

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS  
DE HIDALGO**



**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
"Dr. Ignacio Chávez"**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
Maestría en Ciencias de la Salud**

**"Identificación de marcadores de conectividad en el cuerno de Ammón del  
hipocampo luego de isquemia cerebral global aguda y tratamiento  
neuroprotector con melatonina, en ratas"**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

IBQ. Mercedes Espinosa Pardavé

**DIRECTOR DE TESIS**

Doctor en Ciencias José Miguel Cervantes Alfaro

**COMITÉ TUTORAL**

Doctora en Ciencias Bertha Fenton Navarro  
Doctora en Ciencias Graciela Letechipía Vallejo  
Doctora en Ciencias Gabriela Morali de la Brena

**MORELIA MICHOACAN, MEXICO, JULIO 2013**

*Dios nos envía a las personas que necesitamos conocer.*  
**Doménico Cieri Estrada**

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de esta tesis hubiera sido imposible sin la intervención de muchas personas de las que recibí su colaboración de diferentes maneras.

Agradezco a mi asesor el Dr. José Miguel Cervantes Alfaro por su indispensable aportación a mi formación académica y al desarrollo de la presente tesis. También a la Dra. Bertha Fenton Navarro, a la Dra. Graciela Letechipía Vallejo y a la Dra. Gabriela Morali de la Brena, por sus correcciones, sugerencias y sinceros comentarios durante las evaluaciones de los avances de tesis; las cuales fueron clave para el desarrollo y calidad de este trabajo.

Gran parte de la realización de este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán, bajo la asesoría de la Dra. Naima Lajúd Ávila, a quien le estoy profundamente agradecida por su gran disposición y ayuda, por compartir su experiencia y conocimiento, y por orientarme en múltiples aspectos relacionados con esta investigación.

Parte de la metodología experimental se desarrolló en el laboratorio de Histología perteneciente a la Unidad de Servicios de Apoyo al Diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, cuyas instalaciones y equipo nos fueron facilitados gracias al Mtro. Manuel López Rodríguez.

Especialmente quiero agradecer y dedicar este trabajo a mi familia, quienes me apoyaron de innumerables formas, día a día, desde antes del inicio de esta maestría hasta la fecha; y a mi esposo quien me acompaña con el término de este proceso y con quien inicio el proyecto más importante de mi vida.

*La verdad es semejante a Dios: no se revela inmediatamente, sino que debemos adivinarla a partir de sus manifestaciones.*  
**Johann Wolfgang Von Goethe**

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	3
Estrés oxidativo.....	5
Inflamación .....	5
Señalización intracelular.....	5
Alteraciones mitocondriales.....	6
Muerte neuronal (necrosis y apoptosis).....	6
Plasticidad neuronal y mecanismos celulares de reparación.....	7
Neuroprotección .....	10
ANTECEDENTES .....	10
Melatonina .....	10
Marcadores de conectividad.....	13
Sinaptofisina .....	13
PSD-95.....	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
JUSTIFICACION.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
Objetivos Específicos.....	20
MATERIAL Y METODOS.....	20
Animales y compuestos químicos.....	20
Modelo Experimental de Isquemia Global.....	21
Grupos y tratamiento .....	21
Marcaje de proteínas .....	22
Evaluación de la intensidad de la marca de sinaptofisina y PSD-95 mediante densidad óptica.....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	31
REFERENCIAS .....	38

## **INTRODUCCIÓN**

La generalización de hábitos alimenticios con altos contenidos en grasas saturadas y grasas trans, así como el incremento del consumo de sal, tabaco, alcohol, el predominio del sedentarismo y otros cambios relacionados con la urbanización e industrialización han generado un incremento en las enfermedades crónicas no transmisibles en la población adulta y actualmente no excluyen ni a los adolescentes ni a la población infantil. Hoy en día estas afectaciones aquejan a los mexicanos y han logrado una de sus más altas expresiones epidemiológicas y por ende algunas de sus complicaciones manifestadas como enfermedad isquémica del corazón y enfermedad cerebrovascular [1]. Se ha encontrado también que existen diferencias en la morbilidad y mortalidad por accidentes cerebrovasculares dependientes de las características socioeconómicas, la profesión, la educación y la raza [2], además de factores de riesgo tales como las características genéticas y la edad.

En México en el año 2008, la enfermedad cerebrovascular fue la tercera causa de mortalidad general (30, 212 defunciones), la cuarta causa de muerte en hombres (13,894 defunciones) y la tercera en mujeres (15,840 defunciones) [3]. Además es la primera causa de invalidez permanente y la segunda de demencia. Entre la población mexicana, la enfermedad cerebrovascular tiene un comportamiento un tanto distinto al resto del mundo, debido a la alta prevalencia de padecimientos como la hipertensión arterial y diabetes mellitus, lo cual la hace un importante problema de salud pública y para atacarlo es necesario modificar el estilo de vida que incluya una dieta balanceada y ejercicio para disminuir el riesgo de padecer ésta y muchas otras enfermedades que aquejan a los mexicanos [4].

Por otra parte, el cerebro humano constituye sólo el 2% del peso corporal total, recibe aproximadamente el 15% del gasto cardíaco y consume aproximadamente el 20% del oxígeno utilizado por todo el cuerpo [5]. Los altos requerimientos de energía comparados con las bajas reservas de energía hacen al cerebro particularmente vulnerable a condiciones hipóxicas [6].

El concepto de enfermedad cerebrovascular se refiere los trastornos que afectan de manera transitoria o permanente el flujo sanguíneo cerebral; tal es el caso de la

isquemia o la hemorragia, donde estarían involucrados uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por procesos patológicos. Según su naturaleza, la enfermedad cerebrovascular se puede presentar como isquemia o como hemorragia, con una proporción del orden de 85 y 15%, respectivamente. La isquemia se produce por la disminución del aporte sanguíneo cerebral de forma total (isquemia global) o parcial (isquemia focal). La hemorragia es la presencia de sangre consecutiva a la ruptura vascular, en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral), o en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea). Según su duración, un proceso isquémico focal puede presentarse como un evento isquémico transitorio o bien como un fenómeno permanente que da lugar a infarto cerebral, como una complicación de varios cuadros clínicos, el más frecuente la arteriosclerosis vascular cerebral. Las consecuencias de estos fenómenos dependen de que se restaure la circulación cerebral en las horas siguientes a la isquemia y de las regiones específicas del cerebro que hayan sido afectadas. Se utiliza el término de isquemia cerebral global cuando la disminución del flujo sanguíneo cerebral se produce en todo el encéfalo de manera simultánea debido a una hipotensión arterial marcada o a un paro cardíaco; afecta a los hemisferios cerebrales de forma difusa, asociada o no a una lesión del tronco del encéfalo y/o cerebelo. Sus causas más frecuentes son el paro cardíaco y la cirugía con circulación extracorpórea, pero cualquier cuadro de hipotensión severa prolongada, independientemente de su etiología, lo puede producir. Las consecuencias clínicas abarcan desde un déficit cognitivo leve (memoria, atención) hasta el estado vegetativo persistente por necrosis neocortical, e incluso, si la duración es muy grande, muerte cerebral por afectación troncoencefálica [7].

### **Isquemia cerebral global y vulnerabilidad selectiva**

El flujo sanguíneo cerebral global normal es de 58 ml por cada 100 g de tejido por minuto [8]. La isquemia cerebral global (ICG) es producida por la interrupción o disminución severa (a valores menores de 10 ml/100 g/min,) del flujo sanguíneo cerebral, de manera transitoria en todo el cerebro, esto da como resultado la

perturbación del funcionamiento cerebral como consecuencia de la alteración del metabolismo energético celular [9]. En estas condiciones se ha observado que la vulnerabilidad de las distintas estructuras cerebrales a la isquemia es heterogénea. Así las estructuras cerebrales que se han identificado con la mayor vulnerabilidad a la isquemia incluyen: las células piramidales del Cuerno de Ammón del hipocampo en particular las del segmento CA1; las células de Purkinje del cerebelo, las neuronas espinosas del cuerpo estriado y las neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la neocorteza [10]. Los modelos experimentales de isquemia cerebral global han permitido conocer algunas características neuronales que parecen promover la vulnerabilidad selectiva a la isquemia, incluyendo una alta densidad de las sinapsis glutamatérgicas excitadoras, bajas reservas de enzimas antioxidantes, alto contenido de metales de transición, el aumento de expresión de la proteína proapoptótica Bax y con ello, la susceptibilidad diferencial de algunos procesos celulares que quedan fuera del control fisiológico en la isquemia [11]. La lesión cerebral, después de la isquemia global y la reperfusión, es finalmente evidenciada con la muerte neuronal, que afecta a la población neuronal, con alteraciones de la conectividad de circuitos y del funcionamiento de las estructuras específicas del cerebro implicadas en la integración neural de las funciones cerebrales cognitivas y de comportamiento.

### **Fisiopatología de la isquemia cerebral**

La interrupción del flujo sanguíneo y por lo tanto, del suministro de glucosa y oxígeno al cerebro, dan como resultado la imposibilidad de síntesis de ATP en las células nerviosas que produce alteraciones de los gradientes iónicos transmembranales y un severo desajuste en la homeostasis celular. Varios mecanismos del daño neuronal son activados y desarrollados tanto de manera simultánea como de manera subsecuente. Una vez desencadenada la isquemia, cesan todas las reacciones y mecanismos dependientes de ATP, entre los que se encuentran bombas intercambiadoras de iones, la célula va perdiendo su capacidad de captar  $K^+$  y se produce su salida del interior de la célula al espacio intersticial y el consiguiente aumento citosólico anormal de  $Na^+$ ,  $Ca^{2++}$  y agua. Esto

amplía el desarrollo del edema intracelular y la imposibilidad para mantener el potencial de membrana, lo cual origina la despolarización de la célula y elimina la actividad eléctrica neuronal [11].

### **Excitotoxicidad**

A estos fenómenos de permeabilidad alterada de la membrana celular, le sigue la liberación masiva de neurotransmisores al espacio extracelular. El glutamato es el aminoácido excitatorio más abundante del cerebro y realiza una gran variedad de funciones (metabólicas, neurotróficas y neurotransmisoras) y está localizado en las sinapsis que establecen comunicaciones celulares entre las neuronas. El cerebro adulto tiene la habilidad de recaptar el glutamato extracelular que no se ha unido a alguno de sus receptores (AMPA, NMDA, kainato, metabotrópicos); sin embargo, bajo condiciones en que la energía se encuentra disminuida, como en la isquemia/hipoxia, a causa de la despolarización neuronal el glutamato es liberado al espacio extracelular sumándose al glutamato que no ha sido recaptado, lo que resulta en un incremento anormal del ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio intracelular. La lesión citotóxica se caracteriza por afectar principalmente a las dendritas neuronales y el soma, y en menor proporción a los axones, la glía y las células endodiales y endoteliales, debido posiblemente a diferencias en la densidad de los contactos sinápticos, la cantidad y la distribución de los receptores glutamatérgicos, así como de mecanismos celulares de defensa intrínsecos. Otro mecanismo que contribuye al incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es la acidosis inducida por la isquemia. Ante la imposibilidad de metabolizar la glucosa vía aeróbica normal, se activa su degradación por vía anaeróbica. Como resultado se genera ácido láctico que se acumula y hace bajar el pH hasta 6.5. Esta acidosis desplaza al  $\text{Ca}^{2+}$  de su unión a proteínas intracelulares y hace aumentar su concentración intracelular. El retículo endoplasmático también contribuye al aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . De esta forma, el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ocupa un lugar central en la fisiopatología de la isquemia debido a que da lugar a la activación de numerosas enzimas catabólicas

que contribuyen a la muerte celular, como las sintasas del óxido nítrico, fosfolipasas, proteasas y endonucleasas [12].

### **Estrés oxidativo**

La exposición de las células a concentraciones anormalmente elevadas de radicales libres y especies reactivas de oxígeno resulta nociva y estos se producen en grandes cantidades en la isquemia, sobre todo después de la reperfusión, la producción de radicales libres sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes endógenos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, vitamina E y C y glutatión) y se activan las rutas que conducen a la muerte celular.

El cerebro parece particularmente vulnerable al estrés oxidativo, debido por una parte a las elevadas concentraciones de hierro, con lo que se cataliza la generación de radicales libres. El cerebro es rico en ácidos grasos insaturados, los cuales constituyen dianas para la peroxidación lipídica [13].

