

**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLAS DE HIDALGO**

División de estudios de postgrado  
Facultad de medicina “Dr. Ignacio Chávez”

Tesis de postgrado

**“EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA MELATONINA SOBRE LAS  
ALTERACIONES COGNOSCITIVAS ASOCIADOS AL ENVEJECIMIENTO  
CEREBRAL EN LA RATA”**



Para obtener el título de:

**MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS**

**PRESENTA:**

Javier Varela Montes  
Médico con especialidad en Urgencias Médicas

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro.

Morelia, Michoacán, 2005.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Doctor en Ciencias Biomédicas José Miguel Cervantes Alfaro.

Este trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social.  
Financiamiento No. FP 2003/032.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios: Gracias Señor por darme fuerzas para seguir adelante, los caminos no han sido fáciles pero con tu ayuda todo ha sido posible.

A mi madre: Gracias por todo, estoy muy orgulloso de ti, este triunfo es tuyo disfrútalo, Dios te bendiga siempre mamá.

A mi esposa: Gracias por tu confianza y paciencia que siempre me has brindado.

A mis hijas: Ustedes son y seguirán siendo mi inspiración, las adoro.

Al Dr. José M. Cervantes: Gracias maestro, mi admiración y reconocimiento por todo el apoyo incondicional brindado para la culminación de este trabajo.

A la Dra. Esther Olvera: Por todas las atenciones prestadas, siempre dispuesta, gracias.

A todos los integrantes del CIBIMI: Gracias por sus atenciones y su hospitalidad, los llevo siempre conmigo.

A Graciela: Gracias por tu amistad y tu apoyo incondicional.

## INDICE

SECCION	PAGINA
Resumen .....	5
Summary .....	7
Introducción .....	9
Antecedentes .....	22
Planteamiento del problema .....	30
Justificación .....	31
Hipótesis .....	32
Objetivo .....	33
Material y métodos .....	34
Resultados .....	40
Discusión .....	52
Conclusiones .....	57
Referencias .....	58

## RESUMEN

### **Antecedentes.**

Diversas evidencias acerca de las modificaciones de las funciones cerebrales asociadas al proceso de envejecimiento en los seres humanos, muestran que el deterioro lentamente progresivo de algunas de las capacidades cognitivas forma parte de las alteraciones tempranas del envejecimiento cerebral. Este es el caso del aprendizaje y de la memoria espacial, cuyas alteraciones hacen aparente la modificación temprana del funcionamiento del hipocampo durante el envejecimiento, aún en ausencia de otras patologías cerebrales asociadas. Asimismo, la influencia de factores genéticos, ambientales y fisiopatológicos sobre la integridad morfológica y funcional del hipocampo y otras estructuras cerebrales involucradas en la integración de esta y otras capacidades cognitivas puede incrementar de manera importante la velocidad del deterioro de estas durante el envejecimiento. De ahí la importancia de los procedimientos de neuroprotección para la preservación de las funciones cognitivas en los individuos viejos.

### **Objetivo.**

Evaluar los efectos de la melatonina sobre las alteraciones del aprendizaje y la memoria de referencia y de trabajo espacial asociadas al envejecimiento cerebral en ratas.

### **Métodos.**

Se evaluaron el curso temporal del aprendizaje, la memoria de referencia espacial y la memoria de trabajo espacial mediante la ejecución de tareas específicas en el laberinto acuático de Morris y el laberinto de 8 brazos de Olton en dos grupos de

ratas a los 18 y a los 24 meses de edad. Los animales del grupo 1 (grupo con tratamiento) recibieron melatonina, 5mg / kg / día, por vía oral, durante el periodo comprendido entre los 18 y los 24 meses de edad. Los animales del grupo 2 (sin tratamiento) recibieron de la misma manera y durante el mismo periodo vehículo de melatonina.

### **Resultados.**

En los animales que recibieron crónicamente el vehículo de la melatonina, se observó una reducción significativa de la velocidad de aprendizaje y menor capacidad de orientación espacial en el laberinto acuático de Morris a los 24 meses de edad en comparación con los resultados del mismo grupo a los 18 meses de edad. En cambio, los animales tratados con melatonina presentaron las mismas características de ejecución de estas pruebas a los 18 y a los 24 meses de edad y con velocidad de aprendizaje significativamente mejor que el grupo sin tratamiento. La evaluación de la memoria de trabajo y de la memoria espacial en el laberinto de 8 brazos de Olton no mostró diferencias significativas entre ambos grupos, ni entre las edades de 18 y 24 meses.

### **Conclusiones.**

El tratamiento crónico con melatonina previno las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial asociadas al envejecimiento temprano en la rata, sugiriendo la existencia de un efecto neuroprotector de éste compuesto sobre la integridad funcional del hipocampo durante el envejecimiento cerebral.

Palabras clave: melatonina, envejecimiento, funciones cognoscitivas, ratas

## SUMMARY

### **Introduction.**

Several evidences have shown that a slow progressive deterioration of some cognitive functions is a main component of early cerebral alterations of ageing in human beings. Thus, the decline in the efficiency of spatial learning and memory makes apparent changes of hippocampal functioning occurring at early stages of ageing, even in absence of concurrent cerebral pathologies. Besides, genetic, environmental and pathophysiologic factors could increase the rate of deterioration of cognitive functions along ageing, through their actions on the structure and the functioning of the hippocampus, as well as other brain structures mainly involved in the their integration. Hence, neuroprotective procedures could be relevant in order to a preservation of efficient cognitive functions in old individuals.

### **Objective.**

The assessment of the effects of melatonin on alterations of cognitive functions, spatial learning and spatial and working memory associated with cerebral ageing in rats was the main objective of the present work.

### **Methods.**

The temporal course of spatial learning and spatial and working memory were evaluated through the performance of two different groups of rats at 18 and 24 months of age, in the Morris' water maze and in the Olton's radial eight arms maze. Animals in the group 1 (treated group) received melatonin, 5 mg / kg / day po, for six months, while animals in the group 2 (untreated group) received the melatonin vehicle.

**Results.**

A significant delay in the rate of learning and a less ability for spatial orientation, were observed in the untreated group at the age of 24 months as compared to the same group at the age of 18 months or the treated group at the age of 24 months. By contrast no differences in the Morris' water maze performance were found in the treated group at the age of 18 or 24 months. Parameters of working and spatial memory in the Olton radial maze did not significant differ between treated and untreated groups at the age of 18 or 24 months.

**Conclusions.**

Melatonin treatment prevents the alterations of spatial learning and spatial and working memory associated to ageing in rats, suggesting the presence of a neuroprotective effect of melatonin on the functional integrity of the hippocampus during the brain ageing.

Key words: melatonin, ageing, cognitive functions, rats.

## INTRODUCCIÓN

A partir de las últimas décadas del siglo XX, se han acumulado evidencias que muestran que la población mundial está envejeciendo y la proporción de individuos mayores de 65 años se duplicará en los próximos 40 años. Asimismo, se ha identificado el fenómeno del incremento de la esperanza de vida de los individuos al momento del nacimiento y se han calculado las edades promedio de esperanza de vida en diferentes grupos poblacionales. De esta manera se ha determinado que la esperanza de vida para el año 2050 será de 83.05 años en Francia, de 80.5 años en Estados Unidos de Norte América y de 90.9 años en el Japón. El vivir más es un logro pero también un reto para la preservación de la salud, que ha sido enfrentado en muchos países mediante la investigación de procedimientos que deben promoverse y ponerse en práctica a lo largo de la vida con el fin de acceder a la edad avanzada en buen estado de salud física, mental, intelectual con integración familiar y social y con buena calidad de vida (1-3).

Los formidables avances en la prevención y tratamiento de muchas enfermedades del recién nacido, el infante y el adulto que dejadas a su curso natural limitaban grandemente su esperanza de vida, han dado lugar actualmente a una situación paradójica en la que la presencia de dichas enfermedades y las características de su evolución no se asocian con grandes tasas de mortalidad en los individuos menores de 60 años; en cambio inciden de manera directa en un gran incremento de la morbilidad y en menor proporción en la mortalidad durante la etapa de la vejez. Asimismo, diversas enfermedades que se inician durante la edad adulta van adquiriendo progresivamente dimensiones fisiopatológicas de gran magnitud

conforme se alcanzan edades cada vez mayores en el curso del envejecimiento a partir de los 60 años de edad (4).

El envejecimiento, por otra parte, es un proceso biológico inevitable, caracterizado por la declinación general de las funciones fisiológicas, incluyendo las funciones cerebrales. Las causas específicas del deterioro funcional asociado al envejecimiento son desconocidas, sin embargo, se han propuesto y discutido varias teorías al respecto (5-9).

Así, Weismann, en 1892 (9) propuso una teoría de tipo evolucionista que pretende explicar el envejecimiento, lo mismo que la muerte, como un fenómeno previsto de acuerdo con reglas de la evolución, en el sentido de que la magnitud de las poblaciones no lleguen a la saturación del espacio vital y se asegure en todo momento la nutrición de los seres vivos. A partir de esta teoría se han señalado más de 300 propuestas referentes al proceso de envejecimiento desde varios enfoques, sustentadas frecuentemente en abundante información y con no pocas contradicciones. Entre otros, Goldstein y colaboradores (9) han agrupado a las teorías que explican el proceso de envejecimiento en dos categorías: estocásticas y no estocásticas.

Las primeras proponen que el envejecimiento sería el resultado de la suma de alteraciones orgánicas que ocurren en forma aleatoria, y se acumulan a lo largo del tiempo, e incluyen a fenómenos tales como el error catastrófico y el entrecruzamiento de genes, el “desgaste” de las estructuras anatómicas y de los mecanismos celulares; así como el impacto de los radicales libres en diversos aspectos de la estructura y del funcionamiento celulares como causas del envejecimiento (9).

Por otra parte en las teorías no estocásticas se supone que el proceso de envejecimiento estaría predeterminado y los fenómenos genéticos, así como la operación de estructuras celulares marcapasos serían determinantes de dicho proceso (9).

Tanto las teorías estocásticas como no estocásticas referentes al envejecimiento pueden ser agrupadas de acuerdo al nivel de organización biológica de los fenómenos en estudio; de esta manera pueden ser expresadas en términos de procesos moleculares/celulares o de procesos en órganos y sistemas.

Las teorías basadas en fenómenos celulares/moleculares proponen que la expectativa de vida de cualquier especie depende de la existencia y la expresión de genes que determinan las características de las células que constituyen los distintos órganos y sistemas e influyen decisivamente de esta manera, en sus estructuras y en sus funciones, tanto en lo que se refiere a las complejas interacciones entre los componentes del medio interno de los individuos, como a las interacciones de estos con el medio ambiente. Se asume que existe algún programa genético que determina la máxima expectativa de vida para cada especie, en función de la duración de tres fases de la vida: desarrollo, reproducción y senectud. La expresión del programa genético que regula la duración de la vida puede ser alterado por varios factores que afectan a las características morfológicas y funcionales de las células que forman los diferentes órganos y sistemas de los individuos. Tal es el caso de modificaciones del contenido genético inducidas por restricción del codón, por mutaciones somáticas, errores catastróficos o alteraciones en las características de la propia regulación genética y de los telómeros (9). Así mismo, la disminución de la intensidad con

que operan los mecanismos de selección natural como una consecuencia de la progresión de la edad de las células somáticas adultas y la inadecuada protección de las células que envejecen en contra del daño producido por radicales libres, también han sido señalados como factores concurrentes en el proceso de envejecimiento celular (9).

Las teorías que se basan en el análisis de la estructura y de las funciones que tienen lugar en órganos y sistemas para abordar el proceso de envejecimiento muestran que sus características morfológicas y funcionales cambian con el transcurso de la edad. En particular se ha dado mucha importancia a las modificaciones del sistema inmunológico con el transcurso de la edad; así como a las modificaciones de las distintas funciones orgánicas que dependen de la presencia y acciones de diversas hormonas, en función del curso temporal de cambios de la secreción de diversas glándulas endocrinas conforme transcurre el envejecimiento (9).

En este sentido, los cambios en la estructura y las funciones correspondientes a cada uno de los órganos y sistemas que forman parte de los individuos en el transcurso del proceso de envejecimiento ha sido motivo de interés en este campo del conocimiento. Entre ellos se han destacado algunos por la constancia de su asociación con el envejecimiento.

Así, se ha descrito que la capacidad de llenado diastólico del ventrículo izquierdo disminuye progresivamente a partir de los 20 años de edad, de manera que a los 80 años se encuentra reducida en más del 50%, y que el envejecimiento favorece la hipertrofia ventricular izquierda, la insuficiencia cardiaca y la fibrilación ventricular. Así mismo, diversas modificaciones de la modulación simpática del

sistema cardiovascular que ocurren en los viejos, se traducen en alteraciones de la frecuencia cardíaca, de la sobrecarga (vascular y cardíaca), la contractibilidad miocárdica y la redistribución de flujo (10).

En el envejecimiento la capacidad de adaptación de las redes vasculares arteriales juegan un papel muy importante en las características hemodinámicas del aparato cardiovascular. En el transcurso del envejecimiento, ocurren cambios estructurales y funcionales en la circulación arterial que pueden dar lugar a diversas alteraciones del flujo sanguíneo, a las que se agregan en muchos casos la presencia y evolución progresiva de aterosclerosis, y anomalías en las redes microvasculares. Las alteraciones en la pared de los grandes vasos, las arterias de calibre mediano y de pequeño, así como las arteriolas consisten en acumulación de sales de calcio, desgaste y fragmentación de la elastina, e incremento en el número de fibras de colágeno que tienden a incrementar la rigidez y a reducir la "compliance" característica de la pared vascular normal. Las adaptaciones hemodinámicas asociados con la edad en los vasos pequeños se caracterizan por cambios en la resistencia periférica que da lugar a disminución de la densidad capilar y cambios en el grosor de la capa media. Asimismo, las modificaciones de la función endotelial, de las características de la elastina y de los elementos musculares de los vasos pequeños asociados al envejecimiento contribuyen a la generación de diversas alteraciones hemodinámicas (11).

