



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EVALUACION FUNCIONAL DE LOS EFECTOS
NEUROPROTECTORES DE LA MELATONINA LUEGO DE
ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA EN RATAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA**

P R E S E N T A

Q.F.B. ELISA LÓPEZ LOEZA

DIRECTOR DE TESIS

D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro.

**MORELIA, MICHOACÁN
MÉXICO
2005**

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación
Biomédica de Michoacán (CIBIMI) del IMSS
bajo la dirección del D.C. José Miguel Cervantes Alfaro, teniendo
como colaboradores a los D.C. Ignacio González Burgos, Maria
Esther Olvera Cortes, Gabriela Morali de la Brena y la M.C. Graciela
Letechipia Vallejo.

Al centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina “Dr. Ignacio Chávez” por el apoyo y facilidades para realizar mis estudios de Posgrado.

A los D.C. Maria Esther Olvera Cortes, Ignacio González Burgos, Gabriela Morali de la Brena, Graciela Letechipia Vallejo y Miguel Cervantes Alfaro, por darme su sabiduría sin medida.

A todos los compañeros del CIBIMI: Miguel, Jessi, Misael, Lore, Fidel, Jesús, Blanca, Iván, Paty y Vero. Gracias por su amistad.

Por supuesto a mis compañeras de Posgrado: Aída, Luz Elena y Paty por todo lo que compartimos juntas y que nunca voy a olvidar.

También a mis compañeros de la PGJE por todo su apoyo y respaldo que me dieron en todo este tiempo.

A mi familia por todo el apoyo que siempre me ha dado.

A mis amigos Judith, Juanis, Chucho, Esme y Moni porque siempre están junto a mi.

Y muy especialmente a Temo y a Montse por ser lo mejor que tengo en la vida.

Resumen

El Consenso Internacional de Neuroprotección ha señalado la importancia de la evaluación morfológica y funcional a largo plazo de la integridad del sistema nervioso, como una evidencia relevante acerca de los efectos neuroprotectores de procedimientos farmacológicos y no farmacológicos. En este estudio, la memoria de referencia y de trabajo espacial en el laberinto acuático de Morris y en el laberinto radial de Olton, respectivamente, así como la población de neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, fueron evaluados en ratas macho adultas, 90 días después de 15 min. de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos, seguido por 6 h de infusión de melatonina *iv* (10 mg/kg/h) o vehículo. Un grupo de animales intactos y uno control fueron incluidos en el estudio. Los animales sujetos a isquemia y tratados con vehículo se vieron afectados en la memoria de referencia espacial en el laberinto acuático de Morris, mientras las ratas tratadas con melatonina obtuvieron latencias de escape similares a los animales intactos y controles. De manera similar el grupo tratado con vehículo mostró un número significativamente mayor de errores en el laberinto radial de Olton que cualquier otro grupo. Los animales sujetos a isquemia y tratados con vehículo mostraron una reducción del 80% de la población de las neuronas piramidales del sector CA1, así como del 50% en el sector CA2 del hipocampo, mientras que una preservación significativa de la población de las mismas regiones fue observada en los animales tratados con melatonina. Estos resultados muestran las consecuencias a largo plazo del efecto neuroprotector de la melatonina con respecto a la integridad morfológica y funcional del hipocampo, una de las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia.

Abstract

International consensus on neuroprotection have pointed out the relevance of the long-term morphological y functional evaluation of the integrity of the nervous system, as a relevant evidence about neuroprotective effects of pharmacological or non-pharmacological procedures. In this study, the reference and working spatial memory in the Morris water maze and the Olton radial maze respectively, as well as the pyramidal neuron population of the *comus Ammoni* (CA) of the hippocampus, were evaluated in adult male rats 90 days after 15 *m* the global cerebral ischemia by four-vessel occlusion, followed for 6 *h* by the *iv* infusion of melatonin (10 *mg/kg/h*) or vehicle. A group of intact, non-ischemic rats and a group of control rats (sham) were also included in the study. Animals subjected to ischemia and treated with vehicle lacked the ability of spatial reference memory in the water maze, while melatonin-treated rats performed in this test with similar escape latencies to those of intact and control rats. Similarly, the ischemic group treated with vehicle showed a significantly higher number of errors in the Olton radial maze than any of the other groups. Animals subjected to ischemia and treated with vehicle showed an 80 % reduction of the normal pyramidal neuron population in the CA1 subfield and 50 % reduction of the normal pyramidal neuron population in the CA2 subfield of the hippocampus, while a significant preservation of the neuronal population of this structure was observed in melatonin-treated animals. These results show the long-term consequences of the neuroprotective effects of melatonin regarding to the morphological and functional integrity of the hippocampus, one of the most vulnerable brain structures to ischemia.