### **Inflamación**

La reacción inflamatoria en la isquemia se manifiesta de manera más evidente después de la reperfusión y se caracteriza fundamentalmente por dos procesos: la infiltración de los leucocitos circulantes en la sangre hacia el tejido cerebral y la activación de la microglía. Tanto los leucocitos como la glía y células endoteliales producen citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, histamina, MIP-1, etc.) que contribuyen a la muerte neuronal [8].

### **Señalización intracelular**

A consecuencia del estrés oxidativo, determinadas vías de señalización intracelular se activan. En éstas intervienen diferentes mensajeros secundarios que se ocupan de transmitir las señales extracelulares al núcleo. Entre estos mensajeros se encuentran las cinasas de proteínas activadas por mitógenos, la cinasa de proteína A, la cinasa de proteína C y la cinasa de proteína B. A su vez, estas cinasas inducen la expresión de los denominados genes de expresión



inmediata y la subsiguiente formación de determinados factores de transcripción que regulan gran variedad de respuestas génicas y que son responsables bien de la degeneración, o bien de la supervivencia neuronal secundaria a la isquemia. Algunos genes de expresión inmediata, cuya expresión se ve incrementada durante la isquemia, son: c-fos, c-jun, jun-B y jun-D [8].

### **Alteraciones mitocondriales**

La inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial o su desacoplamiento significativo disminuye los niveles de ATP, incrementa la producción de radicales libres mitocondriales y elimina la capacidad amortiguadora de  $Ca^{2++}$ . Esto puede ocurrir como resultado de los efectos directos en las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, en el sistema de fosforilación oxidativa/transporte electrónico mitocondrial o en la composición lipídica de la membrana mitocondrial o como un resultado a largo plazo de la apertura transitoria del poro mitocondrial. Además, la apertura transitoria del poro mitocondrial produce efectos dañinos al liberar moléculas mitocondriales e iones [14]. Finalmente, la liberación del citocromo c y/o al menos la liberación de otra proteína del espacio intermembranal es reconocido como un paso crítico en la apoptosis. Dicha liberación puede ser propiciada por la apertura transitoria del poro mitocondrial, pero es muy frecuente debido a efectos más directos en la integridad de la membrana externa mitocondrial, probablemente mediado por algún miembro de la familia Bcl2/Bax, como la Bar. Por lo tanto, alteraciones en la mitocondria tienen un potencial enorme de daño celular [15, 16].

### **Muerte neuronal (necrosis y apoptosis)**

Existen dos mecanismos fundamentales de muerte celular tras la exposición a fenómenos nocivos: la necrosis y la apoptosis. En el caso de la isquemia cerebral, hay evidencia de que se desencadenan ambos procesos. Los dos tipos de muerte se distinguen por marcadores morfológicos y también bioquímicos puesto que los mecanismos que las producen son diferentes [17].

La muerte celular por necrosis es un fenómeno pasivo que depende de las alteraciones bioquímicas producidas por el déficit energético y por la activación de

enzimas líticas constitutivas que destruyen componentes celulares. Como consecuencia de la depleción de energía se produce el fracaso de la función de membrana con pérdida del gradiente iónico y paso de agua al interior del citoplasma y las organelas con el consiguiente edema celular. Finalmente tiene lugar la lisis de las membranas y la pérdida de la diferenciación de los compartimentos celulares. La lisis celular y la liberación del contenido citoplásmico ocasionan una respuesta inflamatoria con infiltración de leucocitos neutrófilos y macrófagos [18].

La muerte por apoptosis es un proceso activo que depende de la puesta en marcha de una cascada de eventos que se inician a merced a señales específicas y de la expresión selectiva de determinados genes. Para que los mecanismos responsables de la muerte por apoptosis tengan lugar es necesario que exista una cierta reserva energética de tal manera que sea posible la expresión génica y la síntesis de las proteínas implicadas. Se caracteriza por la preservación de las membranas y por la fragmentación y condensación periférica de la cromatina nuclear. Puesto que no se produce la lisis de membrana ni la liberación del contenido celular, no se produce reacción inflamatoria, pero sí la fagocitosis posterior de los cuerpos apoptóticos por macrófagos u otras células [17].

### **Plasticidad neuronal y mecanismos celulares de reparación**

La plasticidad cerebral se refiere a la capacidad adaptativa del sistema nervioso central para modificar su propia organización estructural y funcional en condiciones fisiológicas o como parte de los mecanismos de reorganización morfofuncional después del daño cerebral [19]. Esta capacidad plástica del cerebro puede tener mucha importancia en procesos fisiológicos tales como el aprendizaje y la memoria que en condiciones normales implican procesos plásticos que modifican la eficiencia de la comunicación celular sináptica a través de cambios en la estructura, distribución y número de sinapsis [20].

La isquemia cerebral global provoca la muerte de una proporción importante de células piramidales en el cuerno de Ammón del hipocampo especialmente en el segmento CA1, y eventualmente de las células piramidales de las capas 3 y 5 de

la corteza cerebral [21]. Además entre las diversas modificaciones de la citoarquitectura neuronal que ocurren después de la isquemia cerebral global, se han descrito degeneración axonal, reducción de la longitud y del número las arborizaciones dendríticas, así como de la densidad de espinas dendríticas, de las sinapsis y cambios en la forma de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza sensorimotora y del hipocampo. Estas alteraciones parecen estar influenciadas por la cantidad de conexiones neuronales remanentes, ya que tanto la reducción como el aumento de las conexiones aferentes pueden resultar en cambios en las arborizaciones dendríticas y en la densidad de las espinas. Se ha sugerido que después de la amplia reducción de la población de neuronas piramidales del cuerno de Ammón por la isquemia, ocurre una desaferentación permanente de las neuronas piramidales en la capa 5 de la corteza, lo que puede conducir a cambios en la actividad neuronal y a su vez, a una reducción del tamaño del soma neuronal [21-28].

Por el contrario, ajustes de la citoarquitectura como brotes axonales y dendríticos, aumento del número de espinas dendríticas y sinapsis, así como cambios en la proporción relativa de los tipos de espinas, han sido interpretados como respuestas compensatorias plásticas de las neuronas que sobreviven al episodio de isquemia. Se ha propuesto que estos cambios contribuyen a la remodelación de los circuitos neuronales, a la recuperación funcional y a la preservación de las funciones cognoscitivas después de la lesión isquémica, incluso en ausencia de procedimientos neuroprotectores [29-35]. Además, la neurogénesis y la integración de las neuronas recién diferenciadas, en los circuitos neuronales del cuerno de Ammón, puede contribuir a la recuperación de las funciones cognoscitivas dependientes del hipocampo [36, 37].

Esta reestructuración dendrítica [30, 33] y sinaptogénesis reactiva [29, 31, 38, 39] entre otros fenómenos como la activación de una variedad de procesos potenciales promotores de crecimiento [40, 41] que ocurren en las neuronas que sobreviven a la lesión isquémica en las estructuras cerebrales más vulnerables, parecen ser una parte de los mecanismos de cambios adaptativos que probablemente generen condiciones favorables para la plasticidad sináptica

neuronal y la recuperación funcional después de la isquemia. De hecho, a largo plazo se produce una reorganización plástica progresiva continua del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas, inicialmente alteradas por la isquemia cerebral global aguda en las neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza sensorimotora de la rata [22-24].

Por lo tanto, la conservación o la recuperación de las funciones dependientes del hipocampo y de la corteza prefrontal después de la isquemia cerebral global pueden implicar modificaciones a largo plazo de la citoarquitectura del segmento CA1 del hipocampo y del resto de las neuronas piramidales prefrontocorticales (capas 3 y 5), ya que su organización morfológica y funcional es fundamental para el aprendizaje normal y la memoria [42-46], en vista del papel relevante que tienen los circuitos neuronales del segmento CA1 para la proyección de señales nerviosas hacia la corteza cerebral una vez que la información ha sido procesada en el circuito trisináptico del hipocampo [47]. Es bien sabido que la corteza prefrontal está implicada directamente en la organización de la secuencia de acciones motoras durante la ejecución de la memoria de trabajo [48, 49] y que las proyecciones del hipocampo suministran la información espacial a la corteza prefrontal permitiendo la adecuación de las respuestas motoras en el contexto espacial [50]. Estos fenómenos pueden ser alterados por lesiones de la corteza prefrontal o alteraciones de sus circuitos neuronales que dan lugar al deterioro del aprendizaje y la memoria de trabajo espacial [49, 51-54].

Los datos experimentales han mostrado que las variaciones en la eficiencia de los individuos en tareas cognitivo-conductuales están relacionadas con cambios plásticos en las espinas dendríticas [55]. Además, la información excitatoria fluye principalmente a través de las espinas dendríticas mediada por contactos sinápticos que son muy sensibles a la estimulación eléctrica, y también a la actividad mnemónica relacionada con los fenómenos eléctricos [34, 56, 57].

Debido a la preservación a largo plazo del sustrato neuronal en las estructuras cerebrales vulnerables subyacentes a la recuperación funcional después de la isquemia cerebral ha sido considerada como un punto final importante de las estrategias neuroprotectoras [58]. Se puede esperar que los diseños

experimentales para los estudios de neuroprotección puede conducir interpretaciones confiables de la eficiencia de los agentes neuroprotectores, en vista de la probada capacidad de los mecanismos cerebrales intrínsecos a promover, por sí mismos, la reparación neuronal y la plasticidad después de la isquemia.

Algunas proteínas neuronales que están involucradas en los aspectos estructurales y funcionales de la conectividad sináptica y la remodelación de los circuitos neuronales, han sido evaluadas como los parámetros de la lesión isquémica y de la neuroprotección.

### **Neuroprotección**

Un neuroprotector es generalmente definido como un agente que previene o reduce la muerte neuronal inducida por diferentes procesos fisiopatológicos capaces de provocar de manera inmediata daño cerebral con lesiones neurológicas permanentes de naturaleza y magnitud diversas [59, 60].

La neuroprotección incluye la aplicación de procedimientos farmacológicos o no farmacológicos capaces de contrarrestar uno o varios de los mecanismos fisiopatológicos que pueden dar lugar al daño cerebral. La melatonina ha sido considerada, entre otros muchos compuestos endógenos, como un agente neuroprotector.

## **ANTECEDENTES**

### **Melatonina**

La melatonina (N-acetil-5 metoxitriptamina) es una molécula generada endógenamente cuyo nivel en sangre normalmente exhibe un ritmo circadiano debido a su exclusiva producción nocturna en la glándula pineal y liberada a través de ésta. Su acción como antioxidante es particularmente importante en la preservación de la integridad intracelular del citoesqueleto que fácilmente atraviesa la barrera hematoencefálica a través de la cual protege a la neurona y a la glía de la lesión oxidativa y de la muerte neuronal [61].

Datos experimentales de numerosos estudios muestran que la melatonina es un agente efectivo en la reducción de la pérdida neuronal y deficiencias neurofisiológicas asociadas con la isquemia-reperfusión cerebral en modelos animales [62].

Diversos estudios en modelos de animales de experimentación, han mostrado el efecto neuroprotector de la melatonina en contra del daño cerebral provocado por la isquemia global [21, 27, 63, 64].

En estudios previos, se ha mostrado que la isquemia cerebral global en gatos provoca una pérdida severa de neuronas piramidales del hipocampo en las diferentes segmentos del cuerno de Ammón del hipocampo, con un escaso porcentaje de neuronas remanentes (CA1, 9%; CA2, 13%; CA3, 30%; CA4, 28%) en comparación con la población neuronal de los gatos sometidos a maniobras “sham”, tomada como 100%. Por el contrario, en los gatos isquémicos tratados con melatonina se encontró entre 81% y 100% de preservación neuronal, valores que no fueron significativamente diferentes en comparación con los valores de los gatos del grupo “sham” [63]. Los valores de deficiencia neurológica, en la escala de Todd [65] en los gatos isquémicos tratados con vehículo (42-47 al día 1; 6-39 al día 7) fueron muy altos y en cambio, los de los gatos isquémicos tratados con melatonina fueron significativamente menores (16-18 al día 1, 0-6 al día 7) en los días posteriores al episodio isquémico [63].

En un estudio posterior realizado en ratas, se observó que la isquemia provocó una reducción significativa de la población de neuronas piramidales de las áreas del cuerno de Ammón del hipocampo en comparación con los grupos intactos y “sham”. Esta pérdida de neuronas piramidales fue observada principalmente en las áreas CA1 y CA2 (23.4% y 52.1% de neuronas remanentes en relación con el grupo intacto, respectivamente). El tratamiento con melatonina previno la pérdida de la mayoría de las neuronas piramidales en las áreas CA1 y CA2 del cuerno de Ammón (78.2% y 88.1% de neuronas remanentes, respectivamente), no se encontraron diferencias significativas entre los grupos intactos, “sham” e isquemia-melatonina [21].

