; Tortosa and Ferrer, 1993). A similar type of delayed neuronal death is observed in the CA1 area in the rat after transient unilateral ischemia (Pulsinelli et al., 1982; Petito and Pulsinelli, 1984 a and b; Freund et al., 1990; Deshpande et al., 1992).

It is known that naturally occurring and experimentally induced cell death during development are active processes mediated by protein synthesis (Oppenheim et al., 1990; Oppenheim, 1991; Inohue et al., 1992; Ferrer, 1992). It has been suggested that protein synthesis is also required for delayed neuronal death since a reduction in the number of dying cells has been observed in ischemic rats and gerbils after treatment with the protein synthesis inhibitors cycloheximide or anisomycin (Goto et al., 1990; Shigeno et al., 1990; Papas et al., 1992). However, these results were not reproduced in another study in ischemic rats using several protein and RNA synthesis inhibitors (Deshpande et al., 1992).

The purpose of the present study is to reinvestigate the effects of different doses of cycloheximide, administered with various schedules, on delayed neuronal

death in the CA1 area of the gerbil, and to test the possibility that delayed neuronal death is an active process mediated by protein synthesis.

III.2.3 MATERIAL AND METHODS

Adult (3-6 month old) Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) of both sexes and weighing 50-60 g were anaesthetized with halotane mixed with room air (3% for induction; 1.5% for maintenance). A midline incision was made in the neck, and small clips were placed in the common carotid arteries. Once the arteries were clipped, the anaesthetic was retired and the animals were left in the cage for 20 minutes. After this time, the animals were re-anaesthetized, the clips removed and the incisions sutured. Blood flow during the occlusion, and the reperfusion after the removal of the clips were controlled visually. Since mild hypothermia may reduce hippocampal injury (Busto et al., 1989; Minamisawa et al., 1990; Welsh et al., 1990; Welsh and Harris, 1991; Kiessling et al., 1991), the body temperature was maintained at 36-37°C during ischemia and the early postischemic period.

For the sequential examination, 22 gerbils were killed at different intervals after ischemia and processed for optical and immunocytochemical studies. The animals were re-anesthetized with deep diethyl-ether anesthesia and the brains perfused through the heart with 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. The brains were immediately removed and fixed in a similar solution for 24 h. After this time, the brains of some gerbils were embedded in paraffin, and serial dewaxed sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or with cresyl violet. For microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunocytochemistry, the brains were cryoprotected with 30% saccharose and cut with a cryostat. Sections 50 microns thick were processed free-floating following the avidin-biotin-peroxidase method (ABC, Vector Labs). After blocking endogenous peroxidase and incubating in 3%

normal horse serum, the sections were incubated at 4°C overnight with a monoclonal anti-MAP-2 antibody (Sternberger-Meyer) at a dilution of 1:1000 in 0.1 M PBS containing 0.2% TritonX-100 and 1% normal horse serum. Peroxidase reaction was visualized with 0.05% diamino-benzidine and 0.01% hydrogen peroxide.

Animals treated with cycloheximide were categorized into three groups. In group I (n=8), cycloheximide was injected subcutaneously after 10 minutes of reperfusion at a dose of 1.0 microg/g b.wt. in saline followed by 1.0 microg/g every 24 h. In group II (n=7), cycloheximide was injected after 10 minutes of reperfusion at a dose of 2.0 microg/g, followed by 1.0 microg/g every 12 h beginning 20 h after ischemia. Higher doses of cycloheximide killed the animals. In group III (n=5), a single dose of 1.5 microg/g of cycloheximide was injected 1 h before ischemia. Similar numbers of ischemic animals in each group were injected with saline alone and served as controls.

Quantitative studies were focused on the CA1 area of the rostral hippocampus four days after ischemia. Counts were made in segments 290 long (which corresponds to the length of the grid adapted to the ocular of the microscope at a magnification of x 400) in four consecutive sections in every gerbil. Counts of dying cells in each group were expressed as mean values \pm SD, and compared with control values. Results were statistically processed with the Mann-Whitney U test.