El envejecimiento *per se* está asociado a cambios fisiológicos importantes que conducen a la declinación del funcionamiento pulmonar, en términos de la magnitud del intercambio gaseoso y del control respiratorio, que se han atribuido

a la disminución de la fuerza de los músculos respiratorios, incluyendo el diafragma, la disminución de la elasticidad pulmonar y el incremento en la resistencia de la pared del tórax (12). Además, se ha señalado que la reducción progresiva de las fibras de elastina, la disfunción mucociliar, la dilatación de espacios aéreos y la mayor repercusión de los procesos inflamatorios, contribuyen a las alteraciones pulmonares durante el envejecimiento (12).

Los cambios del sistema inmunológico asociados al proceso de envejecimiento afectan la capacidad del individuo para mantener el control inmunológico sobre agentes infecciosos e influyen en el desarrollo de enfermedades atribuidas al menos en parte a modificaciones de la respuesta inmune, la pérdida importante de la capacidad fagocítica de las células, la disminución de la proliferación de células T y B, el aumento de la generación de radicales libres y de compuestos proinflamatorios: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 8 (IL-8) etc, son algunos de los fenómenos determinantes de las características del sistema inmunológico durante el envejecimiento (13).

La declinación de la esteroidogénesis y de la actividad secretora gonadal, el incremento concomitante de gonadotrofinas, así como diversas modificaciones de la bioconversión de progestágenos, andrógenos y estrógenos son modificaciones del sistema endocrino características del envejecimiento que se han relacionado con la pérdida de las funciones reproductoras de los individuos, lo mismo que otros aspectos funcionales de órganos y sistemas diferentes a los órganos reproductores, que son en gran medida dependientes de las acciones de dichas

hormonas gonadales. Entre ellos, se ha prestado especial atención a las funciones cerebrales (funciones cognoscitivas, conducta, fenómenos motores, etc.) en cuya integración influyen los esteroides neuroactivos y que presentan cambios importantes y progresivos a partir de la menopausia en los seres humanos. Un fenómeno similar asociado al envejecimiento, aunque de menor magnitud, ocurre en el sistema hipotálamo-hipófisis-suprarrenal; lo mismo que la reducción de la secreción y las concentraciones plasmáticas de hormona de crecimiento y de los componentes del sustrato endocrino de regulación de las concentraciones de calcio (13).

La disminución de las concentraciones de hormonas tales como dehidroepiandrosterona, estrógenos y testosterona asociadas al envejecimiento se pueden relacionar con el incremento en los niveles de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT-K) y de interleucina 6 (IL-6), que a su vez puede inhibir la producción y secreción de hormonas (13).

Los patrones de secreción en la mayoría de las hormonas hipofisarias, gonadales y suprarrenales tienen ritmos circádicos con un máximo y un mínimo en cada periodo de 24 h, y pueden servir como ejemplo de muchos otros procesos biológicos que se ajustan a variaciones circadianas de acuerdo con la actividad de marcapasos o "relojes biológicos" endógenos (núcleo supraquiasmático) y/o cambios circádicos de las características del medio ambiente (luz-oscuridad) (14).

El envejecimiento tiene influencia sobre la amplitud y periodo de muchos de los ritmos circadianos, algunos que se afectan más que otros pueden llevar a la pérdida o al deterioro de la organización temporal de funciones importantes como los patrones de sueño-vigilia, la ingesta de alimentos y la secreción hormonal. En

general las alteraciones de las características circadianas de muchas funciones que se observan en los viejos se han atribuido a modificaciones del funcionamiento de los “relojes biológicos” endógenos (14). Entre estos destaca la síntesis y secreción circádica de melatonina por parte de la glándula pineal con un máximo durante la parte de oscuridad y un mínimo durante la parte de luz del periodo de 24 hrs. Estas variaciones circádicas se atenúan notablemente con el transcurso de la edad, de tal manera que los valores máximos de los indicadores de la secreción de melatonina y sus consecuencias sobre su concentración plasmática y tisular en los individuos viejos corresponde a valores 5 a 10 veces menores que en los individuos jóvenes. Este fenómeno se ha observado en seres humanos y en diferentes especies de animales de experimentación y es especialmente notable en aquellos que dependen en mayor medida de los ciclos de luz y oscuridad (14 -15).

El metabolismo energético se modifica de manera importante durante el proceso de envejecimiento (16). La pérdida progresiva de masa corporal, la menor capacidad en el mantenimiento metabólico de las funciones corporales y el deterioro del control homeostático del metabolismo energético son algunos resultados de los cambios del metabolismo energético asociados al envejecimiento. En muchos casos estas condiciones favorecen la disminución del metabolismo basal con pérdidas de la función calorigénica y de la regulación térmica, la tendencia creciente a la hiperglucemia en ayuno e intolerancia a la glucosa, y el desarrollo de diabetes especialmente la forma tipo 2, aumento de la glucosilación no enzimática de proteínas funcionales y estructurales, desarrollo de

estrés oxidativo, de estados de hiperlipidemia e hipercolesterolemia acompañados de presencia de lipoproteínas oxidadas, particularmente lipoproteínas de baja densidad (LDL), de gran repercusión en los procesos de aterogénesis vascular, descenso global de la síntesis de proteínas y la menor velocidad de su recambio.

En el envejecimiento las alteraciones que ocurren en el sistema esquelético se centran en la funcionalidad de los factores de crecimiento a nivel local de las articulaciones o a través de la circulación, que pueden afectar la capacidad para sanar cuando se presentan lesiones a nivel del cartílago o para regular la formación de hueso nuevo. Las concentraciones de hormonas de crecimiento (HG), insulina, e factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) como factores de crecimiento han recibido mucha atención debido a sus efectos anabólicos a nivel de cartílago y hueso (17).

### **Envejecimiento y sistema nervioso central**

Es evidente que conforme avanza la edad las características morfológicas y funcionales del sistema nervioso, principalmente del cerebro, van cambiando. A partir de la edad adulta conforme aumenta la edad, especialmente a partir de los 60 años, se considera que las capacidades de los individuos en lo que respecta a las funciones que dependen principalmente de la actividad cerebral tienden a declinar progresivamente (figura 1), si bien la rapidez con que ocurren estos cambios y la naturaleza de los mismos son diferentes en condiciones de envejecimiento exitoso, en contraste con lo que ocurre cuando el envejecimiento transcurre bajo condiciones ambientales y/o patologías capaces de afectar de manera directa o indirecta a las estructuras y al funcionamiento cerebral.

En la figura 1 se ilustran distintas posibilidades en el curso temporal de las alteraciones del funcionamiento cerebral asociadas al proceso de envejecimiento. El envejecimiento normal o “exitoso” se representa en la figura como una línea que transcurre a lo largo del tiempo con una ligera inclinación en el sentido del deterioro funcional del cerebro a partir de la quinta década de la vida. Sin embargo, la inclinación de esta línea puede acentuarse, en el sentido del deterioro funcional del cerebro, cuando en el proceso de envejecimiento inciden diversos factores ambientales o patologías asociadas que favorecen el deterioro de la estructura y la función de las distintas partes que constituyen el sistema nervioso central. En estas condiciones, la velocidad del deterioro cerebral asociado al envejecimiento puede ser más mayor e iniciarse tempranamente durante la edad adulta (fase de iniciación). En esta fase, usualmente diversos mecanismos cerebrales pueden entrar en juego exitosamente y compensar en parte o en su totalidad las alteraciones funcionales del cerebro inducidas por patologías o factores ambientales y asociadas al envejecimiento. En cambio, si la capacidad de compensación de dichas alteraciones es rebasada, se acelera aún más el deterioro cerebral subsecuente, dando lugar a la fase de propapagación. Así, el envejecimiento “exitoso” debería transcurrir hasta edades avanzadas con muy pocas alteraciones funcionales cerebrales, particularmente de las capacidades cognitivas; en cambio, la presencia de factores fisiopatológicos o ambientales capaces de acelerar el deterioro de las funciones cerebrales dan lugar a fases de iniciación y propagación en las que se hace evidente la rápida progresión del deterioro de las funciones cerebrales, incompatible con una adecuada calidad de vida de los individuos. La presencia de diversas formas de demencia podría en

muchos casos ser la característica más importante de esta fase de propagación (3).

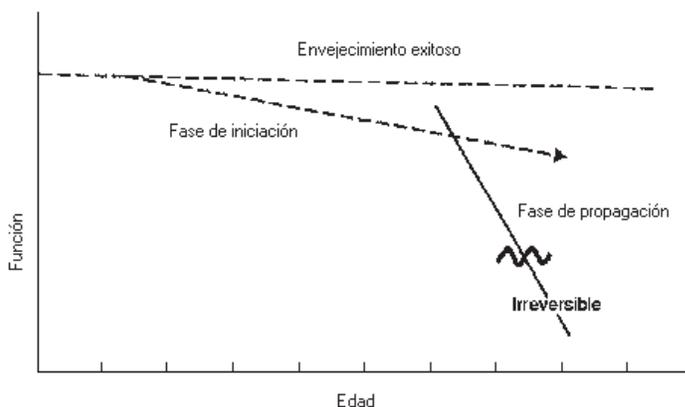


Figura 1. Esquema de las distintas fases del envejecimiento cerebral. La figura muestra la declinación progresiva pero a largo plazo de las funciones cerebrales durante el envejecimiento normal o “exitoso”; en contraste con la reducción progresiva, acelerada de las funciones cerebrales cuando hay factores agregados, fisiopatológicos o de otro tipo que contribuyen al deterioro cerebral asociado al envejecimiento (fase de iniciación) y la declinación brusca en muy corto tiempo de las funciones cerebrales como consecuencia del agravamiento de las condiciones de deterioro previas (fase de propagación) hasta un grado de deterioro muy importante e irreversible (3).

El envejecimiento cerebral se ha relacionado con: disminución del peso y del volumen cerebral, atrofia cortical, pérdida de neuronas de estructuras cerebrales corticales y subcorticales, modificaciones de los componentes subcelulares de las neuronas y de las células gliales. La secuencia en que estos fenómenos afectan a las estructuras cerebrales parecen tener relación con sus características filogenéticas y ontogenéticas, así, las estructuras más antiguas – rinencéfalo y formación hipocámpica - son las primeras en mostrar signos de reducción del volumen. De hecho se ha descrito disminución del volumen en prácticamente

todas las estructuras cerebrales, con el aumento consiguiente del tamaño de los ventrículos y del volumen del líquido cefalorraquídeo (4). El peso promedio del cerebro es de 1,350 g en el hombre y 1,250 g en la mujer, adultos; sin embargo tiende a disminuir después de los 60 años en ambos sexos aproximadamente 100 g. Esta disminución del peso asociado con el envejecimiento cerebral "normal" se ha atribuido principalmente a la disminución del contenido de lípidos y proteínas, así como a la reducción del flujo sanguíneo y del aumento de la resistencia vascular cerebrales, aunque no se ha precisado cual de estos podría ser un elemento primario y cuales serían los secundarios. El aumento gradual del diámetro transversal del tercer ventrículo a partir de la quinta década de la vida parece deberse a sí mismo a la reducción progresiva del volumen de los núcleos diencefálicos talámicos e hipotalámicos (4).

En lo que se refiere a los cambios de las funciones cerebrales durante el proceso de envejecimiento llama la atención la disminución progresiva de las capacidades cognoscitivas (aprendizaje y memoria) e intelectuales (4, 18 - 21). Esto se ha atribuido principalmente a los cambios de la estructura (atrofia de las células piramidales, disminución en el número de sinapsis y de las arborizaciones dendríticas) y del funcionamiento del hipocampo, la neocorteza, el cuerpo estriado (disminución de la densidad de receptores estriatales dopaminérgicos) y el cerebelo (4, 18 - 21). Asimismo, tienen importancia las anormalidades del citoesqueleto de las neuronas que forman parte de los circuitos neuronales de estas estructuras que repercuten en el funcionamiento neuronal. Se conoce que el citoesqueleto participa tanto en el mantenimiento de la forma de las neuronas como en la ubicación adecuada de sus diferentes elementos estructurales

(membranas, proteínas, etc.) en sitios específicos del citoplasma, de la membrana plasmática o del núcleo y que el ordenamiento de los diferentes elementos estructurales en sitios específicos de la neurona es esencial para su funcionamiento, tanto en el sustrato neuronal que tiene que ver con la integración de la información aferente, como con el involucrado en la generación y transmisión de la información eferente, en la organización de los circuitos y en la plasticidad neuronal (18). La alteración y eventualmente la pérdida progresiva de este ordenamiento estructural de las neuronas es uno de los principales fenómenos histológicos que ocurren en el envejecimiento cerebral y forman parte de la histopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (18-19, 21). Por otra parte, estos cambios originados a nivel subcelular pueden traducirse en alteraciones del funcionamiento cerebral, con pérdida o deterioro progresivo de diversas funciones, según las estructuras cerebrales mayormente afectadas, en el transcurso del envejecimiento (18).