Los resultados de la evaluación de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 de ratas isquémicas tratadas con melatonina muestran ajustes que incluyen cambios en la forma y arborizaciones dendríticas, así como una reducción en la densidad de las espinas dendríticas y un cambio en la proporción de las espinas dendríticas delgadas y tipo hongo. Estos cambios han sido interpretados como fenómenos compensatorios del mecanismo de plasticidad de las neuronas remanentes a largo plazo en el segmento CA1 del hipocampo de las ratas isquémicas tratadas con melatonina ya que estas tienen la misma eficiencia en la ejecución de tareas de aprendizaje y memoria espacial, dependientes del funcionamiento del hipocampo, que los animales intactos [64].

En las ratas sometidas a isquemia cerebral global, las neuronas piramidales de la corteza prefrontal presentan alteraciones citoarquitectónicas [27] posiblemente como resultado de la falta de aferencias por la pérdida de neuronas del hipocampo, lo que afecta su conectividad al ser parte de los circuitos neuronales hacia la corteza prefrontal. Esto posiblemente fue la causa de las deficiencias en la memoria de trabajo espacial observadas después de la isquemia cerebral global, aún en ausencia de una pérdida significativa de neuronas piramidales de la corteza [21]. La efectividad de la melatonina para contrarrestar los procesos fisiopatológicos inducidos por la isquemia, se puso de manifiesto al preservar la mayoría de las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, concordando con un mejor desempeño en la memoria de trabajo [27].

En otros estudios se mostró que la melatonina restaura las deficiencias de la memoria inducidas por la escopolamina así como las alteraciones de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales en el segmento CA1 del hipocampo. Estos efectos de la escopolamina parecen estar relacionados con alteraciones en la expresión de las proteínas sinaptofisina y PSD-95 que están formando parte de estructuras pre- y post-sinápticas respectivamente y están involucradas en el funcionamiento de la comunicación celular sináptica normal en los circuitos hipocámpales. En estas condiciones la melatonina revierte dichas alteraciones

sinápticas provocadas por la escopolamina lo cual se ha considerado como un mecanismo neuroprotector de la melatonina [66].

## **Marcadores de conectividad**

### **Sinaptofisina**

Es la mayor proteína integral de membrana de pequeñas vesículas sinápticas y constituye el 7% del total de las proteínas vesiculares. Se encuentra localizada en el cerebro y en células endócrinas [67]. También se le considera como un posible componente del poro de fusión. Su función es aún desconocida pero su abundante presencia y especificidad de vesículas sinápticas en neuronas sugiere un papel en la ruta de las vesículas sinápticas en las terminales nerviosas [68]. Su estructura consta de 4 dominios transmembranales y sus terminales carboxilo y amino se encuentran en el citoplasma. Una de sus características más prominentes es que su C-terminal citoplasmática consiste en repeticiones de pentapéptidos iniciados por un residuo de tirosina [69]. Se ha mostrado que sinaptofisina se asocia en homopolímeros de 3 a 6 subunidades [70] para unirse a  $Ca^{2+}$  durante su transferencia y para formar canales de  $Ca^{2+}$  después de la reconstitución dentro de la membrana lipídica [71]. La transfección de genes de sinaptofisina en fibroblastos en estudios realizados sugieren dos hipótesis respecto a su función: 1) puede tener un rol en la formación y reciclaje de vesículas sinápticas y 2) puede estar involucrada en la exocitosis de las vesículas sinápticas  $Ca^{2+}$  dependientes [70]. En estudios realizados sobre la transmisión sináptica en ratones con deficiencias en sinaptofisina, indicaron que la ausencia de esta proteína no tiene un mayor efecto en la liberación de neurotransmisores dependiente o independiente de  $Ca^{2+}$  [72]. Esto se le atribuye a que la sinaptofisina tiene una función redundante con otra proteína de membrana vesicular (sinaptoporina, una isoforma de la sinaptofisina) y que sustituye la función de sinaptofisina.

La exocitosis de las vesículas sinápticas es mediada por un conjunto conservado de proteínas membranales que son comúnmente referidas como SNAREs (receptores SNAP). Estas proteínas incluyen: sinaptobrevina/VAMP (miembro de las vesículas sinápticas), sintaxina 1 (miembro de membrana sináptica plasmática)



y SNAP 25 (miembro de membrana sináptica plasmática); este complejo puede ser desensamblado por proteínas  $\alpha$ -SNAP y la ATPasa NSF. El ensamble y desensamble cíclico es uno de los pasos cruciales en la fusión de la membrana exocitótica, y debido a que el ensamble ocurre espontáneamente es irreversible en ausencia de NSF y  $\alpha$ -SNAP, por lo tanto un estricto control de este ensamble puede ser decisivo para la dinámica de neurotransmisores y la comunicación celular sináptica y es por esto que se le ha dado especial atención a proteínas que se unen selectivamente a una de las SNAREs previniendo en esta forma su interacción con los demás elementos SNARE. Para la sinaptobrevina sólo un grupo de proteínas de unión no-SNARE es conocido con ese rol: la proteína membranal de vesículas sinaptofisina o su isoforma relacionada sinaptoporina [73]. Este hallazgo sugiere que sinaptofisina sirve como una proteína de control que regula la disponibilidad de sinaptobrevina para su acoplamiento con los demás elementos SNARE antes de la fusión. Es decir, el objetivo principal de la formación del complejo sinaptofisina-sinaptobrevina es la de proveer un almacén de sinaptobrevina fácilmente disponible para la fusión de la membrana exocitótica. Esto evita que la sinaptobrevina se una a sus complementos SNARE, lo cual puede representar exigencias de ATP para su desensamble. De hecho, la inestabilidad del complejo sinaptofisina-sinaptobrevina puede asegurar que su formación es fácilmente reversible cuando sinaptobrevina sea requerida para formar el complejo SNARE para la exocitosis.

Adicionalmente la captura de sinaptobrevina por parte de la sinaptofisina evita la entrada de esta al compleja SNARE y favorece el proceso de endocitosis como parte del reciclaje de vesículas sinápticas, lo cual sustenta la observación de que la sobreexpresión de la sinaptofisina mejora la liberación de neurotransmisores, a partir de su control y regulación de la disponibilidad de sinaptobrevina [74].

Otra proteína de membrana sináptica vesicular es la sinaptogirina, que junto con la sinaptofisina constituyen el 10% del total de las proteínas de membrana vesicular [67]; ambas proteínas están compuestas de cuatro regiones transmembranales y una cola terminal citoplasmática tirosina-fosforilada [73]. La sinaptogirina al igual que la sinaptoporina tienen una función redundante de la

sinaptofisina; aunque la sinaptoporina es una proteína no tirosina-fosforilada. En ratones doble knockout carentes de sinaptofisina y sinaptogirina, se mostró que estas proteínas tienen funciones esenciales y redundantes para la plasticidad sináptica y de menor importancia para la transmisión sináptica. La plasticidad sináptica a corto plazo está afectada en ratones sin sinaptogirina y sinaptofisina, como se deduce de la alteración de la potenciación de larga duración en las células piramidales del Cuerno de Ammón, que se considera como un indicador de plasticidad. Se ha sugerido que la potenciación de larga duración tiene un componente presináptico y el flujo de neurotransmisor excitatorio a través de la membrana sináptica forma parte de un mecanismo regulador de la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en el que la fosforilación de estas proteínas por c-fyn tirosinquinasa y ha sido implicada como un fenómeno esencial para la potenciación a largo plazo [75, 76].

En este sentido, se ha observado en cultivo de neuronas hipocampales de ratones mutantes carentes de sinaptofisina que la densidad sináptica es menor que en los ratones sin mutación, por lo que se ha involucrado a la sinaptofisina en la regulación de la sinaptogénesis y se ha señalado que este fenómeno es mediado por la fosforilación de sinaptofisina por cinasas Tyr y Ser/Thr dependientes de Ca-calmodulina, lo cual hace a la sinaptofisina una de las proteínas tironofosforiladas más abundantes en las terminales nerviosas maduras. [77]. Dada su ubicación y su participación en los procesos de comunicación y plasticidad sináptica, los cambios de la sinaptofisina y su curso temporal, a partir de un episodio de isquemia cerebral global, se han asociado a las alteraciones estructurales de los circuitos estructurales del hipocampo [78].

La asociación estructural y funcional de las vesículas sinápticas con las zonas activas de las sinapsis puede dar mayor relevancia a la evaluación de sinaptofisina como indicador de fenómenos de plasticidad sináptica. Se sabe que las vesículas sinápticas se agrupan y quedan ancladas en las zonas activas presinápticas, donde tiene lugar la liberación del neurotransmisor, frente a las estructuras postsinápticas especializadas complementarias; formando un sustrato que favorece la mayor eficacia del proceso de comunicación celular sináptica [79-82].

Las características de las zonas activas tienen mucha importancia para el procesamiento de información de los circuitos neuronales, así como en los procesos de plasticidad sináptica del sistema nervioso central en general y del hipocampo en particular [83-85]. En esta estructura la plasticidad sináptica se asocia con un incremento de la densidad de las zonas activas [86].

### **PSD-95**

La PSD-95 es una proteína que forma parte de la superfamilia guanilato cinasa asociadas a membrana (MAGUK), las cuales se caracterizan por tener tres dominios PDZ, un dominio SRC homólogo (SH3) y un dominio guanilato cinasa (GK). Esta proteína interactúa con una gran variedad de moléculas de señalización transduccional citoplasmática y receptores de superficie. Es una molécula multifuncional que interactúa con reguladores del citoesqueleto a través su N-terminal del dominio PDZ y de su C-terminal de su dominio GK y SH3 [87]. Su sobreexpresión incrementa el número de espinas dendríticas en neuronas hipocámpales, promoviendo la maduración de sinapsis excitatorias, lo cual puede estar relacionado con el reclutamiento de proteínas transmembranales y también con proteínas de señalización intracelular [88]. La PSD-95 interviene en la morfogénesis de las espinas dendríticas a través de su enlace con los filamentos de actina mediado por la debrina [89].

Se ha mostrado que la PSD-95 actúa de manera conjunta con la CaMKII en múltiples procesos involucrados tanto en la activación como en la terminación de la translocación de moléculas y complejos proteínicos involucrados en el crecimiento de las espinas dendríticas durante los fenómenos plásticos. Así, la estimulación eléctrica capaz de generar potenciación a largo plazo y apertura de los NMDAR estimula la formación de complejos promotores del crecimiento, los cuales promueven la reorganización de la actina en las espinas dendríticas. La acción del complejo promotor de crecimiento requiere de la participación de la PSD-95 ya que su ausencia o mutación impide el crecimiento de la espina. La sobreexpresión de la PSD-95 no sólo se afecta la morfología de la espina, sino también se induce a la formación de espinas con múltiples contactos sinápticos,

aparentemente mediante la interacción del dominio PSZ<sub>2</sub> de la PSD-95 con el óxido nítrico y la sintasa del óxido nítrico [90].

En cambio, si la PSD-95 es fosforilada en su dominio serina 73 por la CaMKII, la proteína es traslocada fuera de la espina dendrítica y en estas condiciones se termina el crecimiento de la misma [91].

Se ha sugerido que en las sinapsis maduras la PSD-95 y su interacción con moléculas asociadas puede formar parte de los procesos de localización de la PSD-95 y de moléculas de adhesión hacia los sitios de interacción sináptica, donde la PSD-95 promueve su estabilización, su participación en el anclaje entre estructuras pre y postsinápticas (neuroligina 1, y  $\beta$  neurexina) e impide su difusión lateral o su internalización [92].

En las espinas dendríticas la mayor proteína de anclaje de la densidad postsináptica (PSD) es la PSD-95 la cual es necesaria para estabilizar las espinas y las sinapsis excitatorias [93-95].

La PSD está compuesta de filamentos (actina, espectrina cerebral o fodrina que es una proteína que se une a la actina y a calmodulina, junto con tubulina) y partículas que se extienden desde la membrana hacia el interior de la célula y contribuyen a la ubicación de proteínas membranales, receptores de neurotransmisores y canales iónicos [96-99].