An additional set of animals was used for heat-shock protein (HSP) immunocytochemistry. The following groups were examined: gerbils subjected to 20 minutes of bilateral forebrain ischemia alone, ischemic gerbils treated with cycloheximide 1 microg/g after 10 minutes of reperfusion, ischemic gerbils treated with 2 microg/g cycloheximide 10 minutes after ischemia and sham-operated controls. The animals were killed 24 hours later under deep anaesthesia and the brains were perfused through the heart with 4% paraformaldehyde as previously. Sections 50 microns thick were obtained with a Vibratome and processed free-floating using a well-characterized monoclonal antibody against HSP 72/73 (Ab-1) (Oncogene Science) used at a dilution of 1:100 at 4° C overnight. The sections were later incubated with biotinylated antimouse monoclonal antibody at a dilution of 1:200 for 1 hour, and with ABC at a dilution of 1:100.

III.2.4 RESULTS

Morphological abnormalities in the CA1 area of the hippocampus, as seen in dewaxed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin, were first observed the second day after ischemia. At this time, the cytoplasm of most neurons was shrunken and dark but the nucleus was preserved. On the fourth day, most neurons in the CA1 area had swollen cytoplasm and punctate chromatin condensation. Only a few cells appeared normal (Fig. 1 A and B). By the end of the first week, only a few neurons survived while astrocytes and microglial cells were the predominant cell types.

At higher magnification, most dying neurons were characterized by the punctate condensation of the nuclear chromatin but some cells had, in addition to the shrunken cytoplasm, an extremely dark and uniformly condensed nucleus (Fig. 1 C). Fragmentation of the nucleus was not present.

The number of dying cells increased following treatment with high doses of cycloheximide administered after ischemia (see later). The morphology of dying cells was similar in these animals and in ischemic gerbils receiving saline alone; both types of nuclear degeneration, either with punctate or uniform chromatin condensation, were observed (Fig. 1 D).

MAP-2 immunocytochemistry revealed a slight decrease of immunoreactivity in dendrites of the CA1 cells in the upper and inner plexiform layers 12 h after

ischemia (Fig. 2 A and B). A marked decrease of immunoreactivity was found at days two (Fig. 2 C) and three (Fig. 2 D) with a few scattered neurons being preserved.

Because peak values of dying cells were found on the fourth day after ischemia, the effects of cycloheximide on the different groups were analyzed at this day.

Animals of group I, which received low doses of cycloheximide beginning after ischemia, showed a slight significant decrease in the number of dying cells in the CA1 area when compared with ischemic controls injected with saline alone. Animals of group II, which were treated with high doses of cycloheximide beginning after ischemia, had increased the numbers of dying cells when compared with controls. Although the major increase in the number of dying cells corresponded to neurons with punctate condensation of the chromatin, dying cells with uniform condensation of the nucleus were also present. Finally, gerbils of group III, which had received a single dose of cycloheximide just before ischemia, did not show significant differences in the number of dying cells in the CA1 area when compared with controls (Fig. 3).

An increase of heat shock protein immunoreactivity was observed in the hippocampus after bilateral forebrain ischemia. Immunoreactivity was more intense in the CA3 area and dentate gyrus than in the CA1 area. Cycloheximide injection (low dose or high doses) administered after ischemia did not modify heat shock protein immunoreactivity in the hippocampus (Fig. 4).