## ANTECEDENTES

La importancia del funcionamiento cerebral para la salud y la calidad de vida de los individuos ha generado un enorme interés por el conocimiento por los fenómenos ligados a las alteraciones cerebrales durante el envejecimiento, tanto en ausencia de patologías cerebrales asociadas, como en presencia de situaciones fisiopatológicas que afectan al sistema nervioso central en formas diversas. Entre estas destacan algunas que han sido consideradas “epidémicas” por su frecuencia y gravedad; como es el caso de las varias modalidades de demencias, entre las que destaca la enfermedad de Alzheimer que es la forma más común de demencia en individuos mayores de 60 años y ciertamente uno de los padecimientos degenerativos del sistema nervioso central más devastadores, cuyos principales factores de riesgo, se asocian con fenómenos que ocurren con el envejecimiento (19).

En ausencia de patologías cerebrales manifiestas, se ha observado que las expresiones tempranas del envejecimiento cerebral, incluyen frecuentemente alteraciones de los procesos cognoscitivos, de naturaleza y magnitud diversas, entre los que destacan la disminución de la velocidad de aprendizaje, la mayor dificultad para la resolución de problemas, la disminución de la capacidad para retener y recordar información, la deficiencia de la fluidez verbal y el deterioro de la inteligencia general. En particular, la memoria declarativa, la memoria de trabajo, así como la memoria relacionada con la orientación espacial y temporal se encuentran asociadas frecuentemente a las alteraciones tempranas del envejecimiento cerebral (19-21-22).

En estas condiciones, resultan afectadas en mayor o en menor grado las capacidades de los individuos, en sí mismos y en su interacción con el medio familiar y social en el que se ubican; por lo que la investigación de los fenómenos cerebrales asociados al envejecimiento con o sin patologías cerebrales agregadas, ha adquirido gran importancia en los últimos años en función de la sustentación de propuestas para la preservación de la integridad anatómico-funcional del sistema nervioso central durante la vejez; así como, para la prevención y el tratamiento de las situaciones fisiopatológicas que pueden ocurrir o adquirir mayor relevancia en esta etapa de la vida.

En este sentido, han tenido gran relevancia las evidencias obtenidas en animales de experimentación (23) en los que se ha identificado que las alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento coinciden con las observadas en los seres humanos; de ahí la posibilidad y la validez del abordaje experimental de los fenómenos neurales subyacentes al envejecimiento cerebral.

De esta manera se ha podido establecer que las alteraciones de las capacidades cognitivas que son características de las etapas tempranas del envejecimiento cerebral (memoria declarativa, memoria de trabajo, memoria relacionada con la orientación espacial y temporal), son el resultado de modificaciones de la estructura y/o del funcionamiento de circuitos neuronales que forman parte del hipocampo y sus conexiones, principalmente con la corteza prefrontal y el cuerpo estriado (24-33). Para ello, gran parte de la información se ha obtenido a partir de las características de los parámetros de ejecución de roedores en el laberinto acuático de Morris y en el laberinto radial de 8 brazos de Olton, bajo condiciones

experimentales determinadas por la naturaleza de las funciones cognoscitivas que se desea explorar (34-36).

Los resultados experimentales de diversos autores coinciden en la observación de una menor velocidad de aprendizaje espacial y menor eficiencia de la memoria de trabajo durante el envejecimiento, sin modificaciones evidentes de la población neuronal del hipocampo, especialmente de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon y las neuronas granulares del giro dentado (37). Por ello, se ha considerado que las alteraciones de las funciones cognoscitivas durante las etapas tempranas del envejecimiento cerebral, pueden ser el resultado de cambios en aquellos fenómenos celulares directamente involucrados en los mecanismos neurales del aprendizaje y la memoria espacial, entre los que se han identificado a las modificaciones de las características de la potenciación a largo plazo (LTP), de la capacidad de establecimiento de conexiones sinápticas que requiere la “plasticidad a corto plazo” , de la eficiencia de procesos de neurotransmisión, principalmente glutamatérgica y colinérgica, entre otros (24, 32, 38).

Las estructuras cerebrales involucradas en la integración de las funciones cognoscitivas, cuyo deterioro coincide con las etapas tempranas del envejecimiento cerebral, son por otra parte las estructuras cerebrales más vulnerables ante diversas condiciones (isquemia, hipoxia, estrés oxidativo, etc) agresivas para el sistema nervioso central (22, 24, 39).

El conocimiento que se tiene hasta la fecha acerca de los fenómenos que podrían explicar el deterioro de las funciones cerebrales en individuos viejos ha permitido identificar a diversos factores que influyen en ese proceso. Así, se han identificado

factores genéticos (genes de envejecimiento), metabólicos (radicales libres), hormonales (declinación de la actividad secretora gonadal), ambientales (contaminantes, metales pesados) y patológicos (diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica) que pueden influir individualmente o en su conjunto en las características del envejecimiento cerebral (40-41). Asimismo, se han buscado explicaciones de los fenómenos cerebrales asociados al envejecimiento en procesos celulares relacionados con cada uno de estos factores; así como con su concurrencia e interacción durante el envejecimiento cerebral.

En cuanto a los factores metabólicos asociados al envejecimiento cerebral, destacan las evidencias acerca de la presencia e impacto del estrés oxidativo sobre la estructura y funcionamiento de los componentes celulares del sistema nervioso central. En efecto, se conoce que el envejecimiento cerebral se asocia con cambios en el balance oxidativo de las neuronas con las consiguientes consecuencias sobre otros aspectos funcionales de estas y otras células que forman parte de las diferentes estructuras cerebrales (7, 42-43).

Se sabe que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como resultado de la actividad metabólica mitocondrial se incrementa conforme avanza la edad, y que la actividad de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CA) están disminuidas en el cerebro de individuos viejos, aparentemente debido a la menor expresión de los genes determinantes de su síntesis (7, 42-44).

Los componentes celulares del tejido nervioso son de las estirpes celulares más susceptibles al daño celular que pueden provocar las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (45) y otros

compuestos peroxidantes debido al gran consumo de oxígeno, a la gran actividad metabólica en relación a la masa de tejido neural y a las cantidades limitadas de enzimas antioxidantes; así como a la gran cantidad de sustrato lipídico expuesto a la lipoperoxidación en diversas estructuras subcelulares especialmente las membranas (7). De hecho, estudios recientes muestran el incremento del daño neuronal atribuible al desbalance entre producción de compuestos oxidantes y actividad de enzimas antioxidantes durante el envejecimiento cerebral normal, así como, en otro rango de magnitud, en la enfermedad de Alzheimer que en algunos aspectos se ha considerado como un ejemplo de daño neuronal acelerado en el envejecimiento que afecta predominantemente algunas regiones del cerebro como el hipocampo y la corteza prefrontal y que es atribuible al daño progresivo ocasionado por ROS y otros radicales libres peroxidantes y en consecuencia pueden dar lugar a la alteración de las funciones cerebrales que dependen predominantemente de la integridad anatómico-funcional de esas estructuras (24,42-44).

Por otra parte, una vez iniciados los fenómenos del envejecimiento normal (sin patologías neurológicas asociadas) o patológico que incluyen daño oxidativo a los componentes celulares de estructuras cerebrales específicas, también los sistemas de neurotransmisión muestran alteraciones cualitativas y cuantitativas de sus mecanismos de regulación y los cambios en la secreción de algunas hormonas esteroideas y de la melatonina pueden contribuir a las modificaciones cerebrales conducentes al deterioro de sus funciones (46-49).

Con base en las evidencias que se tienen hasta la fecha acerca del daño cerebral debido al desbalance oxidativo como explicación del deterioro de funciones

cerebrales durante el envejecimiento, se ha propuesto a la restricción calórica (disminución de la ingesta calórica lo suficiente para mantener el peso corporal 20% menor que el peso ideal) y al incremento de la capacidad antioxidante del tejido cerebral mediante el suministro de compuestos antioxidantes, como posibles procedimientos neuroprotectores en el transcurso del envejecimiento (7, 22, 42-44, 50-53).

En este sentido cabe mencionar a la melatonina, una hormona capaz de influir sobre diversos fenómenos celulares a lo largo de la vida de los individuos, secretada de manera circádica por la glándula pineal y por otros órganos, es un eficiente atrapador de radicales libres, e inductor de la síntesis y la actividad de enzimas antioxidantes, propiedades en las que se le ha sustentado experimentalmente su capacidad de proteger a diversas extirpes celulares contra el daño debido a la alteración de los mecanismos oxidativos (49).

De hecho, las propiedades antioxidantes de la melatonina se han utilizado como justificación de su administración como parte del tratamiento de diversas formas de cáncer, úlcera gástrica, cardiopatía isquémica, daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas y demencias (54-58). Asimismo, otras acciones de la melatonina mediadas a través de receptores específicos (59) han sustentado su uso en seres humanos como inmunomodulador (60), anticancerígeno, en el tratamiento del síndrome "jet lag", trastornos del sueño, desordenes afectivos estacionales y alteraciones neuroendocrinas (61-70).

En el sistema nervioso central la pérdida del balance oxidativo celular puede culminar con la muerte de los componentes de diversas estructuras cerebrales y/o la alteración o pérdida de funciones. Así, la muerte o las alteraciones funcionales

de las neuronas que constituyen los circuitos principales del hipocampo y de la corteza prefrontal expuestos a las acciones dañinas de las ROS o las RNS, se traducen en alteración de las funciones cognoscitivas en modelos experimentales de diversas neuropatologías. Por ello, el hecho de que en estas condiciones el daño cerebral sea reducido mediante la administración de melatonina ha permitido explicar el mecanismo de su efecto neuroprotector y sustentar la potencialidad de su uso clínico como parte del tratamiento de diversas neuropatologías en las que el daño neuronal está mediado por estrés oxidativo, incluyendo las alteraciones cerebrales asociadas al proceso de envejecimiento (54-65).

Por otra parte, diversas evidencias experimentales muestran que la melatonina retarda el inicio y la progresión de las alteraciones funcionales cerebrales asociados al avance de la edad en individuos viejos (72-73) y puede ser incluido en el grupo de compuestos potencialmente eficaces para la prevención y el tratamiento de las alteraciones cognoscitivas asociadas al envejecimiento, de la misma manera que ha ocurrido con otros compuestos antioxidantes (22-50-53). De hecho existen a la fecha algunos estudios referentes a los efectos neuroprotectores de la melatonina en el curso de enfermedades neurodegenerativas asociadas o coincidentes con el envejecimiento cerebral (83-84), especialmente en pacientes con enfermedad de Alzheimer. No obstante, hasta el momento no se tiene información relevante en la literatura acerca de los efectos de la melatonina sobre las alteraciones cognoscitivas y otros procesos neurales asociados al envejecimiento cerebral en ausencia de neuropatologías en seres humanos.

De la misma manera existen pocos estudios experimentales acerca de los efectos de la melatonina sobre el daño en los componentes neuronales de estructuras cerebrales específicas vulnerables a los cambios del balance oxidativo e involucradas en la integración de aquellas funciones cognitivas cuya alteración se asocia frecuentemente al proceso de envejecimiento.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las alteraciones cerebrales asociadas al proceso de envejecimiento por si mismas o en presencia de otras neuropatologías, constituyen un problema prioritario de salud en vista del notable incremento presente y futuro de individuos con edades de 60 años o más según se infiere de la tendencia a la inversión de la pirámide poblacional. Esta situación lleva implícita la necesidad de contar con los conocimientos suficientes acerca de los fenómenos del envejecimiento cerebral, que permitan sustentar propuestas tendientes a la preservación de la integridad anatomo-funcional del cerebro y en su caso para la prevención y el tratamiento del daño y de las alteraciones funcionales del envejecimiento cerebral. Entre estas se han considerado importantes las medidas de neuroprotección farmacológica basadas en la relación de oposición entre los mecanismos del daño cerebral por envejecimiento y los mecanismos de acción de compuestos endógenos o exógenos. De esta manera parece importante sustentar experimentalmente el posible efecto neuroprotector de la melatonina en contra de las alteraciones funcionales del hipocampo y la corteza prefrontal en el envejecimiento.

¿La melatonina tiene efecto neuroprotector en contra de las alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento cerebral en la rata?

## **JUSTIFICACION**

La búsqueda de fármacos que disminuyan o prevengan las alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento es un aspecto fundamental en el diseño de nuevas estrategias de prevención y tratamiento de las alteraciones del funcionamiento cerebral asociadas al proceso del envejecimiento.

## **HIPOTESIS**

La administración crónica de melatonina tiene efecto neroprotector en contra de las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial y de trabajo asociadas al envejecimiento en la rata.

## **OBJETIVO**

Evaluar el efecto neuroprotector de la administración crónica de melatonina en contra del daño cerebral que da por resultado las alteraciones del aprendizaje y la memoria de referencia espacial y de trabajo asociadas al envejecimiento en la rata.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 18 meses de edad, con un peso 300 - 350 g, los cuales fueron sometidos a una batería de pruebas para evaluar el aprendizaje de lugar, la memoria de referencia espacial y la memoria de trabajo y a continuación fueron asignadas de manera aleatoria a cualquiera de dos grupos . El grupo con tratamiento recibió diariamente una dosis de 5 mg /kg de melatonina (Sigma Chemical Company) a través de una sonda orogástrica, 38.5 cm de longitud y diámetro externo de 1.67mm (73) a las 19:00 h durante 6 meses. El grupo sin tratamiento recibió en la misma forma la cantidad equivalente del vehículo de la melatonina, durante el mismo tiempo. Al término de este período (24 meses de edad) se repitió la batería de pruebas conductuales y se compararon los resultados del grupo con tratamiento y sin tratamiento.

En todos los animales se identificó a intervalos de un mes durante los 6 meses de tratamiento con melatonina o vehículo la presencia o ausencia de ciclos estrales y en este caso el estado hormonal remanente, mediante frotis vaginales (87).