La mayoría de las sinapsis excitatorias están localizadas en las espinas dendríticas, formadas de pequeñas protrusiones de membrana presentes en las dendritas neuronales [100] y son consideradas como la base morfológica de la plasticidad sináptica asociadas a la formación de la memoria y el aprendizaje [101]. Se ha sugerido que los cambios en la estructura de la PSD son los responsables de los cambios en la forma de la espina y de la eficacia sináptica determinada por la potenciación a largo plazo [102][103, 104]. En este sentido, los cambios de las dimensiones de la PSD como resultado de un cambio en el diámetro del eje dendrítico o de la espina, así como la alteración de la arquitectura molecular de la PSD modificaría la operatividad de los canales iónicos de la membrana postsináptica y la eficiencia sináptica.

Así mismo, se ha mostrado una relación directa entre el número de receptores AMPA y NMDA con el área de la PSD, el volumen de la espina, el número de vesículas ancladas en la parte presináptica y la cantidad de neurotransmisor liberado por los potenciales de acción [84, 105-108].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen evidencias sobre la capacidad de la melatonina para contrarrestar los mecanismos fisiopatológicos causados por la isquemia cerebral/reperfusión que sustentan la eficacia de la melatonina como un fármaco neuroprotector contra la lesión cerebral causada por la isquemia/reperfusión. Algunos estudios han mostrado que las acciones neuroprotectoras de la melatonina no sólo se deben a su acción antioxidante, sino también a la mejora del funcionamiento mitocondrial, interferencia con la señalización proapoptótica y la síntesis de citocinas inflamatorias, así como la preservación de la organización del neurocitoesqueleto [62].

La reparación neuronal y la reorganización de circuitos neuronales posiblemente llevan a la recuperación funcional después de la isquemia/reperfusión la cual puede ocurrir aún en ausencia de un tratamiento neuroprotector. Estos procesos reparativos involucran mecanismos neuronales en las estructuras expuestas y susceptibles de ser dañadas por los procesos fisiopatológicos desencadenados por la isquemia.

La evaluación de la cantidad de ciertas proteínas que forman parte de la estructura sináptica se ha utilizado para la identificación de cambios en la conectividad entre las neuronas que forman parte de los circuitos neuronales en estructuras cerebrales específicas. En el caso de la sinaptofisina, esta proteína ubicada en la estructura presináptica que participa en los procesos de exocitosis de neurotransmisores, formación de sinapsis, estimulación de los brotes axonales, remodelación y reciclaje de vesículas [77, 109, 110]. En el caso de la PSD-95, esta proteína esta ubicada en las estructuras postsinápticas, es necesaria para la estabilización y morfogénesis de las espinas dendríticas y de las sinapsis [94, 95, 111].

En base a ésta información, ¿Cuál es la magnitud de estos marcadores de conectividad en las zonas de contactos sinápticos de las neuronas piramidales del segmento CA1 en el cuerno de Ammón del hipocampo, en animales sometidos a isquemia cerebral global aguda (ICGA) y tratamiento neuroprotector con melatonina, en comparación con animales intactos y con animales sometidos a ICGA sin tratamiento neuroprotector?

### **JUSTIFICACION**

Se ha documentado que el tratamiento con melatonina conduce a una conservación a largo plazo de los sustratos neurales que participan en la integración del aprendizaje y de la memoria espacial dependientes del funcionamiento normal del hipocampo [21]. Resulta de interés evaluar los efectos del tratamiento neuroprotector con melatonina en relación a la plasticidad de las estructuras nerviosas remanentes en el hipocampo luego de isquemia cerebral global aguda, identificando y cuantificando moléculas que sirvan como marcadores de conectividad, como es el caso de la sinaptofisina y la PSD-95, en el cuerno de Ammón del hipocampo, que podría sustentar la presencia de cambios plásticos en función de la preservación o de la recuperación morfo-funcional de esta estructura luego de isquemia cerebral global aguda.

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar y evaluar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, las presencia y magnitud de las proteínas Sinaptofisina y PSD-95 en los estratos *oriens*, radiado y lacunoso molecular del segmento CA1 en el cuerno de Ammón del hipocampo a largo plazo, luego de isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.

## **Objetivos Específicos**

Evaluar y comparar la magnitud de los marcadores inmunohistoquímicos de sinaptofisina y PSD-95 en las zonas de contactos sinápticos, en los estratos *oriens*, radiado y lacunoso molecular, de las N. piramidales del segmento CA1 en el cuerno de Ammón del hipocampo:

1. En animales intactos.
2. En animales isquémicos tratados con melatonina.
3. En animales isquémicos sin tratamiento con melatonina.

## **HIPOTESIS**

La magnitud de los marcadores inmunohistoquímicos de las proteínas: Sinaptofisina y PSD-95, en los estratos *oriens*, radiado y lacunoso molecular del segmento CA1 en el cuerno de Ammón del hipocampo en los animales isquémicos tratados con melatonina será similar a la de los animales intactos y mayor que la de los animales isquémicos sin tratamiento neuroprotector.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **Animales y compuestos químicos**

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Ciencias Médica y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Los procedimientos experimentales se realizarán de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se tomarán las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

El estudio se realizó en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

La melatonina (Sigma, St Louis. MO, USA) se preparó para su administración mediante disolución en etanol absoluto y dilución con solución de NaCl al 0.9%,

hasta una concentración final de 3.3 mg/ml, en una solución al 10% de etanol en solución salina. Se empleó acepromacina como preanestésico, ketamina y xilacina como anestésicos; estos fueron obtenidos de preparaciones comerciales de uso veterinario, así como éter etílico.

### **Modelo Experimental de Isquemia Global**

Se utilizó el modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos (4VO). Bajo anestesia con clorhidrato de xilacina (10 mg/kg, i.p.), ketamina (90 mg/kg, i.p.) y acepromacina (5 mg/kg, i.p.), las arterias vertebrales se ocluyeron permanentemente mediante electrocauterización a través del foramen alar de la primera vértebra cervical. Las arterias carótidas comunes se aislaron y se dejaron referidas con hilo quirúrgico de seda de calibre tres ceros (000).

Inmediatamente después de la cirugía, a cada rata se le suministró solución salina fisiológica (2ml/100g de peso corporal, s.c.) para producir hidratación postquirúrgica y se colocaron en jaulas individuales para su recuperación. Cuarenta y ocho horas después, bajo anestesia con éter etílico, se expusieron ambas arterias carótidas. Se interrumpió la anestesia y las arterias carótidas comunes se ocluyeron por un periodo de 15 minutos mediante clips quirúrgicos microvasculares. La interrupción del flujo sanguíneo de las arterias carótidas se verificó bajo un microscopio de cirugía. La temperatura corporal se registró y mantuvo a  $37 \pm 0.5$  °C por medio de un cojín eléctrico. El estado de conciencia de las ratas se evaluó mediante la presencia del reflejo de enderezamiento. Solo aquellas ratas que se mantuvieron inconscientes durante la oclusión de las carótidas y por lo menos 20 minutos después posteriores a la remoción de los clips quirúrgicos microvasculares de las carótidas se incluyeron en el estudio.

### **Grupos y tratamiento**

Las ratas se asignaron al azar en diferentes grupos. Grupo 1(n=5): Intacto, Grupo 2 (n=5): Isquemia + vehículo, animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 minutos mediante 4-VO y administración del vehículo de melatonina (solución 10% de etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo



de 6 h, a partir de los 30 min luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas; Grupo 3 (n=5): Isquemia + Melatonina, animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 minutos mediante 4-VO y administración de melatonina 10 mg/kg/h en etanol al 10% en NaCl 0.9% i.v., por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min luego de perfusión.

Una vez recuperadas las ratas, 90 días después de la isquemia se llevó a cabo la extracción del cerebro para su posterior procesamiento con técnicas inmunohistoquímicas y se realizó la evaluación mediante densidad óptica de los marcadores de conectividad sinaptofisina y PSD-95.

### **Marcaje de proteínas**

Para la determinación de sinaptofisina y PSD-95 por medio de inmunohistoquímica, los animales se anestesiaron con éter etílico anhidro y fueron perfundidos por vía intracardiaca para lo cual se hizo pasar 200ml de solución lavadora de NaCl al 0.9%. Posteriormente se hizo pasar 200mL de solución fijadora de paraformaldehído 4%. Inmediatamente después se realizó la craneotomía para la obtención del encéfalo, el cual fue postfijado en una solución proporcional de paraformaldehído al 4% durante 24h. Pasado este tiempo se colocaron en sacarosa al 30% hasta su decantación; éste último procedimiento se realizó dos veces más con cada cerebro. Posteriormente se realizó la disección del hipocampo. El cerebro fue sumergido en metilbutano durante máximo 3 minutos, previamente enfriado a -80°C. Inmediatamente fue colocado en el criostato y se dejó atemperar durante los siguientes 45min. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron cortes coronales de 40µm de espesor los cuales fueron recolectados en tubos eppendorf de 1.5ml con solución crioprotectora (etilenglicol, glicerol y PB) para su conservación hasta el momento de ser procesados para la técnica inmunohistoquímica.

El primer paso para titular inmunotinciones fue lavar los cortes en PB 0.1M durante 5min para eliminar la solución crioprotectora. Seguido a esto se incubaron por 30min en PBT y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% con la finalidad de bloquear endoperoxidasas. Luego se llevó a cabo 3 lavados de 10min cada uno en PB 0.1M. Pasado este

procedimiento, se incubó el tejido durante 30min en una solución de suero de caballo al 5% en PBT (solución bloqueo) con el objetivo de bloquear sitios inespecíficos. Una vez realizado lo anterior, el tejido se incubó con el anticuerpo primario específico para cada proteína a determinar (diferentes diluciones del anticuerpo primario en solución bloqueo, para escoger la dilución más apropiada) por un tiempo de 24 horas a una temperatura de 4°C. Todos los pasos se realizaron en agitación constante. Para sinaptofisina se utilizó el anticuerpo Anti-Sinaptofisina monoclonal de ratón (SY38) de Abcam; y se eligió la dilución 1:100. Para PSD-95 se utilizó el anticuerpo Anti-PSD-95 – Marcador Sináptico policlonal de conejo de Abcam y se eligió la dilución 1:1000.

Posteriormente se lavó 3 veces por 10 min cada tejido en PB 0.1M y se incubó durante 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente a la especie en el que se levantó el primario. Para sinaptofisina se utilizó el Anticuerpo secundario biotinilado policlonal de cabra para ratón IgG y para PSD-95 se utilizó el Anticuerpo secundario biotinilado conjugado de cabra para conejo IgG. A continuación se realizaron otros 3 lavados en PB 0.1M durante 10min cada uno, después se incubó el tejido en una solución de PBT con el complejo avidina-biotina durante 90min a temperatura ambiente, con el propósito de amplificar la señal del anticuerpo. La solución PBT con avidina-biotina fue preparada 30min previo a su uso para la formación del complejo. Seguido a esto último, se lavaron nuevamente 3 veces en PB 0.1M, durante 10min cada vez. Para el revelado se utilizó una solución con diaminobenzidina (DAB) que es metabolizado por el complejo peroxidasa-avidina a un producto insoluble, provocando un cambio de color que permite la localización tisular y celular del antígeno, durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se lavó 2 veces en PB 0.1M durante 5min cada vez, para detener la reacción de revelado y montar los tejidos en portaobjetos gelatinizados donde se dejaron secar durante las siguientes 24h y posteriormente fueron cubiertos con cytoseal y colocado el cubreobjetos.

## **Evaluación de la intensidad de la marca de sinaptofisina y PSD-95 mediante densidad óptica**

Para la evaluación de la densidad óptica de sinaptofisina o PSD-95 se utilizaron 10 cortes histológicos por cada animal de cada grupo (50 cortes histológicos por grupo). La densidad óptica fue evaluada mediante el programa "Image J" a partir de fotografías en escala de grises de los cortes histológicos obtenidas mediante microscopio y analizador de imágenes Leica DM 1000. La densidad óptica se midió en segmentos de los cortes histológicos correspondientes a cada uno de los estratos del cuerno de Ammón del hipocampo utilizando una amplificación de 40x. La operación de este programa permite restar a cada uno de los valores de densidad óptica de los cortes obtenidos en las distintas condiciones experimentales, el valor de densidad óptica correspondiente a la comisura anterior del cuerpo calloso, donde no existen estructuras sinápticas que pudieran contener sinaptofisina o PSD-95.