Contenido

Dedicatoria	III
Resumen	V
Abstract	VII
Contenido	VIII
1. Introducción	1
1.1. Enfermedad vascular cerebral	1
1.2. Alteración de los gradientes iónicos	4
1.3. Exitotoxicidad por glutamato	6
1.4. Radicales libres	10
1.5. Radicales libres derivados del oxígeno	10
1.6. Muerte celular programada	14
1.7. Vulnerabilidad neuronal ante la isquemia	16
1.8. Aprendizaje y memoria	21
2. Antecedentes	26
3. Planteamiento del Problema	33
4. Hipótesis	34
5. Objetivos	35
5.1. Objetivo General	35
5.2. Objetivos Específicos	35
6. Material y Métodos	36
6.1. Métodos	36
6.2. Modelo de isquemia cerebral global aguda mediante la oclusión de los cuatro vasos	37
6.3. Memoria de referencia espacial	38
6.3.1. Tratamiento estadístico	39
6.4. Memoria de trabajo espacial	39
6.4.1. Tratamiento estadístico	40

6.5. Evaluación de la población neuronal del hipocampo	40
7. Resultados	42
8. Discusión	54
Referencias	59

Introducción

1.1. Enfermedad vascular cerebral

Las enfermedades cerebrovasculares (*ECV*) son el resultado de situaciones fisiopatológicas transitorias o permanentes provocadas por la isquemia o hemorragia en estructuras anatómicas del cerebro. Las *ECV* son causa de fallecimiento del 12% – 15% de la población, por abajo del cáncer y otras enfermedades cardiovasculares; así como, la primera causa de incapacidad importante y permanente de los individuos (30% – 40% de quienes sobreviven a un episodio de isquemia o hemorragia cerebral aguda) y por esta razón se originan costos sociales y económicos muy elevados. La prevalencia de las *ECV* se ha calculado entre 10,000 a 15,000 por millón de habitantes y su incidencia anual es de 101-285/100,000 varones y de 47-198/100,000 mujeres [1].

La *ECV* isquémica representa el 85% del total. Los infartos cerebrales que ocurren en pacientes menores de 45 años corresponde al 3% – 5% del total; sin embargo, a partir de los 55 años la incidencia aumenta de manera casi exponencial. Este hecho y el incremento de la esperanza de vida de la población multiplican la importancia de esta patología [1] estas situaciones, por otra parte, han motivado la investigación en los campos del conocimiento de las neurociencias en función de la solución de los problemas de salud que representan las *ECV* en los seres humanos. De esta manera los resultados de múltiples investigaciones han dado lugar al conocimiento de diferentes

fenómenos celulares involucrados en la fisiopatología de la isquemia cerebral y de los mecanismos del daño cerebral post-isquemia. Así, se han identificado como relevantes: la despolarización anóxica, la excitotoxicidad mediada por glutamato, la activación de mecanismos de daño celular activados por calcio, la pérdida o alteración de los mecanismos celulares de regulación de los radicales libres, los fenómenos celulares proinflamatorios y los fenómenos celulares proapoptóticos.