Para la evaluación del aprendizaje del lugar de los animales de experimentación, a los 18 y a los 24 meses de edad, con o sin tratamiento se utilizó el laberinto acuático de Morris (Figura 2-A).

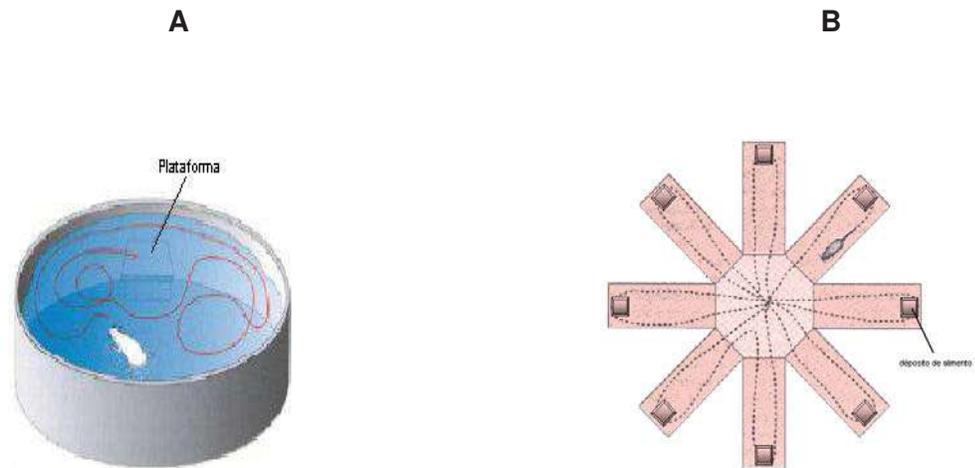


Figura 2. Esquemas ilustrativos de las características del laberinto acuático de Morris y del laberinto de 8 brazos de Olton. Puede observarse la ilustración de la trayectoria de la rata en búsqueda de la plataforma sumergida en el laberinto de Morris. Note las posibilidades de desplazamiento de la rata en el laberinto de 8 brazos de Olton en función de la localización del alimento en los diferentes brazos.

Este dispositivo consiste en una tina circular de 1.4 m de diámetro por 0.45 m de profundidad, conteniendo agua a una temperatura de 24<sup>o</sup> C, teñida de color oscuro, a fin de impedir que los animales pudieran percibir cualquier objeto colocado bajo la superficie del agua. La tina se dividió en cuatro cuadrantes iguales mediante líneas imaginarias que cruzaron la tina por el centro, los cuales fueron designados norte, sur, este y oeste. En el cuadrante sur se colocó una plataforma cuadrada de 15cm de lado por 25 cm de alto la cual quedaba sumergida a un centímetro por debajo de la superficie del agua. La tina fue colocada permanentemente en un lugar donde los animales de experimentación podían percibir las señales visuales provenientes del ambiente durante las pruebas. La ejecución de las pruebas de cada uno de los animales fue registrada mediante una cámara de video suspendida en el techo sobre la tina.

El desempeño de actividades cognoscitivas en el laberinto de Morris fue evaluado en cada uno de los animales mediante ensayos de entrenamiento, (que se realizaron diariamente, en número de dos a intervalos de 20 minutos durante 10 días) y pruebas de transferencia (una prueba cada día, 20 min después del segundo ensayo de entrenamiento). Para los ensayos de entrenamiento se colocó a la rata de cara a la pared de la tina, permitiéndole nadar en busca de la plataforma por un tiempo máximo de 60 seg. una vez que la rata localizaba y subía a la plataforma se le permitió permanecer sobre ella durante 15 seg. Si la rata no localizaba la plataforma a los 60 seg. era colocada sobre ella por el investigador donde permanecía 15 seg. El punto de inicio de cada ensayo fue en los diferentes cuadrantes (sur, norte, este y oeste) elegido al azar mientras que la posición de la plataforma siempre fue constante. El ensayo de entrenamiento se realizó dos veces diariamente (primero y segundo ensayo) con un intervalo de veinte minutos entre cada ensayo durante 10 días consecutivos.

Para la prueba de transferencia se permitió a las ratas nadar libremente durante 30 seg en busca de la plataforma que ya había sido retirado de la tina, con la finalidad de analizar las características de las maniobras de búsqueda de la plataforma que hicieron los animales en cada cuadrante.

El aprendizaje durante los ensayos de entrenamiento se evaluó mediante la latencia de escape (el tiempo que tarda la rata en encontrar la plataforma a partir de cualquier punto en el laberinto), la distancia recorrida, la velocidad del nado y las características de las rutas de nado que siguieron las ratas de los diferentes grupos para encontrar la plataforma.

El aprendizaje durante las pruebas de transferencia se evaluó mediante el número de cruces de cada animal por el cuadrante donde se encontraba la plataforma, en comparación con el número de cruces por los otros cuadrantes.

Para la evaluación de la memoria de trabajo y la memoria de referencia espacial de los animales de experimentación, a los 18 y a los 24 meses de edad, con o sin tratamiento se utilizó el laberinto de ocho brazos de Olton (Fig. 2-B).

El desempeño de actividades cognoscitivas en el laberinto radial de Olton fue evaluado en cada uno de los animales mediante ensayos de habituación, (uno diariamente durante 3 días consecutivos), ensayos de entrenamiento (uno diariamente durante 9 días consecutivos) y ensayo de prueba (un día después del último ensayo de entrenamiento).

El laberinto radial de Olton consiste en 8 brazos de material acrílico de 66 cm de longitud por 10 cm de ancho con un pequeño contenedor de 5 por 5 cm por 3 cm de profundidad para colocar alimento en el extremo final de cada brazo, con una plataforma central de 31 cm de diámetro cuya superficie se continua con cada uno de los brazos. El laberinto se colocó permanentemente en un lugar donde la rata podía percibir cada día las señales visuales provenientes del ambiente.

Para la realización de los diferentes procedimientos en el laberinto radial de Olton los animales se mantuvieron en restricción de alimento (20% del suministro normal) desde 5 días antes del inicio de los ensayos de habituación, y durante éstos y durante los ensayos de entrenamiento y el de prueba.

Para los ensayos de habituación se depositó alimento (cereal de fruta, 0.5g) en el contenedor de los 8 brazos del laberinto, se colocó a la rata en la plataforma central y se le permitió explorar y acceder a cada uno de los brazos donde podía

consumir el alimento, el cual fue reabastecido una vez que fue consumido. El ensayo se dio por terminado cuando la rata había visitado los 8 brazos del laberinto o transcurrieron 10 minutos a partir del inicio del ensayo.

Para los ensayos de entrenamiento solamente se abastecieron con alimento 5 de los 8 brazos del laberinto. Una vez colocada la rata en la plataforma central se permitió que accediera a los diferentes brazos y consumiera el alimento colocado en los 5 brazos abastecidos, lo cual determinó el término de la prueba; de otro modo la prueba terminó cuando transcurrieron 10 min a partir del inicio del ensayo sin que la rata consumiera el alimento colocado en los 5 brazos abastecidos. Se evaluó el número de errores de memoria de referencia espacial (ingreso de la rata a un brazo donde no había comida) y memoria de trabajo (ingreso de la rata a un brazo donde había ingresado previamente y consumido el alimento).

Para el ensayo de prueba se cambió la posición de los brazos del laberinto mediante un giro de 45 grados y se evaluaron el número de errores de memoria de trabajo y de referencia espacial.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de latencia de escape fueron comparados entre los grupos utilizando ANOVA de Friedman y la prueba *post-hoc* de Wilcoxon, con la finalidad de observar el aprendizaje de los animales. Las comparaciones intergrupales se realizaron con “U” de Mann-Whitney (88-89).

El número de cruces por cuadrante fueron comparados utilizando ANOVA para medidas repetidas y la prueba *post-hoc* de Tukey (88-89).

La velocidad de nado fueron comparados utilizando ANOVA para medidas repetidas y la prueba de *post-hoc* de Tukey.

El número de errores en el laberinto radial fueron comparados utilizando ANOVA para medidas repetidas y la prueba de *pos-hoc* de Tukey (88-89).

## RESULTADOS

Las características de los animales de experimentación asignados a los dos grupos en estudio fueron similares; es decir edad de 18 meses al inicio de la primera evaluación de las capacidades cognoscitivas y 24 meses al tiempo de la segunda evaluación de estas funciones. Tanto a los 18 como 24 meses de edad el peso de los animales en los diferentes grupos no mostraron diferencias significativas (Tabla 1). Sin embargo cabe hacer notar la tendencia a la reducción del peso corporal de los animales con tratamiento a los 24 meses de edad en comparación con el peso de ellos mismos a los 18 meses, en tanto que los animales del grupo sin tratamiento mostraron un ligero incremento del peso corporal a los 24 meses en comparación con el peso corporal a los 18 meses.

Tabla 1. Peso corporal (media  $\pm$  EE) de los animales en los diferentes grupos experimentales.

GRUPO / EDAD	18 MESES	24 MESES
Grupo con tratamiento	322 $\pm$ 8.2 g	306 $\pm$ 12.1 g
Grupo sin tratamiento	315 $\pm$ 7.9 g	324 $\pm$ 9.3 g

Los resultados de la evaluación de los frotis vaginales para determinar en cada uno de los animales el curso temporal de las modificaciones o en su caso la pérdida de los ciclos ovulatorios espontáneos, se muestran en la tabla 2. A partir de los 18 meses de edad ninguno de los animales presentó ciclos ovulatorios espontáneos, en cambio se observó en los diferentes animales estro o diestro persistente.

Tabla 2. Número de animales en estro o en diestro persistente durante el periodo comprendido entre los 18 y 24 meses de edad.

FASE DEL CICLO	CON TRATAMIENTO	SIN TRATAMIENTO
ESTRO	2	3
DIESTRO	6	5
TOTAL	8	8

Los resultados de la evaluación de las capacidades cognoscitivas de los animales de experimentación incluidos en los dos grupos a los 18 meses de edad, en el laberinto acuático de Morris se muestran en la figura 3A. Puede observarse que tanto los animales asignados al grupo que recibiría tratamiento con melatonina (grupo con tratamiento), como los asignados al grupo que recibiría vehículo (grupo sin tratamiento) presentaron las mayores latencias de escape el primer día de prueba, con latencias cercanas al tiempo límite permitido para la prueba  $58 \pm 3$  seg en el grupo sin tratamiento; y  $57 \pm 3$  seg en el grupo con tratamiento. (Mediana  $\pm$  EE) para disminuir progresivamente en las pruebas realizadas los días 2, 3 y 4 hasta alcanzar un criterio de aprendizaje con disminución significativa de los valores de la latencia de escape a partir del 5to día de prueba en que los valores se redujeron hasta 8 segundos en el grupo con tratamiento y 7 seg en el grupo sin tratamiento. Las latencias de escape observadas del día 6 al día 10 se mantuvieron sin cambios significativos en cada grupo con valores similares a los observados el 5 día de prueba. No se observaron diferencias significativas intergrupales en los valores de latencia de escape en el laberinto acuático de Morris.

La figura 4A muestra imágenes características de las trayectorias que siguió un animal de cada grupo para localizar la plataforma en el laberinto acuático de Morris los días de prueba 1, 3, 6 y 9, a los 18 meses de edad. Es evidente la reducción de la longitud de la trayectoria y el establecimiento de una estrategia de localización de la plataforma una vez que los animales llegaron al criterio de aprendizaje a partir del 3er día de prueba.

Los resultados de las pruebas de transferencia efectuadas a los 18 meses de edad luego de un intervalo de 20 minutos a partir del final de la evaluación diaria de las latencias de escape (días 1 a 10) se muestran en la figura 5A. Puede observarse que al retirar la plataforma del sitio donde estuvo ubicada durante las evaluaciones de la latencia de escape, la estrategia de búsqueda de la plataforma evaluada por el número de cruces (expresado como %) que realizaron los animales a través de los diferentes cuadrantes de la tina, muestra que conforme los animales adquieren el criterio de aprendizaje a partir del 3-4 día de prueba, la búsqueda se orienta preferentemente al cuadrante donde había estado ubicada la plataforma, a diferencia de lo ocurrido durante los 3 primeros días de prueba en donde el desplazamiento de los animales en la búsqueda de la plataforma no mostró orientación o preferencia por un cuadrante determinado.