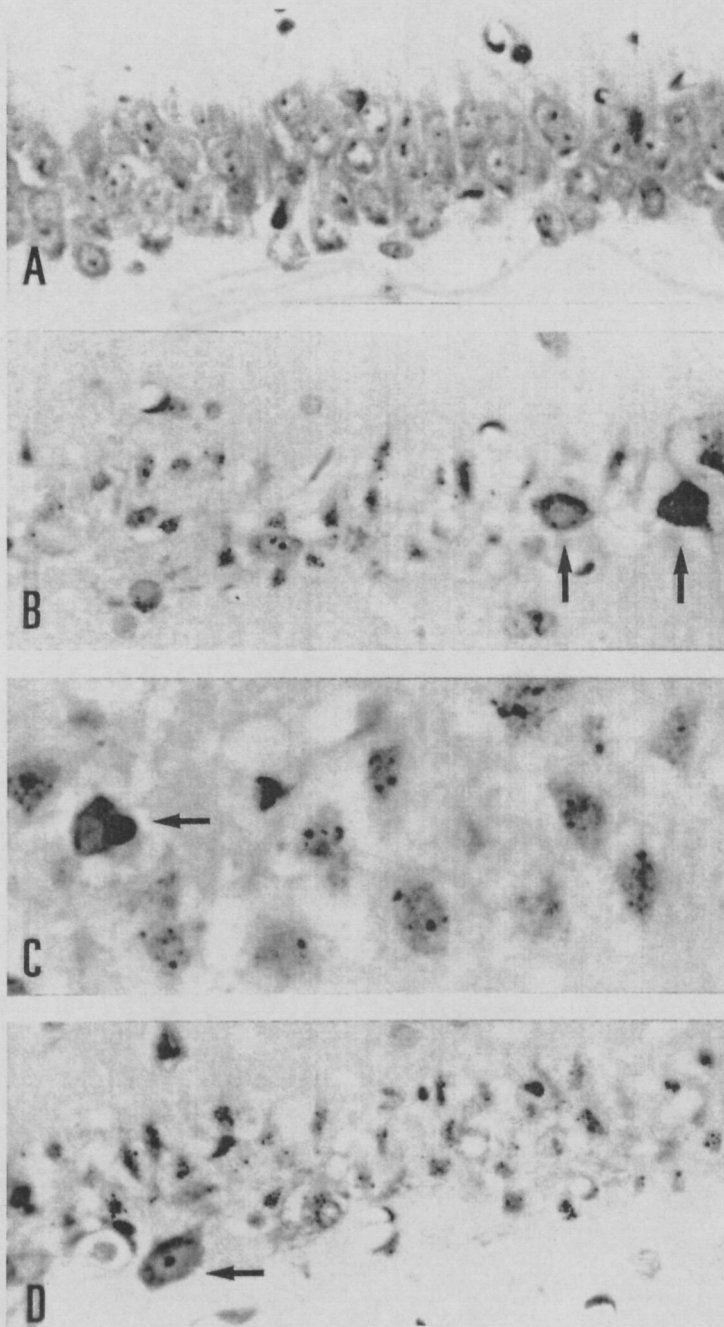


Figure 1: CA1 area of the gerbil hippocampus 1 day (A) and four days (B-D) after 20 minutes of bilateral forebrain ischemia. In contrast to the normal appearance at day 1 (A), most cells at day 4 are dying, although a few cells still survive (arrows). At higher magnification (C), most dying cells are characterized by punctate chromatin condensation, but a few dying cells have a shrunken cytoplasm and uniformly condensed nucleus (arrow). After high doses of cycloheximide administered 10 minutes after ischemia (D) both types of dying cells are increased in number; a surviving neuron is marked by an arrow. H&E. A, B and D: x 400; C: x 1000.