Los valores de densidad óptica resultantes de la aplicación del programa de análisis "Image J" representan la intensidad del color gris, a partir de una escala de calibración propia del programa, de tal manera que los valores más bajos corresponderían a intensidades de gris cercanas al color blanco y los valores más altos a intensidades de color gris cercanas al color negro.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los valores obtenidos por densitometría del marcaje de sinaptofisina o PSD-95 en los diferentes grupos experimentales fueron analizados comparativamente mediante ANOVA y prueba de Tuckey *post hoc*.

## **RESULTADOS**

En el presente estudio se utilizó el marcaje con anticuerpos de Sinaptofisina y PSD-95 y su cuantificación mediante densidad óptica como indicadores de cambios en la conectividad sináptica del cuerno de Ammón del hipocampo tres

meses después de isquemia cerebral aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.

La Figura 1 ilustra los cambios de intensidad del color, atribuibles a la marca de Sinaptofisina en cortes histológicos representativos del grupo intacto (A), isquémico tratado con vehículo (B) e isquémico tratado con melatonina (C); puede observarse que la marca de sinaptofisina se incrementó en los cortes histológicos representativos del grupo isquémico tratado con vehículo y del grupo isquémico tratado con melatonina en comparación con el corte histológico representativo del grupo intacto. La evaluación de la densidad óptica en esas estructuras mostró un incremento de sus valores promedio en los estratos oriens, radiado y lacunoso molecular, en los grupos isquémico tratado con vehículo e isquémico tratado con melatonina, que solo alcanzó diferencia significativa en el estrato radiado del grupo isquémico tratado con melatonina en comparación con los valores promedio del grupo intacto (Fig. 2: A, B, C, respectivamente).

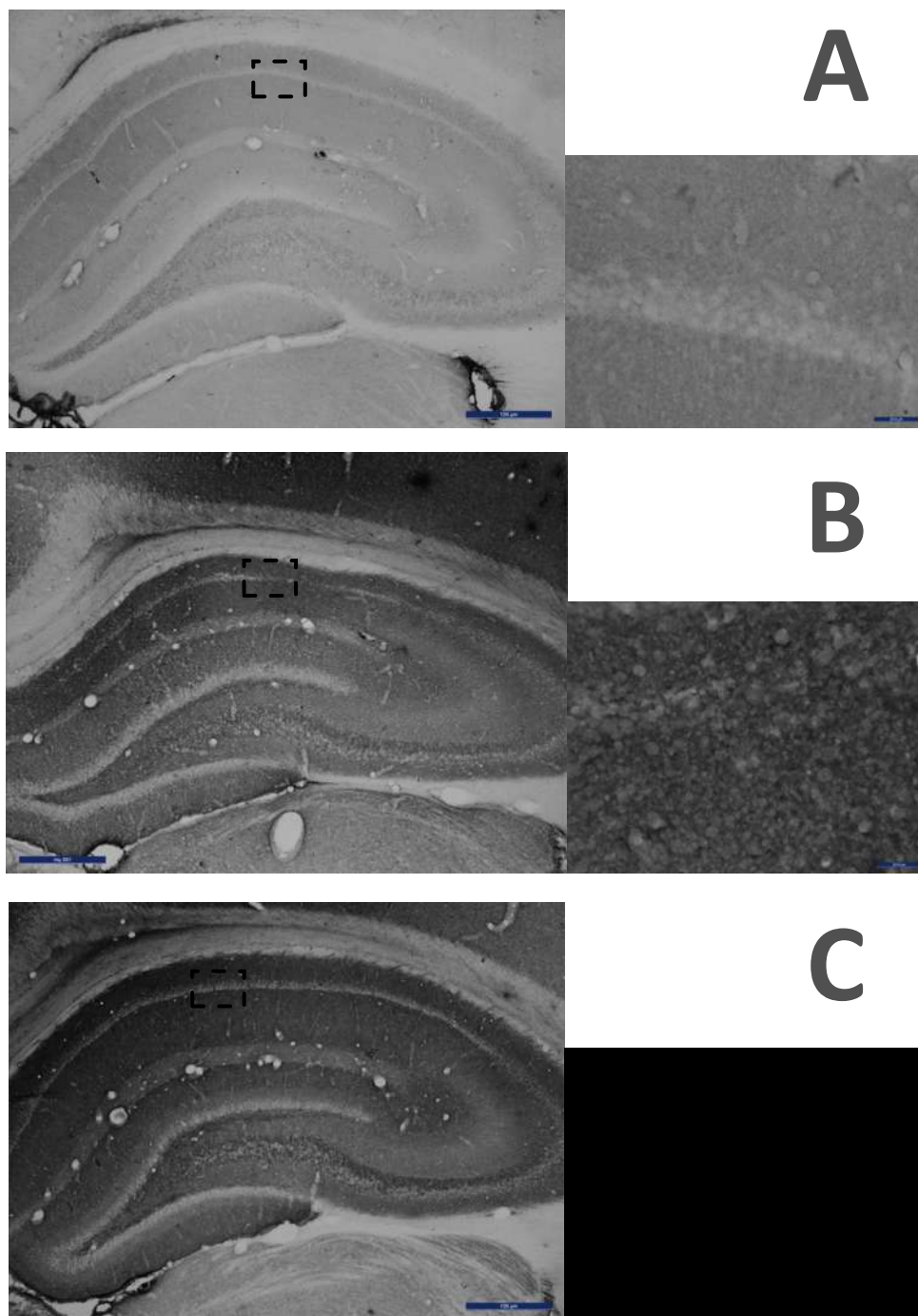


Figura 1. Fotomicrografías representativas que muestran la intensidad del marcaje de Sinaptofisina en los diferentes segmentos del cuerno de Ammón del hipocampo, en imagen panorámica (4x, calibración 100 $\mu$ m) y de una parte del segmento CA1 (área delimitada por el cuadro) a mayor amplificación (40x, calibración 20 $\mu$ m), que incluyen los estratos *oriens*, piramidal y radiado de animales de los grupos: intacto (A), isquémico tratado con vehículo (B) e isquémico tratado con melatonina (C). Puede observarse la mayor intensidad de la marca de Sinaptofisina en los cortes histológicos correspondientes a los animales del grupo isquémico tratado con vehículo y del grupo isquémico tratado con melatonina, en comparación con el corte histológico correspondiente al animal del grupo intacto. Así mismo, es aparente la reducción de la población neuronal del estrato piramidal en el segmento CA1 del cuerno de Ammón en las fotomicrografías correspondientes al animal isquémico tratado con vehículo.

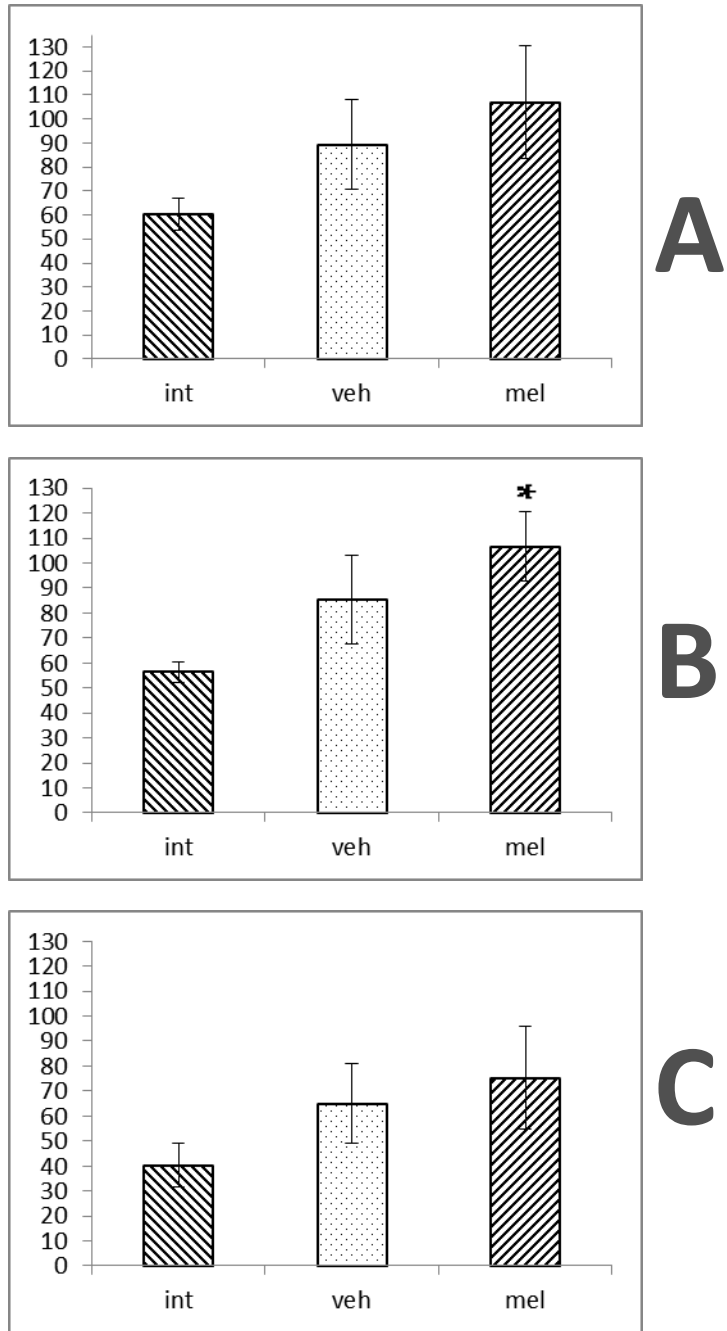


Figura 2. Valores de la densidad óptica (Media  $\pm$  EE) de la marca de Sinaptofisina en los estratos oriens (A), radiado (B) y lacunoso molecular (C) del cuerno de Ammón del hipocampo en los grupos intacto, isquémico tratado con vehículo e isquémico tratado con melatonina. Puede observarse el incremento significativo del valor de densidad óptica del grupo isquémico tratado con melatonina en comparación con el grupo control (\*  $p < 0.05$ ). Ordenadas: unidades de densidad óptica; Abcisas: grupos experimentales.

La Figura 3 ilustra los cambios de intensidad del color, atribuibles a la marca de PSD-95 en cortes histológicos representativos del grupo intacto (A), isquémico tratado con vehículo (B) e isquémico tratado con melatonina (C); puede observarse que la marca de PD-95 se redujo en el corte histológico representativo del grupo isquémico tratado con vehículo, en comparación con el corte histológico representativo del grupo intacto, y con corte representativo del grupo isquémico tratado con melatonina cuya marca de PSD-95 muestra una intensidad similar con el grupo intacto. En efecto, la evaluación de dicha densidad óptica en los estratos oriens, radiado y lacunoso molecular (Fig. 4: A, B, C, respectivamente) mostró una reducción significativa de su valores promedio en el grupo isquémico tratado con vehículo en comparación con los valores promedio del grupo intacto y del grupo isquémico tratado con melatonina, sin diferencias significativas entre el los grupos intacto e isquémico tratado con melatonina.

En las figuras 1 y 3 puede observarse la pérdida neuronal en el estrato piramidal del segmento CA1 del hipocampo en los cortes correspondientes a los animales isquémicos tratados con vehículo; así como un número importante de neuronas remanentes en la misma región hipocampal en los cortes histológicos correspondientes a los animales isquémicos tratados con melatonina.