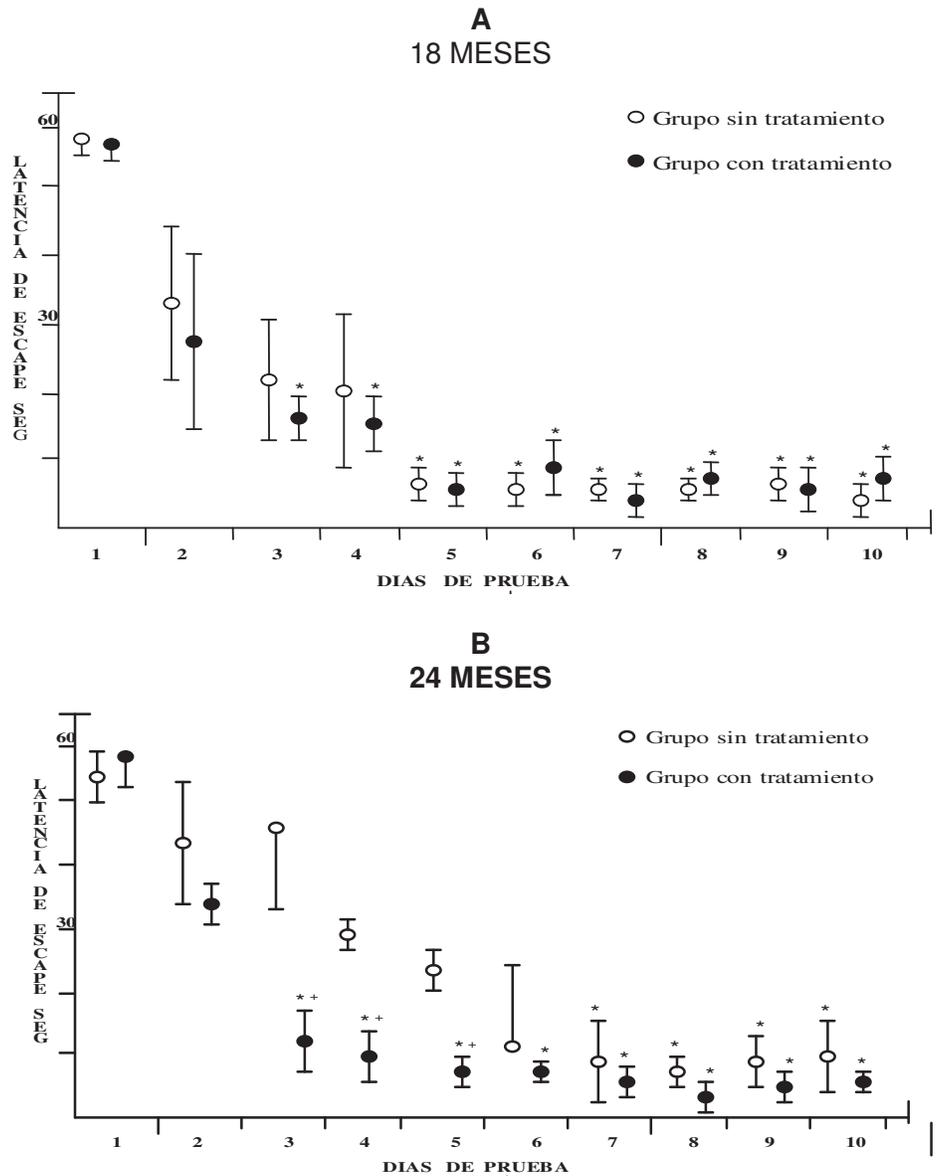


Figura 3. Latencia de escape (mediana  $\pm$  EE) de los grupos sin tratamiento y con tratamiento en los diferentes días de prueba en el laberinto acuático de Morris a los 18 y a los 24 meses de edad. Puede observarse la reducción progresiva hasta un mínimo de latencia para encontrar la plataforma a partir del 3er día de prueba en ambos grupos a los 18 meses y el retraso del grupo sin tratamiento en adquirir criterios de aprendizaje a los 24 meses de edad en comparación con el grupo tratado con melatonina en el que se observaron criterios de aprendizaje a partir del 3er día de prueba. \*  $p < 0.05$ , comparación intragrupal con respecto al primer día de prueba; +  $p < 0.05$  comparación intergrupual el mismo día de prueba.



Figura 4. Ilustración de las trayectorias de un animal del grupo con tratamiento y de un animal del grupo sin tratamiento a los 18 y a los 24 meses de edad, durante la ejecución de las pruebas en el laberinto acuático de Morris. Puede observarse la reducción progresiva de las trayectorias utilizadas para encontrar la plataforma; así como una estrategia definida de búsqueda a partir de los días 6 y 9 de prueba, con características similares en ambos grupos a los 18 meses de edad y en el grupo con tratamiento a los 24 meses y un ligero retraso en la adquisición de estas características en el grupo sin tratamiento a los 24 meses de edad.

La persistencia de la búsqueda de la plataforma en el cuadrante donde originalmente había estado colocada dio como resultado esquemas de trayectorias que sugieren una estrategia de búsqueda bien orientada a partir del 3er día de prueba, en ambos grupos a los 18 meses de edad, antes de que se iniciaran los tratamientos con melatonina o con vehículo (Fig. 6A)

Estrategias y resultados similares fueron observados tanto en los animales que recibirían vehículo como en los animales del grupo que recibiría tratamiento con melatonina sin diferencias significativas intergrupales.

Los resultados de la evaluación de las capacidades cognoscitivas en el laberinto acuático de Morris en los animales, luego de haber recibido una dosis diaria de melatonina o de vehículo por vía oral durante 6 meses se muestran en la figura 3B. Puede observarse que la curva de aprendizaje en los animales del grupo con tratamiento a los 24 meses de edad es similar a la observada en el mismo grupo a los 18 meses de edad; en cambio los animales del grupo sin tratamiento no alcanzaron a los 24 meses el criterio de aprendizaje en el mismo número de pruebas en que lo hicieron ellos mismos a los 18 meses de edad o los animales del grupo con tratamiento a los 24 meses de edad. Así las latencias de escape correspondientes a las pruebas efectuadas los días 4, 5 y 6 fueron significativamente mayores en el grupo sin tratamiento que las observadas en el mismo grupo a los 18 meses de edad o el grupo con tratamiento a los 18 y a los 24 meses de edad. Las trayectorias y estrategias de búsqueda de la plataforma corresponden a las características de las latencias de escape (Fig. 4B)

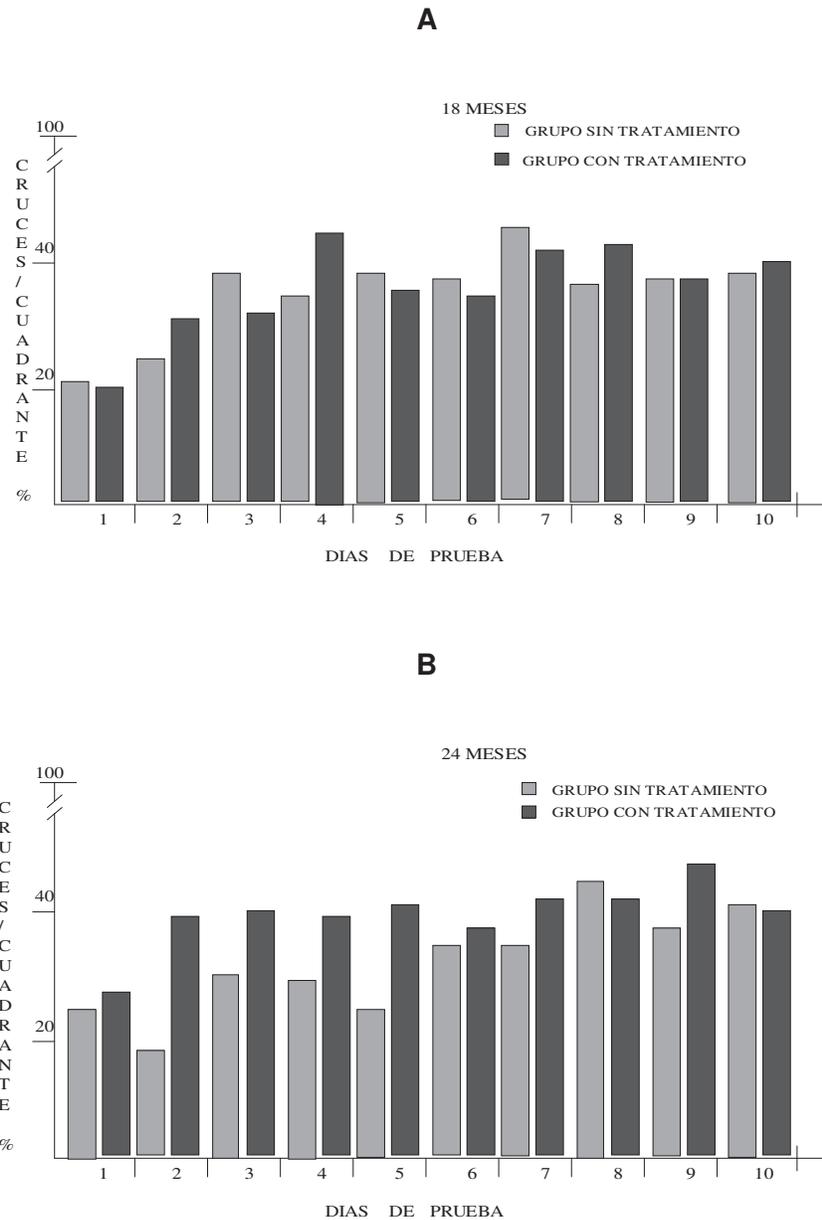


Figura 5. Proporción del número de cruces por el cuadrante donde debería estar ubicada la plataforma, de los grupos sin tratamiento y con tratamiento durante la prueba de transferencia efectuada a los 18 y a los 24 meses de edad. Puede observarse que el número de cruces por el cuadrante de la plataforma adquiere proporciones del orden del 40% a partir del 4to día de prueba en ambos grupos a los 18 meses de edad y en el grupo con tratamiento a los 24 meses. En tanto que esta proporción de cruces se observa hasta el 7 día en el grupo sin tratamiento a los 24 meses de edad.

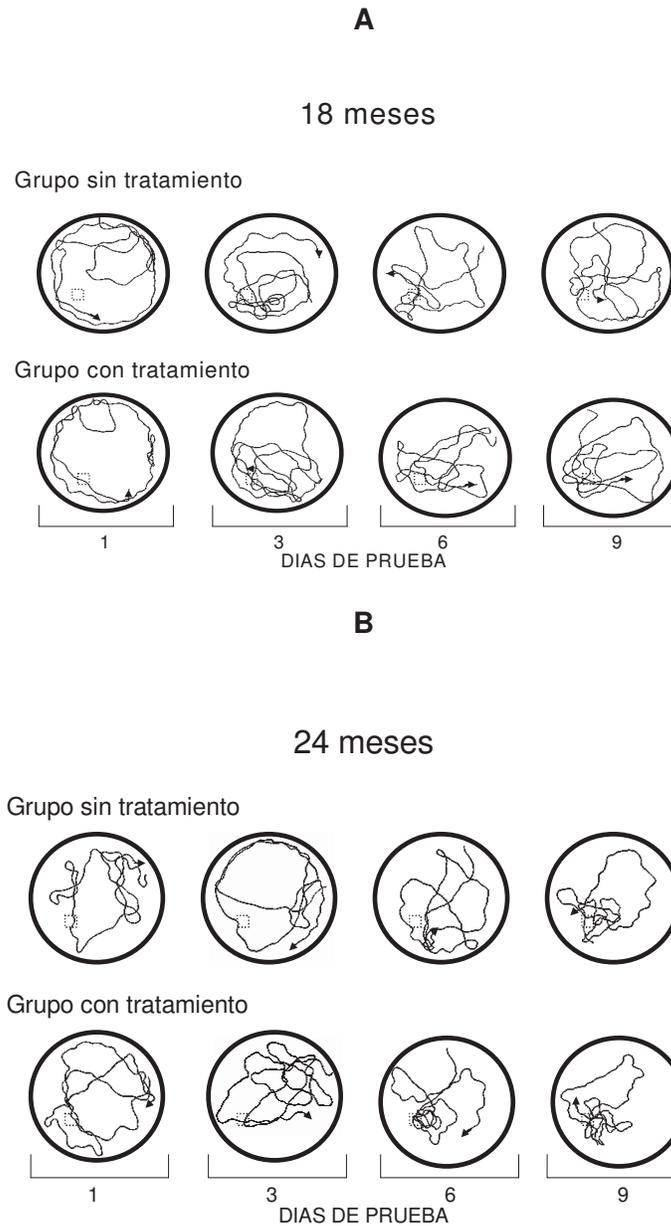


Figura 6 Ilustración de las trayectorias de un animal del grupo sin tratamiento y un animal del grupo con tratamiento en búsqueda de la plataforma durante las pruebas de transferencia a los 18 y a los 24 meses de edad. Puede observarse que la estrategia de búsqueda se concentra en el cuadrante donde debería estar colocada la plataforma a partir del 3 día de prueba en los animales de ambos grupos a los 18 meses de edad y en el grupo con tratamiento a los 24 meses. En tanto que la estrategia adecuada de búsqueda se establece hasta el 6 día en los animales sin tratamiento a los 24 meses de edad.

En lo que se refiere a los resultados de la prueba de transferencia efectuada a los 24 meses de edad puede observarse en la figura 5B y 6B que el retardo en alcanzar los criterios de aprendizaje en los animales del grupo sin tratamiento se relaciona con una inadecuada estrategia de búsqueda preferente de la plataforma en el sitio donde se encontraba ubicada originalmente. En cambio es evidente la búsqueda preferente de la plataforma en el cuadrante correcto desde el día 3 de prueba en los animales del grupo que recibió el tratamiento con melatonina.

Tabla 3. Valores ( media  $\pm$  EE) de la velocidad de nado (cm/seg) en los diferentes grupos y condiciones experimentales, durante la ejecución en el laberinto acuático de Morris.

DIAS DE PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9
18 meses (Sin tratamiento)	23.1 $\pm$ 0.63	29.7 $\pm$ 1.64	30.0 $\pm$ 2.51	27.3 $\pm$ 1.3	28.9 $\pm$ 2.01	25.5 $\pm$ 2.24	33.4 $\pm$ 5.59	29.7 $\pm$ 1.83	28.4 $\pm$ 1.21
18 meses (Con tratamiento)	24.3 $\pm$ 1.45	28.1 $\pm$ 2.35	27.6 $\pm$ 3.0	28.6 $\pm$ 1.57	27.6 $\pm$ 2.04	23.4 $\pm$ 1.88	27.9 $\pm$ 1.9	29.3 $\pm$ 4.12	29.6 $\pm$ 2.31
24 meses (Sin tratamiento)	28.0 $\pm$ 1.52	30.2 $\pm$ 5.62	29.2 $\pm$ 4.34	37.4 $\pm$ 4.91	30.8 $\pm$ 6.53	28.2 $\pm$ 2.85	31.9 $\pm$ 6.8	32.7 $\pm$ 7.4	31.1 $\pm$ 5.9
24 meses (Con tratamiento)	29.2 $\pm$ 6.04	35.6 $\pm$ 6.03	29.6 $\pm$ 7.3	29.0 $\pm$ 6.7	32.2 $\pm$ 5.17	34.3 $\pm$ 6.24	34.0 $\pm$ 6.7	30.1 $\pm$ 6.34	27.7 $\pm$ 6.72

En la tabla 3 se consignan los valores correspondientes a la velocidad de nado en los diferentes grupos y condiciones experimentales. Puede observarse que no hubo diferencias significativas en la velocidad de nado en los diferentes días de prueba a los 18 o a los 24 meses de edad, tanto bajo tratamiento con melatonina o bajo tratamiento con vehículo.