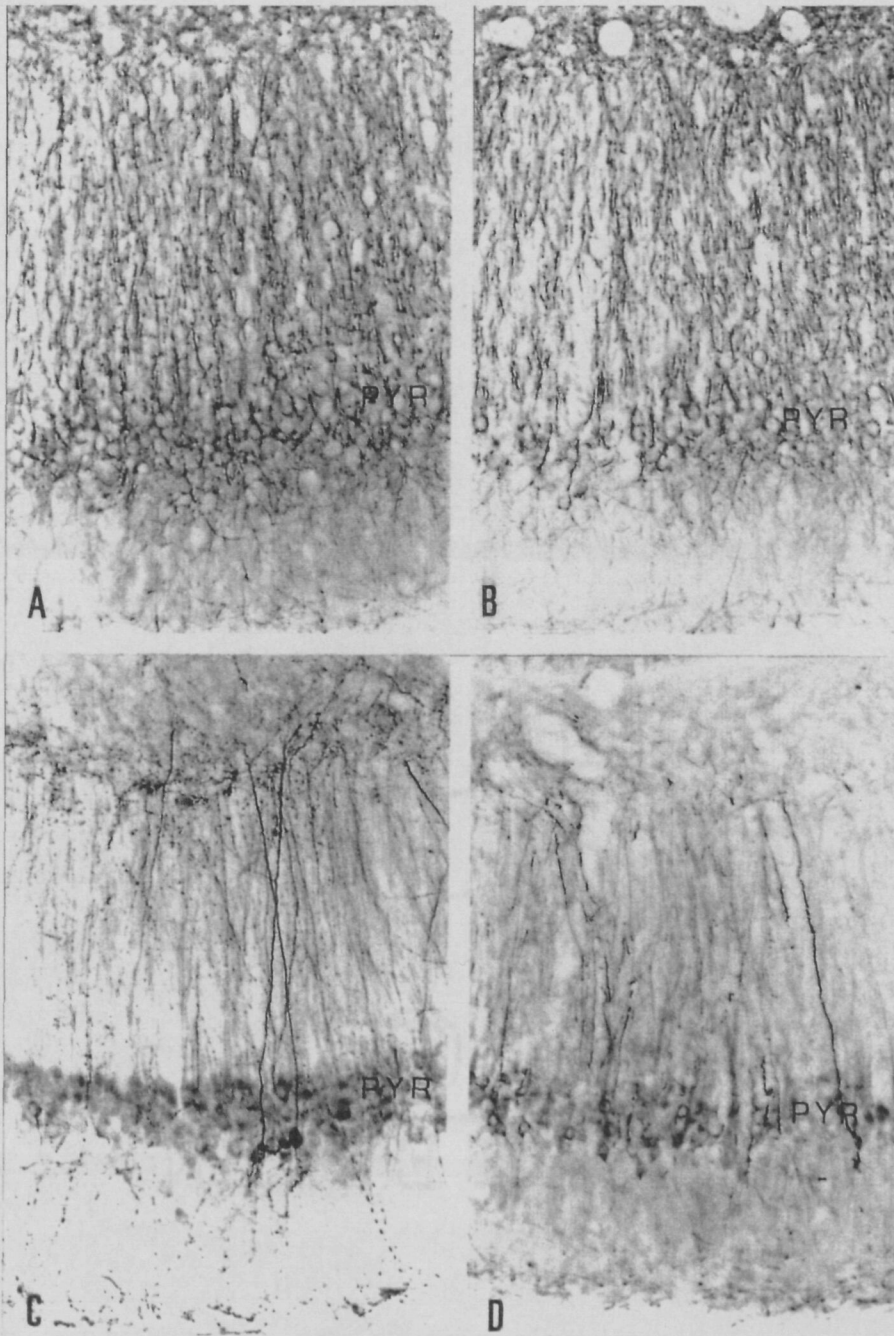


Figure 2: MAP-2 immunocytochemistry in the CA1 area of the normal (A) and ischemic (B-D) hippocampus of the gerbil at different days of reperfusion following 20 minutes of bilateral forebrain ischemia. A faint decrease of immunoreactivity can be seen 12 hours after ischemia (B). MAP-2 immunoreactivity is dramatically decreased 24 (C) and 48 h (D) after ischemia. This feature is in striking contrast with the normal appearance of the nuclei at the same stage (compare with A in Fig. 1). A-D: x160.