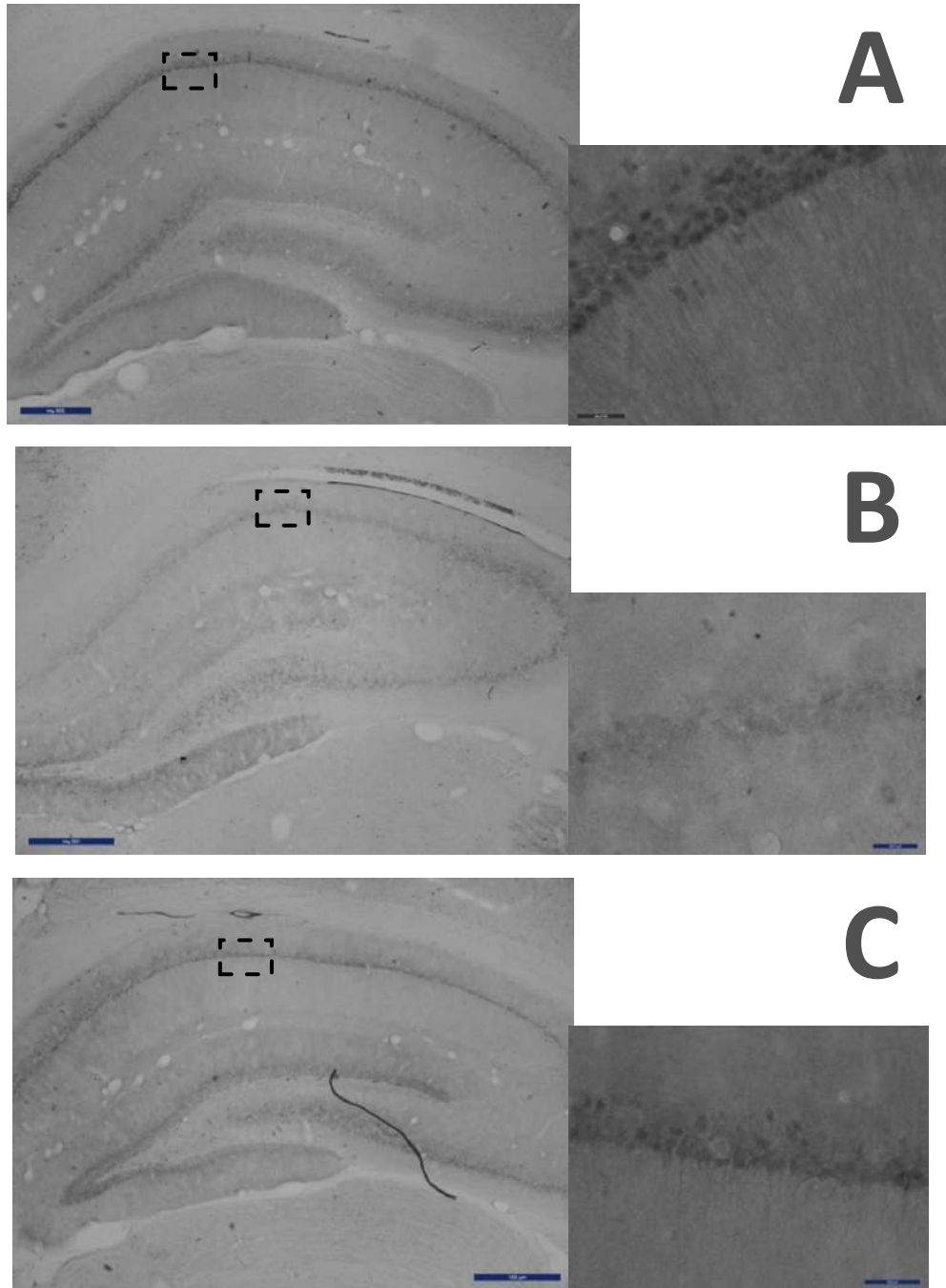


Figura 3. Fotomicrografías representativas que muestran la intensidad del marcaje de PSD-95 en los diferentes segmentos del cuerno de Ammón del hipocampo, en imagen panorámica (4x, calibración 100  $\mu\text{m}$ ) y de una parte del segmento CA1 (área delimitada por el cuadro) a mayor ampliación (40x, calibración 20 $\mu\text{m}$ ), que incluyen los estratos *oriens*, piramidal y radiado de animales de los grupos: intacto (A), isquémico tratado con vehículo (B) e isquémico tratado con melatonina (C). Puede observarse una reducción de la intensidad de la marca de PSD-95 en el corte histológico correspondientes al animal del grupo isquémico tratado con vehículo en comparación con los cortes histológicos correspondientes a los animales de los grupos intacto e isquémico tratado con melatonina. Así mismo, es aparente la reducción de la población neuronal del estrato piramidal en el segmento CA1 del cuerno de Ammón en las fotomicrografías correspondientes al animal isquémico tratado con vehículo.



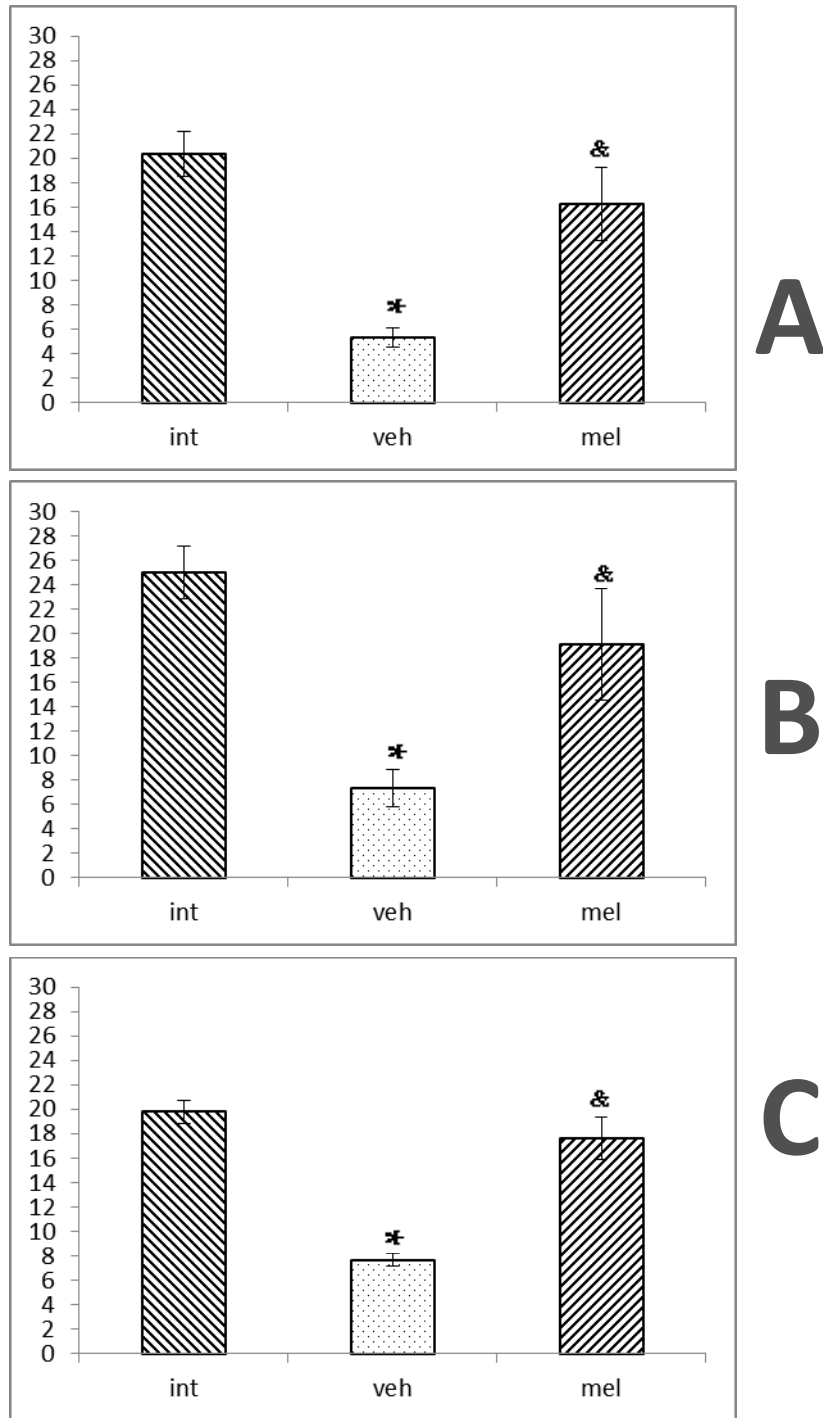


Figura 4. Valores de la densidad óptica (Media  $\pm$  EE) de la marca de PSD-95 en los estratos *oriens* (A), radiado (B) y lacunoso molecular (C) del cuerno de Ammón del hipocampo en los grupos intacto, isquémico tratado con vehículo e isquémico tratado con melatonina. Puede observarse la reducción significativa del valor de la densidad óptica del grupo isquémico tratado con vehículo, en comparación con el valor de la densidad óptica de los grupos intacto (\*) e isquémico tratado con melatonina (&), los cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos. \*, &  $p < 0.05$ . Ordenadas: unidades de densidad óptica; Abscisas: grupos experimentales.

## DISCUSIÓN

En diversos estudios se ha mostrado que la isquemia cerebral global y la subsecuente reperfusión inducen una secuencia de mecanismos fisiopatológicos que dan lugar al daño y a la muerte neuronal que, sin embargo, pueden a su vez promover mecanismos celulares de reparación y plasticidad neuronal en estructuras cerebrales vulnerables a la isquemia. Por ello se han investigado, en estas condiciones, las características estructurales y funcionales de los componentes de los circuitos neuronales del hipocampo y la corteza prefrontal, así como su correlación con la integración de funciones cerebrales específicas, principalmente las funciones cognoscitivas. Así, se han mostrado diversas alteraciones estructurales que ocurren en las neuronas piramidales remanentes del hipocampo luego de isquemia; entre estas se incluyen: degeneración axonal, reducción del número y extensión de las arborizaciones dendríticas, del número y configuración de las espinas dendríticas y del número de sinapsis, cuya presencia y magnitud se han relacionado con deficiencias de las funciones cognoscitivas [34, 64, 112]. De forma semejante, la reducción de la longitud y del número de arborizaciones dendríticas, así como de la densidad de espinas, entre otros fenómenos, han sido descritos como parte de los cambios de la citoarquitectura en las neuronas piramidales de la corteza sensitivo-motora, luego de isquemia cerebral global [27].

Por el contrario, diversos cambios de la citoarquitectura neuronal, tales como el incremento de ramificaciones axonales o dendríticas, de las espinas dendríticas y de las sinapsis; así como cambios en las proporciones relativas de los diversos tipos de espinas dendríticas han sido interpretados como fenómenos compensatorios y respuestas plásticas que tienen lugar en las neuronas que sobreviven luego de un episodio de isquemia. Estos fenómenos pueden contribuir a la remodelación de los circuitos neuronales y se han relacionado con la preservación de las funciones cognoscitivas luego del episodio de isquemia, aun en ausencia de procedimientos neuroprotectores [24, 29-35, 113] Asimismo, la

neurogénesis y la integración de las neuronas recién diferenciadas a los circuitos neuronales del cuerno de Ammón puede contribuir a la recuperación de las funciones cognoscitivas que dependen del funcionamiento del hipocampo [36, 37]. La re-estructuración de las dendritas [30, 33] y la sinaptogénesis reactiva [29, 31, 38, 39] entre otros fenómenos potenciales promotores de procesos de crecimiento neuronal [40, 41, 114], que ocurren en las neuronas que sobreviven a un episodio de isquemia cerebral global en las estructuras cerebrales vulnerables, parecen ser parte de los mecanismos de cambios adaptativos que probablemente contribuyen para dar lugar a condiciones neuronales que favorecen la plasticidad sináptica y la recuperación funcional. De hecho, se ha mostrado que en las células piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza sensitivo-motora de la rata ocurre una reorganización continua, a largo plazo del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas, alteradas inicialmente por la isquemia cerebral global aguda [22-24]. Así, la preservación o recuperación de las funciones que dependen del funcionamiento del hipocampo y la corteza prefrontal puede involucrar modificaciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales remanentes en dichas estructuras, ya que su organización morfo-funcional es crítica para el aprendizaje y la memoria normales [42-46, 115], a partir del papel fundamental que tiene en estas funciones el flujo de información al través del circuito trisináptico del hipocampo y su proyección a la corteza a partir del segmento CA1 del cuerno de Ammón del esta estructura [47].