Los resultados de la evaluación de las capacidades cognoscitivas de los animales en el laberinto de Olton mediante el número de errores de referencia espacial cometidos en cada uno de los ensayos de cada una de las pruebas realizadas diariamente durante 9 días sucesivos se muestran en la Fig. 7A. Puede observarse que a los 18 meses de edad tanto los animales del grupo con y sin

tratamiento muestran una curva de aprendizaje semejante con números similares de errores en los ensayos correspondientes a los primeros días de prueba para disminuir progresivamente hasta alcanzar criterios de aprendizaje a partir del 5 día de prueba en que el número de errores se redujo hasta una mediana de 2 errores por prueba en ambos grupos, sin diferencias significativas. Sin embargo los resultados de la prueba efectuada el día 10 con un giro de 45 grados en la posición original del laberinto de Olton muestra nuevamente un número de errores similar al del primer día de prueba. La evaluación de la ejecución de la misma prueba de aprendizaje efectuada a los 24 meses de edad en el laberinto de Olton muestra los mismos fenómenos y valores semejantes tanto en los animales que fueron tratados con melatonina durante 6 meses como los que fueron tratados con vehículo; incluyendo el incremento el número de errores en el día 10 al girar 45 grados la posición original el laberinto de Olton (Fig. 7B).

En lo que se refiere a la memoria de trabajo, en el laberinto de ocho brazos de Olton, los resultados muestran un curso temporal semejante en los días de pruebas sucesivos con un máximo de errores de trabajo (6-7 errores) en el primer día de prueba hasta un mínimo de 2 errores por prueba al 4to día, sin diferencias significativas entre los grupos (Fig. 8-A). Sin embargo a los 24 meses, el grupo sin tratamiento muestra un número significativamente mayor de errores de trabajo los días de prueba 5,6,7 en comparación con el número de errores en los mismos días observado en el grupo tratado con melatonina durante 6 meses. El número de errores de trabajo no mostró diferencias significativas los primeros 4 y los últimos 3 días de prueba (Fig. 8-B).

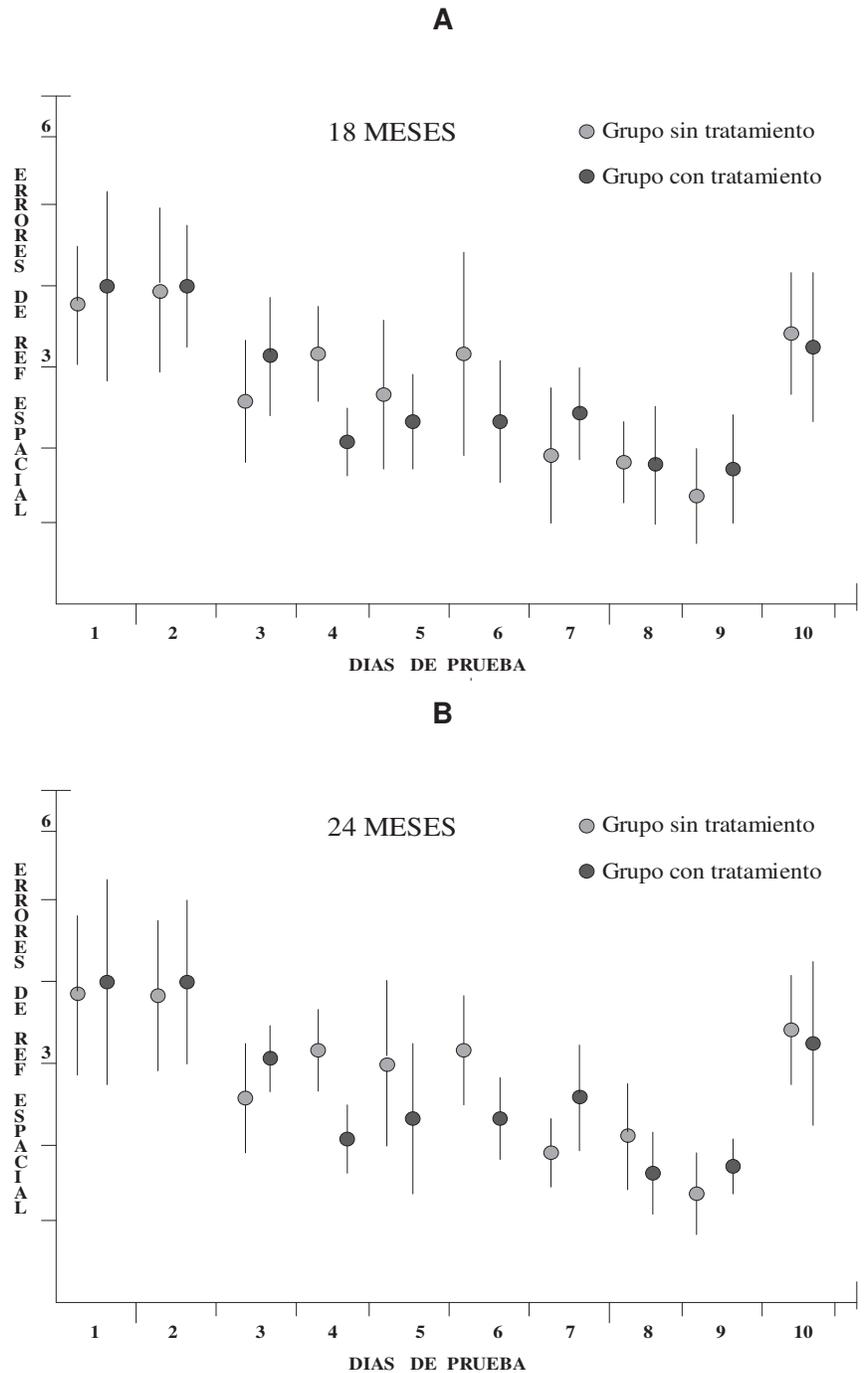


Fig.7 Ilustración del curso temporal del aprendizaje/ memoria de referencia espacial en el laberinto de Olton. Puede observarse que el número de errores de referencia espacial (mediana  $\pm$  EE) se reducen progresivamente en los días sucesivos de prueba sin diferencias significativas entre los grupos a los 18 y a los 24 meses de edad. Así mismo el incremento del número de errores de referencia espacial provocado por el giro de 45 grados del laberinto al día 10 de prueba.

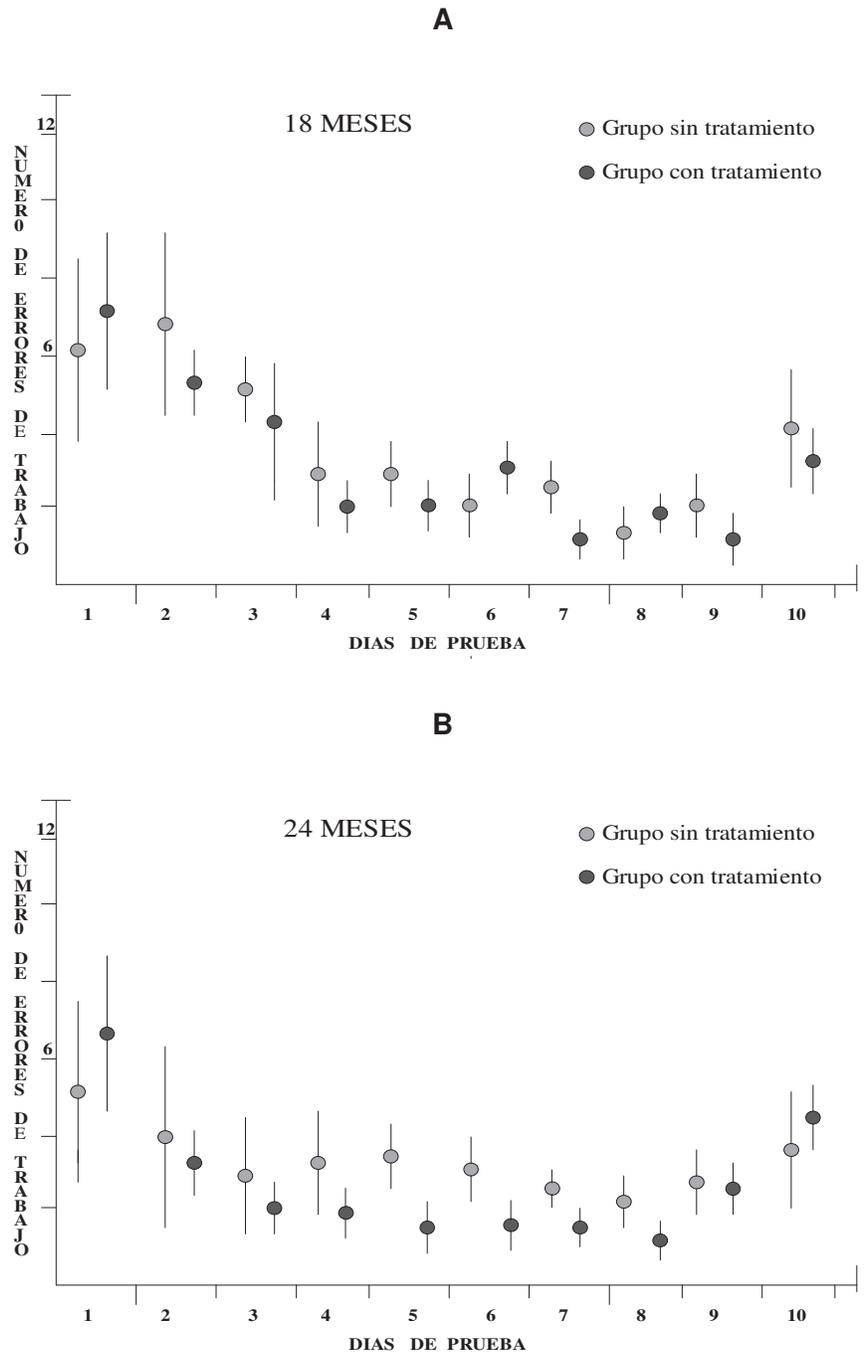


Fig.8 Ilustración del curso temporal del aprendizaje/memoria de trabajo espacial en el laberinto de Olton. Puede observarse que el número de errores de trabajo espacial (mediana  $\pm$  EE) se reducen progresivamente en los días sucesivos de prueba. Sin embargo, el número de errores del grupo sin tratamiento es significativamente mayor los días de prueba 5,6 y 7 en comparación con el grupo sin tratamiento.

## DISCUSION

En el presente estudio las características generales de los animales de experimentación incluidos en los grupos con tratamiento y sin tratamiento no mostraron diferencias en lo referente a la supresión de ciclos estrales ni en el estado hormonal asociados al proceso de envejecimiento, a juzgar por las características de los frotis vaginales. En este sentido, los resultados coinciden con lo que se ha reportado en la rata en las edades entre 18 y 24 meses (77-78).

En relación con las modificaciones del peso de los animales entre los 18 y 24 meses de edad, llaman la atención en los resultados del presente estudio la reducción de aproximadamente el 5% del peso corporal que tenía el grupo con tratamiento a los 18 meses, cuando el mismo grupo accedió a la edad de 24 meses, en contraste con el incremento de peso observado en el grupo sin tratamiento entre los 18 y 24 meses de edad. Este fenómeno de reducción del peso corporal como consecuencia del tratamiento con melatonina ha sido reportado por otros autores y ha sido atribuida a los efectos de la melatonina sobre los mecanismos celulares involucrados en la síntesis y secreción de la leptina, como parte de la regulación de la ingestión de alimentos (79). Con base en esta evidencia, la reducción del peso corporal en el grupo con tratamiento podría considerarse así mismo como evidencia del efecto sistémico de la melatonina.

Entre las modificaciones del funcionamiento cerebral que se han identificado en los seres humanos durante el proceso de envejecimiento destacan la disminución o la pérdida de ciertas capacidades cognitivas (3). Este fenómeno también ha sido observado en animales de experimentación (21,80-81); por ejemplo, en la rata la eficiencia de la ejecución en diversos paradigmas de memoria y

aprendizaje, se reduce a partir de los 18 meses de edad (24), manifestándose por la reducción de la capacidad máxima de aprendizaje y el incremento del tiempo de entrenamiento necesario para el aprendizaje. En este sentido los resultados del presente estudio muestran un retraso de tres o cuatro días para que los animales del grupo sin tratamiento a los 24 meses de edad alcancen la misma eficiencia de aprendizaje espacial y retención de la memoria espacial que habían mostrado a los 18 meses; sin embargo la eficiencia del grupo tratado con melatonina a los 24 meses de edad, en estas pruebas fue similar a la eficiencia mostrada a los 18 meses. Estos resultados sugieren que el tratamiento con melatonina previenen el deterioro de funciones cognitivas que cabría esperar con el transcurso del envejecimiento entre los 18 y los 24 meses de edad en la rata, posiblemente estableciendo una relación de oposición entre los mecanismos celulares de acción de este compuesto y los mecanismos celulares involucrados en el envejecimiento cerebral.