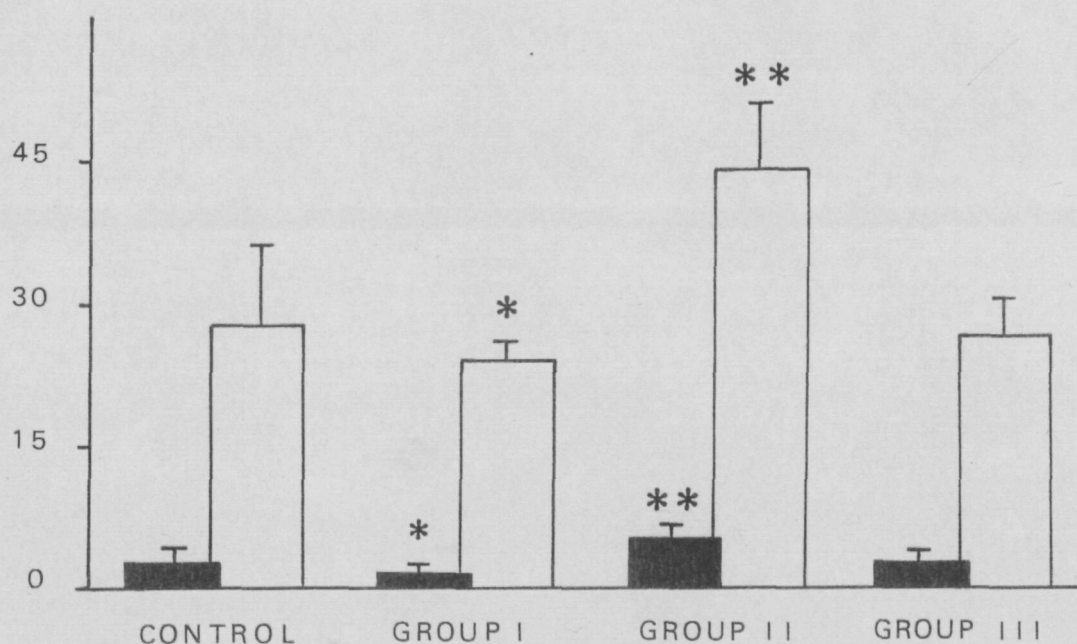


Figure 3: Number of dying cells in the CA1 area of the hippocampus of the gerbil four days after 20 minutes of bilateral forebrain ischemia. The control group was composed of animals (n=20) receiving saline alone. Animals of group I (n=8) received cycloheximide at a dose of 1.0 microg/g 10 minutes after ischemia followed by 1.0 microg/g every 24 h. Gerbils in group II (n=7) received 2.0 microg/g 10 minutes after ischemia followed by 1.0 microg/g every 12 h. Animals in group III (n=5) were treated with a single dose of 1.5 microg/g injected 1 h before ischemia. The white column expresses the number of cells with punctate chromatin condensation, whereas the number of cells with uniformly dark nuclei is shown in black columns. Low doses of cycloheximide after ischemia reduce the number of dying cells, but high doses significantly increase the number of both types of dying cells (punctate nuclear degeneration and uniform nuclear condensation) in the CA1 area. No effect was found following cycloheximide injection 1 h before ischemia. Mann-Whitney U test, * p < 0.02; ** p < 0.00001 compared with control values.