En trabajos previos se ha mostrado que el tratamiento neuroprotector con melatonina durante las 6 horas siguientes a un episodio de isquemia cerebral global aguda en ratas reduce de manera importante la pérdida neuronal que cabría esperar en ausencia del tratamiento neuroprotector; en estas condiciones la proporción de neuronas piramidales remanentes en el segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo fue de 20% en los animales sin tratamiento neuroprotector y de 80% en los animales tratados con melatonina, con referencia al número de neuronas de los animales intactos (100%). Así mismo se han identificado cambios en la citoarquitectura de las neuronas piramidales

remanentes en el segmento CA1 del hipocampo consistentes en incremento de arborizaciones dendríticas y aumento de la densidad de espinas dendríticas; en tanto que las características citoarquitectónicas de las células piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza prefrontal, tres meses después de la isquemia y tratamiento neuroprotector con melatonina, son similares a las observadas en los animales intactos. En cambio los animales isquémicos sin tratamiento neuroprotector mostraron reducción del volumen del soma neuronal y del número de arborizaciones dendríticas, sin cambios significativos en el número de dichas células piramidales. Estos cambios en la citoarquitectura de las neuronas remanentes del hipocampo y de la corteza prefrontal han sido interpretados como parte de los fenómenos plásticos que podrían contribuir a la reorganización morfológica y a la preservación de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo, ya que el desempeño en pruebas de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris y de memoria de trabajo en el laberinto de ocho brazos de Olton de los animales isquémicos tratados con melatonina fue igual al de los animales intactos, a diferencia de los animales isquémicos tratados con vehículo en los que se observó deterioro del aprendizaje y memoria espacial y del aprendizaje y memoria de trabajo, de acuerdo con los resultados de dichas pruebas [21, 27, 64]. En este sentido, se ha considerado que la preservación a largo plazo del sustrato neural que es indispensable para la recuperación funcional luego de la isquemia en estructuras cerebrales vulnerables es una meta muy importante de las estrategias de neuroprotección [58], que parece haberse cumplido en dichos estudios acerca del efecto neuroprotector de la melatonina. Los resultados del presente estudio sugieren que las estructuras sinápticas están involucradas en los cambios plásticos observados a largo plazo luego de isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.

Por una parte el incremento, aunque no significativo, en la marca de Sinaptofisina observada especialmente en los estratos *oriens*, y radiado de los animales isquémicos, por otra parte el incremento significativo de sinaptofisina en el estrato radiado de los animales isquémicos que recibieron tratamiento neuroprotector con

melatonina, pueden representar ajustes plásticos de los componentes presinápticos a través del incremento de vesículas presinápticas en las terminales de las aferencias de estructuras nerviosas intra y extrahipocampales, que podría incrementar la eficiencia de la comunicación celular sináptica en las neuronas piramidales remanentes luego del daño provocado por la isquemia. Entre otros fenómenos, la densidad de las zonas activas presinápticas y el número de vesículas sinápticas cambia en las sinapsis involucradas en los procesos de plasticidad del sistema nervioso central como resultado de la presencia de condiciones, estímulos y/o mediadores químicos capaces de inducir cambios que modifiquen la eficiencia de la comunicación celular sináptica [83].

Diversas proteínas neuronales que han sido involucradas en los aspectos funcionales de la conectividad sináptica y en la remodelación de los circuitos neuronales han sido evaluadas como parámetros de daño y neuroprotección luego de isquemia. Así, se ha mostrado que la sinaptofisina se reduce en la corteza frontal y temporal de seres humanos que han sobrevivido entre 1 semana y 1 año a un paro cardíaco [22]. Asimismo, la reducción de sinaptofisina 2 observada 1-3 días después de isquemia cerebral global aguda ha sido relacionada con muerte neuronal tardía en el ratón [116]. Por otra parte, se ha propuesto que el incremento de la expresión de sinaptofisina y de la proteína 43 asociada al crecimiento neuronal inducido por progesterona y el efecto de velafaxina previniendo la disminución de sinaptofisina en el hipocampo de la rata luego de isquemia cerebral, han sido consideradas como evidencias del efecto neuroprotector de esos compuestos [117, 118].

En estos cambios plásticos de las estructuras cerebrales expuestas a la isquemia, las conexiones aferentes pueden influir de manera importante en el resultado final del daño provocado por la isquemia o de recuperación subsecuente del sustrato neural de las estructuras nerviosas vulnerables [25, 26]. Así, se ha enfatizado la importancia de las conexiones del hipocampo a la corteza prefrontal para la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal involucradas en el aprendizaje y la

memoria [64, 119]. En este sentido, se ha mostrado que la desaferentación de las neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza prefrontal, luego de la extensa despoblación de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, luego de isquemia cerebral global, puede dar lugar a cambios de la actividad neuronal que a su vez afecta las características de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal [27, 28].

Por otra parte, la evaluación de sinaptofisina como componente presináptico sugiere que las aferencias a las células piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, están preservadas, o incluso podrían estar aumentadas, tanto en los animales isquémicos tratados con vehículo como en los animales isquémicos tratados con melatonina.

Las aferencias, predominantemente glutamatérgicas excitatorias, de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammón provienen por una parte de las colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales del segmento CA3, cuyas terminales se ubican principalmente en los estratos *oriens* y radiado; estas terminales constituyen la vía de transmisión de información que se origina en la Corteza Entorrinal e ingresa al cuerno de Ammón al través de la vía perforante cuyas terminales dan lugar a contactos sinápticos con las células granulares del Giro Dentado, las cuales a su vez inervan y establecen contactos sinápticos con las células piramidales del segmento CA3 a través de las fibras musgosas, en el circuito trisináptico del hipocampo. Por otra parte, la Corteza Entorrinal establece conexiones directas al través de ramas de la misma vía perforante con las neuronas piramidales del segmento CA3 y con estructuras neuronales ubicadas en el estrato lacunoso molecular del segmento CA1, que también reciben aferentes que provienen directamente del Tálamo; en tanto que terminales aferentes provenientes de la amígdala se ubican en el estrato *oriens*. Además, diversos tipos de interneuronas GABAérgicas que establecen conexiones sinápticas entre diferentes estratos o entre diferentes sitios del mismo estrato contribuyen a la formación de los circuitos neuronales intrahipocampales

involucrados en las funciones de aprendizaje y la memoria espacial dependientes del hipocampo [73, 120, 121].

La preservación de estas aferencias predominantemente glutamatérgicas excitatorias puede ser de la mayor importancia para los fenómenos de plasticidad post-isquemia en el hipocampo ya que la actividad glutamatérgica influye de manera relevante en el desarrollo de estructuras post-sinápticas tales como las espinas dendríticas que están involucradas en los procesos de comunicación celular sináptica, indispensables para el flujo de información y la integración de las funciones hipocampales [64, 122].

En el presente trabajo, la evaluación de la cantidad de la proteína PSD-95 anclada al citoesqueleto y a los receptores NMDA de las espinas dendríticas [87, 123, 124], ha sido planteada como un indicador de los componentes post-sinápticos que podrían estar formando parte de los fenómenos plásticos en sinapsis excitatorias que forman parte del sustrato neural del aprendizaje y la memoria en el hipocampo, luego de isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina. En este sentido, la reducción significativa de la marca de PSD-95 observada en los animales isquémicos tratados con vehículo, parece corresponder a la enorme pérdida, del orden del 80%, de neuronas piramidales y la reducción de las arborizaciones dendríticas de las pocas neuronas remanentes en el segmento CA1 del cuerno de Ammón por efecto de la isquemia [21, 64] descrita en trabajos previos. Por otra parte, la magnitud semejante de la marca de PSD-95 en los diferentes estratos del segmento CA1 del cuerno de Ammón en los animales isquémicos tratados con melatonina y en los animales intactos puede ser indicador de la preservación de suficientes estructuras post-sinápticas para asegurar una conectividad en el hipocampo compatible con un desempeño en tareas de aprendizaje y memoria espacial sin diferencias entre los animales intactos y los animales tratados con melatonina [21]. Sin embargo, dichos resultados de la marca de PSD-95 no sustentarían el incremento de

estructuras post-sinápticas que cabría esperar como parte de los fenómenos de plasticidad sináptica post-isquemia.



## REFERENCIAS

1. Velazquez Monroy, O., et al., [Morbidity and mortality by ischemic heart disease and stroke in Mexico. 2005]. Archivos de cardiología de Mexico, 2007. **77**(1): p. 31-9.
2. Kunst, A.E., et al., *Socioeconomic inequalities in stroke mortality among middle-aged men: an international overview*. European Union Working Group on Socioeconomic Inequalities in Health. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1998. **29**(11): p. 2285-91.
3. Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. 1979-2008 [cited 1979; Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS]. Available from: <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/>.
4. Torregrosa, G., *Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal*, in *Fisiopatología de la isquemia cerebral*. 2007.
5. Kandel, E.R., *Principles of neural science*. 2000, McGraw-Hill Companies: New York.
6. Hossmann, K.A., *The hypoxic brain. Insights from ischemia research*. Adv Exp Med Biol, 1999. **474**: p. 155-69.
7. Diez-Tejedor, E., et al., [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. Rev Neurol, 2001. **33**(5): p. 455-64.
8. Mehta, S.L., N. Manhas, and R. Raghurib, *Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics*. Brain Res Rev, 2007. **54**(1): p. 34-66.
9. Harukuni, I. and A. Bhardwaj, *Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia*. Neurol Clin, 2006. **24**(1): p. 1-21.
10. Pulsinelli, W.A., *Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics*. Prog Brain Res, 1985. **63**: p. 29-37.
11. Lipton, P., *Ischemic cell death in brain neurons*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1431-568.
12. Choi, D.W., *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system*. Neuron, 1988. **1**(8): p. 623-34.
13. Dringen, R., *Metabolism and functions of glutathione in brain*. Prog Neurobiol, 2000. **62**(6): p. 649-71.
14. Nowicky, A.V. and M.R. Duchon, *Changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and membrane currents during impaired mitochondrial metabolism in dissociated rat hippocampal neurons*. J Physiol, 1998. **507** ( Pt 1): p. 131-45.
15. Eskes, R., et al., *Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg<sup>2+</sup> ions*. J Cell Biol, 1998. **143**(1): p. 217-24.
16. Reed, J.C., *Cytochrome c: can't live with it--can't live without it*. Cell, 1997. **91**(5): p. 559-62.
17. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
18. Siesjo, B.K., *Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology*. J Neurosurg, 1992. **77**(2): p. 169-84.

19. Wieloch, T. and K. Nikolich, *Mechanisms of neural plasticity following brain injury*. Curr Opin Neurobiol, 2006. **16**(3): p. 258-64.
20. Ramírez-Amaya, V., *Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis*. J Neuroscience, 2001. **21**: p. 7340-7348.
21. Letechipia-Vallejo, G., et al., *Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats*. Journal of pineal research, 2007. **42**(2): p. 138-46.
22. Akulinin, V.A., P.V. Belichenko, and A. Dahlstrom, *Quantitative analysis of synaptophysin immunoreactivity in human neocortex after cardiac arrest: confocal laser scanning microscopy study*. Resuscitation, 1998. **39**(3): p. 207-13.
23. Akulinin, V.A., et al., *Structural changes in the dendritic spines of pyramidal neurons in layer III of the sensorimotor cortex of the rat cerebral cortex in the late post-ischemic period*. Neuroscience and behavioral physiology, 2004. **34**(3): p. 221-7.
24. Akulinin, V.A., et al., *Dendritic changes of the pyramidal neurons in layer V of sensory-motor cortex of the rat brain during the postresuscitation period*. Resuscitation, 1997. **35**(2): p. 157-64.
25. Fiala, J.C., J. Spacek, and K.M. Harris, *Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?* Brain research. Brain research reviews, 2002. **39**(1): p. 29-54.
26. Johansson, B.B. and P.V. Belichenko, *Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2002. **22**(1): p. 89-96.
27. Garcia-Chavez, D., et al., *Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats*. Neuroscience letters, 2008. **448**(1): p. 148-52.
28. Wellman, C.L. and D.R. Sengelaub, *Cortical neuroanatomical correlates of behavioral deficits produced by lesion of the basal forebrain in rats*. Behavioral and neural biology, 1991. **56**(1): p. 1-24.
29. Jourdain, P., et al., *Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(8): p. 3108-16.
30. Ruan, Y.W., et al., *Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia*. Neuroscience, 2006. **140**(1): p. 191-201.
31. Briones, T.L., et al., *Behaviorally induced synaptogenesis and dendritic growth in the hippocampal region following transient global cerebral ischemia are accompanied by improvement in spatial learning*. Experimental neurology, 2006. **198**(2): p. 530-8.
32. Mudrick, L.A. and K.G. Baimbridge, *Long-term structural changes in the rat hippocampal formation following cerebral ischemia*. Brain research, 1989. **493**(1): p. 179-84.
33. Neigh, G.N., et al., *Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory*. The European journal of neuroscience, 2004. **20**(7): p. 1865-72.