En el proceso de envejecimiento ocurren muchas modificaciones del funcionamiento mitocondrial que podrían dar lugar a diversos mecanismos conducentes al deterioro de la morfología y/o la función de las células nerviosas (82-84). Entre ellas destacan las modificaciones del balance oxidativo de la célula y el efecto acumulativo de la sobre producción de radicales libres capaces de afectar de diversas maneras la estructura y la función celular (7, 27, 82-84) Estos procesos celulares y sus consecuencias sobre la estructura y la función del cerebro pueden ser efectivamente contrarrestados por los compuestos que tienen acciones antioxidantes, como es el caso de la melatonina, a la que se le han descrito efectos neuroprotectores debidos a su efecto antioxidante, su eficacia

para preservar el funcionamiento mitocondrial normal e impedir de esta manera la activación de mecanismos pro-apoptóticos conducentes al daño neuronal (85-87). De hecho existen evidencias en la literatura acerca de los efectos anti-envejecimiento de la melatonina (88), atribuibles, además de la reducción de las alteraciones mitocondriales asociadas a la edad, a la reducción de fenómenos pro-inflamatorios, la reducción de la expresión de los genes “de envejecimiento”, asociados al envejecimiento (89-91).

Por otra parte, también se ha señalado que el ritmo circádico de la secreción de melatonina asociado fundamentalmente a los ciclos de luz y oscuridad tiene, en condiciones normales, en los animales jóvenes un efecto sincronizador de muchas funciones cuya integridad favorece el funcionamiento del sistema nervioso central (36). En este sentido se ha observado que el envejecimiento se asocia con modificaciones importantes en las características de la secreción circádica de la melatonina que pueden repercutir en la alteración de diversas funciones y que pueden ser corregidas con la sola restauración del ritmo circádico de melatonina inclusive mediante su administración exógena. (36, 92-93). En el presente estudio, cabe la posibilidad de que la administración diaria de melatonina, al inicio del periodo de oscuridad durante seis meses hubiera favorecido la conservación de un ritmo circádico de las concentraciones plasmáticas y tisulares de melatonina como las observadas en los animales jóvenes. Sin embargo al no tener evidencia directa, en el presente estudio, de las concentraciones plasmáticas y tisulares de este compuesto queda la duda acerca de la ocurrencia del fenómeno descrito.

En general se acepta que las diversas estructuras cerebrales tienen diferente vulnerabilidad ante las situaciones endógenas o exógenas que pudieran modificar

la integridad morfológica y funcional del sistema nervioso central, y se ha señalado al hipocampo, a la corteza cerebral y al cuerpo estriado como estructuras especialmente vulnerables. De hecho, se sabe que la memoria espacial depende de la integridad morfo-funcional del hipocampo y que sus alteraciones pueden ser atribuidas a cambios morfológicos y/o funcionales de esta estructura (71, 94-102). Por lo tanto los resultados del presente estudio, lo mismo que otros resultados reportados en la literatura (24) que muestran el retardo en la adquisición de la memoria espacial y la menor eficiencia en la retención de información espacial, podrían ser explicados con base en cambios en la integración de estos procesos de memoria en el hipocampo en los animales de experimentación a los 24 meses de edad. Así mismo, el efecto de la melatonina podría corresponder a la preservación de características funcionales óptimas del hipocampo en los animales del grupo con tratamiento, dado que se ha descartado la pérdida de neuronas como explicación de las alteraciones cerebrales del envejecimiento, en ausencia de patologías cerebrales asociadas (103).

La capacidad de los animales a los 18 y a los 24 meses de edad para “utilizar” el hipocampo en las funciones de referencia espacial (memoria de referencia y de trabajo espacial) es aparente en el presente estudio ya que la diferencia fundamental en la ejecución de estas pruebas en el laberinto de Morris por parte del grupo sin tratamiento, a los 18 y a los 24 meses de edad no fue un interferencia marcada con sus capacidades de aprendizaje espacial sino solamente un retardo en alcanzar los criterios de aprendizaje. En este sentido parecería que la participación del hipocampo en el aprendizaje espacial de los animales viejos fuera solo menos eficiente que en los animales al inicio del

proceso de envejecimiento. Los resultados de la ejecución de las pruebas en el laberinto de Olton están de acuerdo con la propuesta anterior, ante la deficiente ejecución de la prueba cuando se cambió la orientación de la posición original de los componentes del laberinto. Este dato ha sido comentado en la literatura como evidencia de estrategias de orientación espacial dependientes del hipocampo (69), que en el presente estudio parecerían ser utilizadas de la misma manera por los animales viejos sin tratamiento y por los animales viejos tratados con melatonina.

## CONCLUSIONES

- El proceso de envejecimiento cerebral que ocurre entre los 18 y 24 meses de edad en la rata da lugar a un retardo del aprendizaje y la memoria espacial.
- La administración diaria de melatonina durante seis meses previene la alteración de las funciones cognitivas de aprendizaje y memoria espacial asociadas al proceso de envejecimiento entre los 18 y 24 meses de edad en la rata.
- Los animales viejos continúan utilizando el hipocampo como parte fundamental de la integración del aprendizaje y la memoria espacial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. DUCKETT S. The normal aging human brain. En: S Duckett (Ed.) The Pathology of the Aging Human Nervous System. Lea & Febiger. Philadelphia 1991. pp 1-19.
2. TUIJAPURKAR S, LI N, BOE C. A universal pattern of mortality decline in the G/countries. Nature 2000; 405:789-792.
3. STERN PC, CARSTENSEN LL. Understanding the aging mind. En: PC Stern, LL Cartensen (Eds.) The Aging Mind. National Academy Press. Washington DC 2000. pp 7-53.
4. ESCOBAR IA. Envejecimiento cerebral normal Rev Mex Neuroci 2001; 2:197-202.
5. COTMAN CW. Homeostatic processes in brain aging: the role of apoptosis, inflammation and oxidative stress in regulating healthy neural circuitry in the aging brain. En: PC Stern, LL Cartensen (Eds.) The Aging Mind. National Academy Press. Washington DC 2000. pp 114-143.
6. KIRKWOOD TBL, AUSTAD SN. Why do we age? Nature 2000; 408:233-238.
7. HARMAN D. Aging: Overview. En: SC Park, ES Hwang, H-S Kim, W-Y Park (Eds.) Healthy Aging for Functional Longevity. Molecular & Cellular Interactions in Senescence. Ann NY Acad Sci Vol 928. The New York Academy of Sciences, NY 2001. pp 1-21.
8. DE GREY ADNJ, AMES BN, ANDERSEN JK, BARTKE A, CAMPISI J, HEWARD CB, McCARTER RJM, STOK G. Time to talk SENS: critiquing the inmutability of human aging. En: D Harman (Ed.) Increasing Healthy Life Span. Ann NY Acad Sci Vol 959. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 452-462.
9. GABRIEL ORTIZ G, VELAZQUEZ BRIZUELA IE, ROSALES CORRAL SA. Teorías que explican el envejecimiento. En: G Ortiz, ED Arias, IE Velásquez (Eds.) El Envejecimiento: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales. Cuellar Aguirre. México 2003. pp 33-52.

10. LAKATTA EG, LEVY D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation* 2003; 107:346-354.
11. VEIGH Mc, GARY E, BRATTELI CW, MORGAN DJ, ALINDER CHM, GLASSER SP, FINKELSTEIN SM, COHN JN. Age-related abnormalities in arterial compliance identified by pressure pulse contour analysis: aging and arterial compliance. *Am Heart Ass* 1999; 33:1392-1398.
12. VIGNOLA AM, SCICHILONE N, BOUSQUET J, BONSIGNORE G, BELLIA V. Aging and asthma: pathophysiological mechanisms. *Allergy* 2003; 58:165-175.
13. KURT BITZER QO. El envejecimiento desde un punto de vista inmune. En: G Ortiz, ED Arias, IE Velásquez (Eds.) *El Envejecimiento: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales*. Cuellar Aguirre. México 2003. pp 75-89.
14. WISE PM. Neuroendocrine correlates of aging. En: PM Conn, ME Freeman (Eds.) *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press. New Jersey Totowa 2000. pp 371-387.
15. URBANSKI HF. Influence of light and the pineal gland on biological rhythms. En: PM Conn, ME Freeman (Eds.) *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press. New Jersey Totowa 2000. pp 405 - 420.
16. MONTILLA P. Cambios del metabolismo energético en el adulto mayor. En: G Ortiz, ED Arias, IE Velásquez (Eds.) *El Envejecimiento: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales*. Cuellar Aguirre. México 2003. pp 91-105.
17. HAMERMAN D. Clinical implications of osteoarthritis and ageing. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:82-85.
18. BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F. El Citoesqueleto neuronal en el desarrollo del envejecimiento. En: G Ortiz, ED Arias, IE Velásquez (Eds.) *El Envejecimiento: Aspectos Básicos, Clínicos y Sociales*. Cuellar Aguirre. México 2003. pp 137-144.
19. KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type. En: ER Kandel, HJ Schwartz, MT Jesell

- (Eds.) Principles of Neural Science. Mc Graw-Hill Fourth Edition. New York 2000. pp 1149-1168.
20. WILLOTT JF. The storage of information: learning and memory. En: JF Willott (Ed.) Neurogerontology. Aging and the Nervous System. Springer Publishing Company. New York NY 1999. pp 173-202.
  21. HARVEY PD, MOHS RC. Memory changes with aging and dementia. En: PR Hoff, CV Mobs (Eds.) Functional Neurobiology of Aging. Academy Press. New York 2001. pp 58-63.
  22. FILLIT HM, BUTLER RN, O'CONNELL AW, ALBERT MS, BIRRIEN JE, COTMAN CW, GREENOUGH WT, GOLD PE, KRAMER AF, KULLER LH, PERLS TT, SAHAGAN BG, TULLY T. Achieving and maintaining cognitive vitality with aging. Mayo Clin Proc 2002; 77:681-696.
  23. GALLAGHER M, RAPP PR. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. Annu Rev Psychol 1997; 48:339-370.
  24. HOF PR, MORRISON JH. Hippocampal and neocortical involvement in normal brain aging and dementia: morphological and neurochemical profile of the vulnerable circuits. J Am Geriatr Soc 1996; 44:857-864.
  25. POU CET B. Spatial cognitive maps in animals: new hypothesis on the structure and neural mechanism. Psychol Rev 1993; 100:63-182.
  26. JARRAD EJ. On the role of hippocampus in learning and memory in the rat. Behav Neural Biol 1993; 60:9-26.
  27. MC DONALD RJ, WHITE NM. A triple dissociation of memory systems: hippocampus. Behav Neurosci 1993; 107:3-22.
  28. MC DONALD RJ, WHITE NM. Hippocampal and non hippocampal contributions to place learning in rats. Behav Neurosci 1995; 109:579-593.
  29. Mc CLELLAND JL, Mc NAUGHTON BL, O'RELLY RC. Why these are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex. Insights from successes and failures of connectionist models of learning and memory. Psychol Rev 1995; 102:419-432.
  30. POU CET B, BENHAMOU S. The neuropsychology of spatial cognition in the rat. Crit Rev Neurobiol 1997; 11:101-120.

31. JACKSON P, KESNER RP, AMANN K. Memory for duration: role of hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 70:328-348.
32. SILVA AJ, GIESE KP, FEDOROV NB, FRANKAND PW, KOGAN JH. Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 70:44-61.
33. SANTIN LJ, RUBIO S, BEGEGA A, MIRANDA R, ARIAS JL. Aprendizaje espacial e hipocampo. *Rev Neurol* 2000; 31:455-462.
34. OLTON DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology & behavior* 1987; 40:793-797.
35. HODGES H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cognitive Brain Res* 1996; 3:167-181.
36. STOELZEL CR, STAVNEZER AJ, DENENBERG VH, WARD M, MARKUS EJ. The effects of aging and dorsal hippocampal lesions: performance on spatial and non-spatial comparable versions of the water maze. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78:217-233.
37. RAPP PR, GALLAGHER M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:9926-9930.
38. COLOMBO PJ, GALLAGHER M. Individual differences in spatial memory and striatal ChAT activity among young and aged rats. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 70:314-327.
39. PULSINELLI WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. En: Kogure K, Hossman KA, Siesjö BK, Welsh FA (Eds.) *Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage. Progress in Brain Research. Vol 63.* New York, Elsevier; 1985. pp 39- 47.
40. HAYFLICK L. Origins of longevity. En: HR Warner, RN Butler, RL Sprot, EL Schneider (Eds.) *Modern Biological Theories of Aging.* Raven Press. New York 1987. pp 21-34.
41. PERLS T. Genetic and environmental influences on exceptional longevity and the AGE nomogram. En: D Harman (Ed.) *Increasing Healthy Life Span:*

- Conventional Measures and Slowing Innate Aging Process. *Ann NY Acad Sci Vol 959*. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 1-13.
42. FUKUI K, ONODERA K, SHINKAI T, SUZUKI S, URANO S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. En: SC Park, ES Hwang, H-S Kim, W-Y Park (Eds.) *Healthy Aging for Functional Longevity Molecular & Cellular Interactions in Senescence*. *Ann NY Acad Sci Vol 928*. The New York Academy of Sciences, NY 2001. pp 168-175.
43. RIVAS-ARANCIBIA S, COLIN-BARENQUE L, DORADO MARTINEZ C, FORTOUL T. Estrés oxidativo y neurodegeneración. En: JV Moctezuma (Ed.) *Temas Selectos de Neurociencias II*. UNAM-PUIS. México DF 2001. pp 351-374.
44. LIU J, ATAMNA H, KURATSUNE H, AMES BN. Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. En: D Harman (Ed.) *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process*. *Ann NY Acad Sci Vol 959*. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 133-166.
45. DREW B, LEEUWENBURGH C. Aging and the role of reactive nitrogen species. En: D Harman (Ed.) *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process*. *Ann NY Acad Sci Vol 959*. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 66-81.
46. McEWEN BS, ALVES SE, BULLOCH K, WEILAND N. Ovarian steroids and the brain: implications for cognition and aging. *Neurology* 1997; 48: 8S-15S.
47. REITER RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *BioEssays* 1992; 14: 169-175.
48. SAVASKAN E. Melatonin in aging and neurodegeneration. *Drug Dev Res* 2002; 56:482-490.
49. CLAUSTRAT B, BRUN J, CHAZOT G, The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* 2005; 9:11-24.