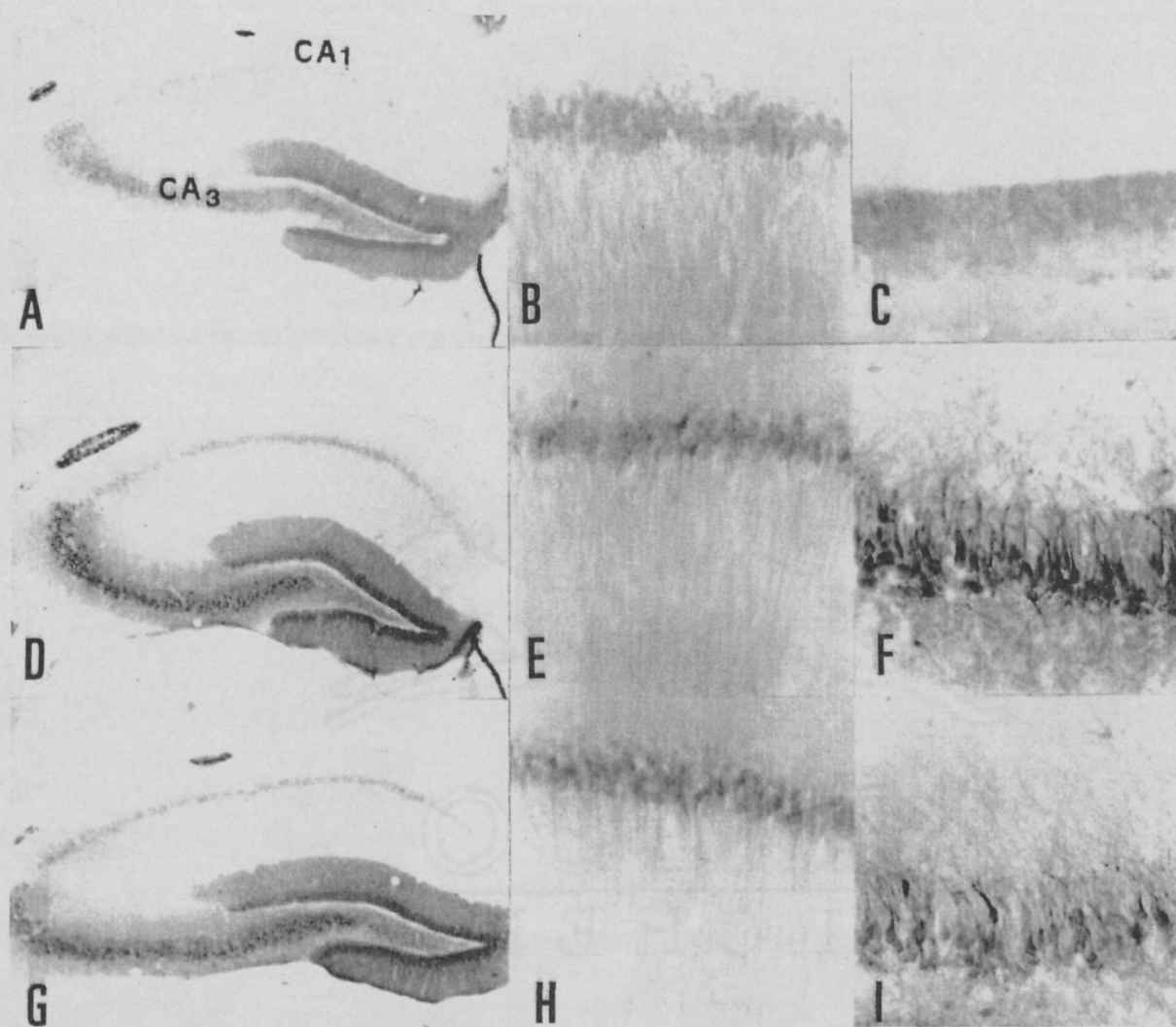


Figure 4: Heat shock immunoreactivity in the hippocampus in sham-operated (A-C), postischemic (D-F) and postischemic treated with high doses of cycloheximide (G-I) gerbils. Increased immunoreactivity, which is greater in the CA3 area and dentate gyrus (C, F, I) than in the CA1 area (B, E, H) is found in postischemic gerbils when compared with sham-operated controls. No differences are seen between ischemic animals and ischemic gerbils treated with cycloheximide. A, D and G: x 25 (reduced 1/2). B, C, E, F, H and I: x 160 (reduced 1/2).