34. Onodera, H., et al., *Post-ischemic synaptic plasticity in the rat hippocampus after long-term survival: histochemical and autoradiographic study*. Neuroscience, 1990. **38**(1): p. 125-36.
35. Skibo, G.G. and A.G. Nikonenko, *Brain plasticity after ischemic episode*. Vitamins and hormones, 2010. **82**: p. 107-27.
36. Bendel, O., et al., *Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory*. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005. **25**(12): p. 1586-1595.
37. Bernabeu, R. and F.R. Sharp, *NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2000. **20**(12): p. 1669-80.
38. Crepel, V., J. Epsztein, and Y. Ben-Ari, *Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus*. Journal of cellular and molecular medicine, 2003. **7**(4): p. 401-7.
39. Kovalenko, T., et al., *Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses*. Hippocampus, 2006. **16**(10): p. 814-25.
40. Arvidsson, A., et al., *Stroke induces widespread changes of gene expression for glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain*. Neuroscience, 2001. **106**(1): p. 27-41.
41. Schmidt-Kastner, R., et al., *Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat*. Brain research. Molecular brain research, 2001. **92**(1-2): p. 157-66.
42. Block, F., *Global ischemia and behavioural deficits*. Progress in neurobiology, 1999. **58**(3): p. 279-95.
43. McDonald, R.J. and N.M. White, *A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum*. Behavioral neuroscience, 1993. **107**(1): p. 3-22.
44. Olsen, G.M., et al., *Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion*. Behavioral neuroscience, 1994. **108**(4): p. 681-90.
45. Olvera-Cortes, E., M. Cervantes, and I. Gonzalez-Burgos, *Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats*. Brain research bulletin, 2002. **58**(3): p. 261-70.
46. Silva, A.J., et al., *Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning*. Neurobiology of learning and memory, 1998. **70**(1-2): p. 44-61.
47. Herreras, O., et al., *Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanaesthetized rat*. Brain research, 1987. **413**(1): p. 75-86.
48. Fuster, J.M., *Synopsis of function and dysfunction of the frontal lobe*. Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum, 1999. **395**: p. 51-7.
49. Lee, I. and R.P. Kesner, *Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2003. **23**(4): p. 1517-23.

50. Jung, M.W., et al., *Firing characteristics of deep layer neurons in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks*. Cerebral cortex, 1998. **8**(5): p. 437-50.
51. Fritts, M.E., et al., *Medial prefrontal lesion deficits involving or sparing the prelimbic area in the rat*. Physiology & behavior, 1998. **64**(3): p. 373-80.
52. Lambe, E.K., P.S. Goldman-Rakic, and G.K. Aghajanian, *Serotonin induces EPSCs preferentially in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex in the rat*. Cerebral cortex, 2000. **10**(10): p. 974-80.
53. Olvera-Cortes, E., et al., *Cerebral serotonin depletion induces egocentric learning improvement in developing rats*. Neuroscience letters, 2001. **313**(1-2): p. 29-32.
54. Taylor, C.L., M.P. Latimer, and P. Winn, *Impaired delayed spatial win-shift behaviour on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat*. Behavioural brain research, 2003. **147**(1-2): p. 107-14.
55. Perez-Vega, M.I., A. Feria-Velasco, and I. Gonzalez-Burgos, *Prefrontocortical serotonin depletion results in plastic changes of prefrontocortical pyramidal neurons, underlying a greater efficiency of short-term memory*. Brain research bulletin, 2000. **53**(3): p. 291-300.
56. Harris, K.M., *Calcium from internal stores modifies dendritic spine shape*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(22): p. 12213-5.
57. Hartman, R.E., et al., *Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats*. Brain research, 2005. **1043**(1-2): p. 48-56.
58. STAIR, *Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development*. Stroke; a journal of cerebral circulation, 1999. **30**: p. 2752-2758.
59. Kewal, K.J., *The handbook of neuroprotection*, in Springer Science+Business Media. 2011.
60. Cheng, Y.D., L. Al-Khoury, and J.A. Zivin, *Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure*. NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2004. **1**(1): p. 36-45.
61. Reiter, R.J., *Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions*. Endocr Rev, 1991. **12**(2): p. 151-80.
62. Cervantes, M., G. Morali, and G. Letechipia-Vallejo, *Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain*. Journal of pineal research, 2008. **45**(1): p. 1-7.
63. Letechipia-Vallejo, G., I. Gonzalez-Burgos, and M. Cervantes, *Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats*. Archives of medical research, 2001. **32**(3): p. 186-92.
64. Gonzalez-Burgos, I., et al., *Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats*. Neuroscience letters, 2007. **423**(2): p. 162-6.
65. Todd, M.M., et al., *The neurologic effects of thiopental therapy following experimental cardiac arrest in cats*. Anesthesiology, 1982. **57**(2): p. 76-86.
66. Wang, X., *Melatonin Attenuates Scopolamine Induced Memory Synaptic Disorder by Rescuing EPACs miR-124 Egr1 Pathway*. 2012.

67. Jahn, R., et al., *A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(12): p. 4137-41.
68. Buckley, K.M., E. Floor, and R.B. Kelly, *Cloning and sequence analysis of cDNA encoding p38, a major synaptic vesicle protein*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2447-56.
69. Evans, G.J. and M.A. Cousin, *Tyrosine phosphorylation of synaptophysin in synaptic vesicle recycling*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 6): p. 1350-3.
70. Rehm, H., B. Wiedenmann, and H. Betz, *Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane*. EMBO J, 1986. **5**(3): p. 535-41.
71. Thomas, L., et al., *Identification of synaptophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane*. Science, 1988. **242**(4881): p. 1050-3.
72. McMahon, H.T. and T.C. Sudhof, *Synaptic core complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP25 forms high affinity alpha-SNAP binding site*. J Biol Chem, 1995. **270**(5): p. 2213-7.
73. Johnston, P.A., R. Jahn, and T.C. Sudhof, *Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin*. J Biol Chem, 1989. **264**(2): p. 1268-73.
74. Becher, A., et al., *The synaptophysin-synaptobrevin complex: a hallmark of synaptic vesicle maturation*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1999. **19**(6): p. 1922-31.
75. Janz, R., et al., *Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 687-700.
76. Grant, S.G., et al., *Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1903-10.
77. Tarsa, L. and Y. Goda, *Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(2): p. 1012-6.
78. Ishimaru, H., et al., *Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils*. Brain research, 2001. **903**(1-2): p. 94-101.
79. Couteaux, R. and M. Pecot-Dechavassine, *[Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction]*. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D, 1970. **271**(25): p. 2346-9.
80. Hirokawa, N. and J.E. Heuser, *Internal and external differentiations of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction*. J Neurocytol, 1982. **11**(3): p. 487-510.
81. Harlow, M.L., et al., *The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction*. Nature, 2001. **409**(6819): p. 479-84.
82. Nagwaney, S., et al., *Macromolecular connections of active zone material to docked synaptic vesicles and presynaptic membrane at neuromuscular junctions of mouse*. J Comp Neurol, 2009. **513**(5): p. 457-68.
83. Jin, Y., *Synaptogenesis*. WormBook, 2005: p. 1-11.
84. Schikorski, T. and C.F. Stevens, *Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1997. **17**(15): p. 5858-67.

85. Rollenhagen, A., et al., *Structural determinants of transmission at large hippocampal mossy fiber synapses*. J Neurosci, 2007. **27**(39): p. 10434-44.
86. Clarke, G., L. , *Presynaptic active zone density during development and synaptic plasticity*. Frontiers in molecular neuroscience, 2012.
87. Kim, E. and M. Sheng, *PDZ domain proteins of synapses*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(10): p. 771-81.
88. El-Husseini, A.E., et al., *PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses*. Science, 2000. **290**(5495): p. 1364-8.
89. Sekino, Y., N. Kojima, and T. Shirao, *Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis*. Neurochem Int, 2007. **51**(2-4): p. 92-104.
90. Nikonenko, I., et al., *PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling*. J Cell Biol, 2008. **183**(6): p. 1115-27.
91. Steiner, P., et al., *Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity*. Neuron, 2008. **60**(5): p. 788-802.
92. Futai, K., et al., *Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neuroigin*. Nat Neurosci, 2007. **10**(2): p. 186-95.
93. Gerrow, K., et al., *A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development*. Neuron, 2006. **49**(4): p. 547-62.
94. Ehrlich, I., et al., *PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(10): p. 4176-81.
95. Marrs, G.S., S.H. Green, and M.E. Dailey, *Rapid formation and remodeling of postsynaptic densities in developing dendrites*. Nat Neurosci, 2001. **4**(10): p. 1006-13.
96. Blomberg, F., R.S. Cohen, and P. Siekevitz, *The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. II. Characterization and arrangement of some of the major proteins within the structure*. J Cell Biol, 1977. **74**(1): p. 204-25.
97. Cohen, R.S., et al., *The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex. I. Overall morphology and protein composition*. J Cell Biol, 1977. **74**(1): p. 181-203.
98. Matus, A.I. and D.H. Taff-Jones, *Morphology and molecular composition of isolated postsynaptic junctional structures*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1978. **203**(1151): p. 135-51.
99. Gurd, J.W., *Identification of lectin receptors associated with rat brain postsynaptic densities*. Brain research, 1977. **126**(1): p. 154-9.
100. Cajal, S.R.y., *On the structure of the cerebral cortex of some mammals*. La Cellule, 1891. **7**: p. 125-176.
101. Segal, M., *Dendritic spines and long-term plasticity*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(4): p. 277-84.
102. Cohen, R.S., et al., *Fine structure of synapses of the central nervous system in resinless sections*. J Submicrosc Cytol, 1983. **15**(4): p. 849-63.
103. Rutledge, L.T., C. Wright, and J. Duncan, *Morphological changes in pyramidal cells of mammalian neocortex associated with increased use*. Experimental neurology, 1974. **44**(2): p. 209-28.
104. Greenough, W.T., R.W. West, and T.J. DeVogd, *Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat*. Science, 1978. **202**(4372): p. 1096-8.

105. Takumi, Y., et al., *Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses*. Nat Neurosci, 1999. **2**(7): p. 618-24.
106. Racca, C., et al., *NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2000. **20**(7): p. 2512-22.
107. Murthy, V.N., T.J. Sejnowski, and C.F. Stevens, *Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses*. Neuron, 1997. **18**(4): p. 599-612.
108. Nagerl, U.V., et al., *Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2007. **27**(30): p. 8149-56.
109. Lasiter, P.S. and D.L. Kachele, *Postnatal development of protein P-38 ('synaptophysin') immunoreactivity in pontine and medullary gustatory zones of rat*. Brain research. Developmental brain research, 1989. **48**(1): p. 27-33.
110. Daly, C., et al., *Synaptophysin regulates clathrin-independent endocytosis of synaptic vesicles*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(11): p. 6120-5.
111. Okabe, S., et al., *Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2001. **21**(24): p. 9561-71.
112. Freund, T.F. and Z. Magloczky, *Early degeneration of calretinin-containing neurons in the rat hippocampus after ischemia*. Neuroscience, 1993. **56**(3): p. 581-96.
113. Sorra, K.E. and K.M. Harris, *Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines*. Hippocampus, 2000. **10**(5): p. 501-11.
114. Gobbo, O.L. and S.M. O'Mara, *Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia*. Behavioural brain research, 2004. **152**(2): p. 231-41.
115. McNamara, R.K. and R.W. Skelton, *The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze*. Brain research. Brain research reviews, 1993. **18**(1): p. 33-49.
116. Nishimura, H., et al., *Changes in mint1, a novel synaptic protein, after transient global ischemia in mouse hippocampus*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2000. **20**(10): p. 1437-45.
117. Fang, S., et al., *Chronic effects of venlafaxine on synaptophysin and neuronal cell adhesion molecule in the hippocampus of cerebral ischemic mice*. Biochem Cell Biol, 2010. **88**(4): p. 655-63.
118. Zhao, Y., et al., *Progesterone influences postischemic synaptogenesis in the CA1 region of the hippocampus in rats*. Synapse, 2011. **65**(9): p. 880-91.
119. Laroche, S., S. Davis, and T.M. Jay, *Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation*. Hippocampus, 2000. **10**(4): p. 438-46.
120. Klausberger, T., *GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus*. The European journal of neuroscience, 2009. **30**(6): p. 947-57.

121. Pignatelli, M., A. Beyeler, and X. Leinekugel, *Neural circuits underlying the generation of theta oscillations*. J Physiol Paris, 2012. **106**(3-4): p. 81-92.
122. Takacs, V.T., et al., *Extrinsic and local glutamatergic inputs of the rat hippocampal CA1 area differentially innervate pyramidal cells and interneurons*. Hippocampus, 2012. **22**(6): p. 1379-91.
123. Dosemeci, A., et al., *Composition of the synaptic PSD-95 complex*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(10): p. 1749-60.
124. Pak, D.T., et al., *Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP*. Neuron, 2001. **31**(2): p. 289-303.