50. TURTURRO A, BLANK K, MURASKO D, HART R. Mechanisms of caloric restriction affecting aging and disease. En: W Pierpaoli, W Regelson, N Fabris (Eds.) The Aging Clock Third Stromboli Conference of Aging and Cancer. Ann NY Acad Sci Vol 719. The New York Academy of Sciences, NY 1994. pp 159-170.
51. FUKUI K, OMOI N, HAYASAKA T, SHINKAI T, SUZUKI S, ABE K, URANO S. Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. En: D Harman (Ed.) Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process. Ann NY Acad Sci Vol 959. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 275-284.
52. GALLI RL, SHUKITT-HALE B, YODanis KA, JOSEPH JA. Fruit polyphenolics and brain aging nutritional interventions targeting age-related neural and behavioral deficits. En: D Harman (Ed.) Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process. Ann NY Acad Sci Vol 959. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 128-132.
53. KAGAN VE, KISIN ER, KAWAI K, SERINKAN BF, OSIPOV A N, SERBINOVA EA, WOLINSKY I, SHVEDOVA AA. Toward mechanism-based antioxidant interventions lessons from natural antioxidants. En: D Harman (Ed.) Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process. Ann NY Acad Sci Vol 959. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 188-198.
54. BANDYOPDHYAY D, BISWAS K, BHATTACHARYYA M, REITER RJ, BANERJEE RK. Involvement of reactive oxygen species in gastric ulceration: protection by melatonin. Indian J Exp Biol 2002; 40:693-705.
55. CERA G, VAGHI M, ARDIZZOIA A, VILLA S, BUCOVEC R, MENGO S, GARDANI G, TANCINI G, LISSONI P. Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone melatonin in metastatic colorectal cancer patients

- progressing on 5-fluorouracil-containing combinations. *Anticancer Res* 2003; 23:1951-1954.
56. HUETHER G. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. En: W Pierpaoli , W Regelson, N Fabris (Eds.) *The Aging Clock Third Stromboli Conference of Aging and Cancer. Ann NY Acad Sci Vol 719. The New York Academy of Sciences, NY 1994. pp 146-158.*
57. VIJAYALAXMI MELTZ ML, THOMAS CRJ. REITER RJ, HERMAN TS. Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol* 2002; 20:2575-2601.
58. REITER RJ, TAN DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58:10-19.
59. WITT-ENDERBY PA, BENNETT J, JARZYNKA MJ, FIRESTINE S, MELAN MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72:2183-2198.
60. PIERPAOLI W. Neuroimmunomodulation of aging: A program in the pineal gland. En: SM Mc Cann, EM Stemberg, JM Lipton, GP Chrousos, PW Gold, CC Smith (Eds) *Neuroimmunomodulation: Molecular Aspects, Integrative Systems and Clinical Advances. Ann NY Acad Sci Vol 840. The New York Academy of Sciences, NY 1998. pp 491-497.*
61. RIEMANN D, KLEIN T, RODENBECK A, FEIGE B, HORNY A, HUMMEL R, WESKE G, AL.SHAJLAWI A, VODERHOLZER U. Nocturnal cortisol and melatonin secretion in primary insomnia. *Psychiatry Res* 2003; 113: 17-27.
62. VARMA A, KAUL RK, VARMA P, KALRA V, MALHOTRA V. The effect of antidepressants on serum melatonin levels in endogenous depression. *J Assoc Physicians India* 2002; 50:1262-1265.
63. GERDIN MJ, MSEEH F, DUBOCOVICH ML. Mutagenesis studies of the human MT2 melatonin receptor. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:315-320.
64. ALMEIDA MONTES LG, ONTIVEROS URIBE MP, CORTES SOTRES J, HEINZE MARTIN G. Treatment of primary insomnia with melatonin: a

- double-blind placebo-controlled, crossover study. *J Psychiatry Neurosci* 2003; 28:191-196.
65. LEPPAMAKI S, PARTONEN P, VAKKURI O, LONNQVIST J, PARTINEN M, LAUDON M. Effect of controlled-released melatonin on sleep quality, mood and quality of life in subjects with seasonal or weather-associated changes in mood and behavior. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13:137-145.
66. IVANENKO A, CRABTREE VM, TAUMAN R, GOZAL D. Melatonin in children and adolescents with insomnia: a retrospective study. *Clin Pediatr* 2003; 42:51-58.
67. BASKETT JJ, BROAD JB, WOOD PC, DUNCAN JR, PLEDGER MJ, ENGLISH J, ARENDT J. Does melatonin improve sleep in older people? A randomized crossover trial. *Age Ageing* 2003; 32:164-170.
68. CARRILLO-VICO A, GARCIA-MAURINO S, CALVO JR, GUERRERO JM. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. *Faseb J* 2003; 17:755-757.
69. SCHLBRITZ-LOUTSEVICH N, HELLNER N, MIDDENDORF R, MULLER D, OLCSE J. The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:908-913.
70. SERFATY M, KENNEL-WEBB S, WARNER J, BLIZARD R, RAVEN P. Double blind randomized placebo controlled trial of low dose melatonin for sleep disorders in dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 2002; 17:1120-1127.
71. REITER RJ, GUERRERO JM, ESCAMES G, PAPPOLLA MA, ACUÑA-CASTROVIEJO D. Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. En: W Sikker, B Trembly (Eds.) *Neuroprotective Agents Third International Conference. Ann NY Acad Sci Vol 825. The New York Academy of Sciences, NY 1997. pp 70-78.*
72. REITER RJ, TAN D-X, POEGGELER B, MENENDEZ-PELAEZ A, CHEN L, SAARELA S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. En: W Pierpaoli, W Regelson, N Fabris (Eds.)

- The Aging Clock Third Stromboli Conference of Aging and Cancer. Ann NY Acad Sci Vol 719. The New York Academy of Sciences, NY 1994. pp 1-12.
73. REITER RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Faseb J* 1995; 9:526-533.
74. GIUSTI P, LIPARTITI M, GUSELLA M, FLOREANI M, MANEV H. In vitro and in vivo protective effects of melatonin against glutamate oxidative stress and neurotoxicity. En: W Slikker, B Trembly (Eds.) *Neuroprotective Agents Third International Conference*. Ann NY Acad Sci Vol 825. The New York Academy of Sciences, NY 1997. pp 79-84.
75. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56:359-384.
76. SKAPER SD, FLOREANI M, CECCON M, FACCI L, GIUSTI P. Excitotoxicity, oxidative stress, and the neuroprotective potential of melatonin. En: B Trembly, W Slikker (Eds.) *Neuroprotective Agents Fourth International Conference*. Ann NY Acad Sci Vol 890. The New York Academy of Sciences, NY 1999. pp 107-118.
77. OXENKRUG G, REQUINTINA P, BACHURIN S. Antioxidant and antiaging activity of n- acetylserotonin and melatonin in the in vivo models. En: W Slikker, B Trembly (Eds.) *Neuroprotective Agents Fifth International Conference*. Ann NY Acad Sci Vol 939. The New York Academy of Science, NY 2001. pp 190-199.
78. REITER RJ, ACUÑA-CASTROVALLEJO D, TAN D-X, BURKHARDT S. Free radical-mediated molecular damage mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. En: W Slikker, B Trembly (Eds.) *Neuroprotective Agents Fifth International Conference*. Ann NY Acad Sci Vol 939. The New York Academy of Sciences, NY 2001. pp 200-215.
79. REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC, EL-SAWI MR. Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration implications for aging. En: D Harman (Ed.) *Increasing Healthy Life Span* . Ann NY Acad Sci Vol 959. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 238-250.

80. LETECHIPIA-VALLEJO G, GONZALEZ BURGOS I, CERVANTES M. Neuroprotective effects of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res* 2001; 32:186-192.
81. PEPPING J. Melatonin. *Am J Healthy Syst Pharm* 1999; 56:2520-2528.
82. SHERWIN BB. Mild cognitive impairment: potential pharmacological treatment options. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48:431-441.
83. BRUSCO LI, MARQUEZ M, CARDINALLI DP. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. *Neuroendocrinol Lett* 2000; 21:39-42.
84. MAURIZI CP. Alzheimer's disease: Roles for mitochondrial damage the hydroxyl radical and cerebrospinal fluid deficiency of melatonin. *Med Hypothesis* 2001; 57:156-160.
85. TANILA H, SHAPIRO M, GALLAGHER M, EICHENBAUM H. Brain aging: changes in the nature of information coding by the hippocampus. *J Neurosci* 1997; 17:5155-5166.
86. OHTA Y, KONGO M, SASAKI E, ISHIGURO I, HARADA N. Protective effects of melatonin against alpha-naphthylisothiocyanate induced liver injury in rats. *J Pineal Res* 2000; 29:15-23.
87. BURGOS FM, MARTINEZ FJ. *La rata del laboratorio manual*. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. México DF 1991.
88. SIEGEL S. *Non-parametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York: Mc Graw-Hill 1956.
89. DOWNIE MM, HEALTH RW. *Basic Statistical Methods*. New York: Harper & Row 1983.
90. LU R. Relation of neuroendocrine function to reproductive decline during aging in the female rat. *Neurobiol Aging* 1994; 15:541-544.
91. STACEY G, WARREN, JURASKA M. Sex differences and estropausal phase effects on water maze performance in aged rats. *Neurobiol Learn Mem* 2000; 74: 229-240.
92. WOLDEN-SANSON T, MITTON M, CANTS RL, YELLON SM, WILKINSON CW, MATSUMOTO AM, RASMUSSEN DD. Daily melatonin administration

- to middle-age male rats suppresses body weight, intra-abdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 2000; 141:487-497.
93. SASTRE J, BORRAS C, GARCIA-SALA D, LLORET A, PALLARDO FV, VIÑA J. Mitochondrial damage in aging and apoptosis. En: D Harman (Ed.) *Increasing Healthy Life Span: Conventional Measures and Slowing the Innate Aging Process*. Ann NY Acad Sci Vol 959. The New York Academy of Sciences, NY 2002. pp 448-451.
  94. SHIGENAGA MK, HAGEN TM, AMES BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:10771-10778.
  95. GENOVA ML, MERLO PM, BERNACCHIA A, BIANCHI C, BIONDI A, BOVINA C, FALASCA AI, FORMIGGINI G, PARENTI GC, LENZA G. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. En: Lee HK, Masashi SD, Wei YH (Eds.) *Mitochondrial Pathogenesis from Genes and Apoptosis to Aging and Disease*. Ann NY Acad Sci Vol 1011. The New York Academy of Sciences, NY 2004. pp 86-100.
  96. ACUÑA-CASTROVIEJO D, MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G, LEON J, KHALDY H, REITER RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 2001; 30:65-74.
  97. SLLEGRA M, REITER RJ, TAN D-X, GENTILE C, TESORIERE L, LIVREA MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; 34:1-10.
  98. LEON J, ACUÑA-CASTROVIEJO D, SAINZ RM, MAYO JC, TAN D-X, REITER RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004; 75:765-790.
  99. GRAD BR, ROZENCWAIG R. The role of melatonin and serotonin in aging: update. *Psychoneuroendocrinology* 1993; 18:283-295.
  100. FERNANDEZ C, DEBELJUK, DIAZ E, DIAZ B. Age differences in neurokinin A and substance P from the hypothalamus, pituitary, pineal

- gland, and striatum of the rat effect of exogenous melatonin. *Peptides* 2002; 23:941-945.
101. BONDY SC, LAHIRI DK, PERREAU VM, SHARMAN KZ, CAMPBELL A, ZHOU J, SHARMAN EH. Retardation of brain aging by chronic treatment with melatonin. En: DK Lahiri (Ed.) *Protective Strategies for Neurodegenerative Diseases*. Ann NY Acad Sci Vol 1035. The New York Academy of Sciences, NY 2004. pp 197-215.
  102. LAHIRI DK, CHEN D, LAHIRI P, ROGERS JT, GREIG NH, BONDY S. Melatonin, metals, and gene expression: implications in aging and neurodegenerative disorders. En: DK Lahiri (Ed.) *Protective Strategies for Neurodegenerative Diseases*. Ann NY Acad Sci. Vol 1035. The New York Academy of Sciences, NY 2004. pp 216-230.
  103. REITER RJ. Neuroendocrinology of melatonin. En: Andrew M, David RS, Philbrick CT (Eds.) *Melatonin: Clinical Perspectives*. University Press. Oxford 1988. pp 1-41.
  104. OLVERA-CORTES E, CERVANTES M, GONZALEZ BI, Place learning but not cue learning training modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull* 2002; 58:261-270.
  105. OLVERA-CORTES E, GUEVARA MA, GONZALEZ BI. Increase of hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather motor activity. *Brain Res Bull* 2004; 62:379-384.