En el cerebro maduro, en condiciones normales la oxidación de la glucosa permite obtener la energía, en forma de ATP, necesaria para mantener las funciones celulares. El suministro normal de oxígeno y glucosa como sustratos para esta actividad metabólica del cerebro esta garantizado normalmente por el flujo sanguíneo que de manera continua accede al cerebro a través de las arterias carótidas y las arterias vertebrales. El flujo sanguíneo y el metabolismo cerebrales están estrechamente relacionados [1]. En condiciones normales el flujo sanguíneo cerebral esta autorregulado de forma tal que el cerebro humano (y en general el cerebro de los mamíferos) recibe, en condiciones basales aproximadamente $55 \text{ ml}/100\text{g}/\text{min}$, lo cual garantiza un suministro continuo y adecuado de oxígeno y de glucosa para llevar a cabo sus funciones. La actividad metabólica cerebral es de tal magnitud que no obstante que este órgano corresponde a poco menos del 5 % del peso corporal, requiere más del 20 % del gasto cardíaco para mantener la integridad de su estructura y sus funciones. Por ejemplo, las neuronas requieren de energía para mantener en operación, entre otros procesos, los mecanismos transmembranales de transporte activo de los diferentes gradientes iónicos cuya dinámica y regulación es la base de múltiples fenómenos característicos de las neuronas como la excitabilidad y la comunicación intercelular, las cuales son fundamentales en la organización de las estructuras y en la integración de las funciones cerebrales [2].

La isquemia cerebral destaca como un componente de la mayor importancia en las enfermedades cerebrovasculares. Se distinguen dos formas de isquemia: global y focal; la primera se asocia con sucesos tales como infarto cardiaco o hipotensión severa y da como resultado la hipoperfusión del cerebro completo con la ausencia de flujo colateral al tejido isquémico. Por otro lado, la isquemia focal es el resultado de la oclusión de una arteria distante al polígono de Willis tal como la arteria cerebral media, lo cual

permite la presencia de flujo colateral en el tejido isquémico. En esta circunstancia el tejido nervioso presenta diferentes grados de hipoperfusión distinguiéndose un núcleo o centro isquémico (con ausencia de flujo sanguíneo y características fisiopatológicas similares a la isquemia global) rodeada por una zona de “*penumbra*” en la que persiste un flujo sanguíneo reducido pero compatible con la sobrevivencia de neuronas. La alteración funcional de las neuronas de esta zona de *penumbra* es usualmente grande, sin embargo sus posibilidades de recuperación y sobrevivencia son mayores que las de aquellas que se encuentran en el núcleo isquémico [3, 4]. Las modalidades de isquemia cerebral comprenden cuadros agudos y crónicos; entre los agudos el mayor número se debe a isquemia focal y en menor número a isquemia global. La microembolización en territorios capilares asociada a la aterosclerosis cerebral es la causa más frecuente de las formas crónicas de isquemia cerebral [4]. Ante esta situación es importante orientar la investigación hacia el conocimiento de las causas, la fisiopatología y las opciones de tratamiento de los cuadros de isquemia cerebral en función de lograr menos incidencias, mortalidad y secuelas neurológicas incapacitantes [4].

La comprensión de los fenómenos que forman parte de la fisiopatología de la isquemia cerebral es un requisito indispensable para el diseño de estudios experimentales y clínicos en este campo del conocimiento y para el desarrollo y la sustentación de nuevas y mejores propuestas aplicables al tratamiento de estas patologías en los seres humanos [5].

En situaciones de isquemia, el cerebro sufre de manera global o parcial una disminución o una supresión del suministro de sangre y como consecuencia de oxígeno y glucosa por lo que diversas funciones cerebrales se verán alteradas. Estudios experimentales han mostrado que la actividad eléctrica evocada y espontánea cesa cuando el FSC es menor de 16 a 18 $ml/100g/min$. [3, 4]. Este grado de isquemia representa el umbral para la pérdida de la función eléctrica neuronal. Subsecuentemente se mostró que se requiere de una reducción del FSC hasta 10 a 12 $ml/100g/min$. para la pérdida de la homeostasis iónica celular [4, 6].

1.2. Alteración de los gradientes iónicos

La supresión de los gradientes iónicos a través de membranas excitables (*neuronas*) y no excitables (*glia*) correspondiente a la pérdida de ATP se caracteriza por la salida de K^+ de las células, la entrada de Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} a las células y despolarización celular [7]. De estos acontecimientos, el aumento de K^+ extracelular, así como una disminución en el pH , precede a otros cambios iónicos. En esta fase, las reservas celulares de ATP se agotan rápidamente. Se postula que el aumento de K^+ extracelular puede alcanzar concentraciones suficientes para liberar neurotransmisores tales como glutamato, lo cual a su vez activa la translocación de Na^+ y Ca^{2+} a través de canales iónicos acoplados a receptores NMDA y no NMDA; estos fenómenos llevan a un incremento anormal de Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- y H_2O intracelular, hinchamiento celular, y edema citotóxico. El Ca^{2+} extracelular entra a la célula ya sea por canales operados por voltaje o canales operados por receptor y su incremento anormal en el medio intracelular provoca una sobrecarga del mismo en mitocondrias y consecuentemente una producción de ATP menos eficiente. Simultáneamente ocurre la liberación de iones de calcio provenientes de sus depósitos intracelulares; estos depósitos son el retículo endoplásmico y otros organelos conocidos como calciosomas los cuales liberan calcio en respuesta al incremento intracelular del mismo. La mitocondria también contribuye con Ca^{2+} , particularmente si se encuentra sobrecargada o durante la reperfusión después de isquemia [8].

Una vez que se ha llegado a concentraciones intracelulares de Ca^{2+} superiores a las fisiológicas ($> 10^{-7}M$), pueden activarse diversas enzimas dependientes de calcio y potencialmente dañinas para la integridad celular. Estas incluyen fosfolipasas, proteasas y endonucleasas, así como formas neuronal y endotelial de sintasa de óxido nítrico. Cabe señalar que en estas condiciones la muerte celular puede ocurrir como resultado de la activación de procesos celulares calcio-dependientes que persisten aún durante la reperfusión. Tal es el caso del aumento en la síntesis de óxido nítrico y otros radicales libres derivados de oxígeno precisamente cuando el suministro de oxígeno es reestablecido durante la reperfusión [7].

En este paradigma de daño neuronal secundario, originado por el incremento anor-

mal de Ca^{2+} intracelular, la mitocondria ocupa un papel central. No solo por su falta de funcionamiento que da lugar a una falla de energía e induce la pérdida inicial de la homeostasis del calcio iónico, sino porque la mitocondria captura una fracción considerable de la carga de calcio celular una vez que inicia la reperfusión. Una mayor actividad de calcio intramitocondrial se cree que induce la producción de radicales libres de oxígeno así como la liberación de moléculas que inducen una cascada de reacciones que llevan a la muerte celular [7]. En la isquemia cerebral, la caída rápida en la producción neuronal de ATP, sin una comparable reducción en la utilización de éste, rápidamente lleva a una condición indeaseable ya que la mayor parte de energía de la neurona se consume en procesos que son esenciales para el funcionamiento neuronal. En el cerebro de los mamíferos, en condiciones de isquemia la concentración normal de ATP puede ser conservada durante no más de 40 segundos y luego se reduce rápidamente hasta su desaparición en el término de 1 a 2 minutos. En el cerebro isquémico con carencia de suministro continuo de oxígeno y glucosa, la falla de energía amenaza en corto tiempo la integridad estructural y funcional de la célula debido en gran parte a la degradación de macromoléculas ocasionada por las acciones de enzimas cuya activación depende de Ca^{2+} luego de que la concentración intracelular de este ión se incrementa aceleradamente durante la isquemia [9]. La producción de lactato y la consecuente acidosis resultante de la glicólisis anaerobia; así como la producción de radicales libres oxidantes [6, 10, 11], contribuyen también a los mecanismos de daño celular por isquemia. El agotamiento energético y la pérdida de homeostasis iónica ponen en movimiento una serie de fenómenos celulares secundarios que pueden provocar la muerte de neuronas vulnerables. Los fenómenos consecutivos a un período de isquemia cerebral incluyen la liberación de neurotransmisores, la entrada de calcio a la célula, activación de proteasas y lipasas, producción de radicales libres y moléculas que favorecen la inflamación, la activación de segundos mensajeros intracelulares y la inducción de genes que promueven la muerte celular vía apoptosis [6].

1.3. Exitotoxicidad por glutamato

Una de las teorías principales acerca de los mecanismos de daño secundario al sistema nervioso central esta relacionada con la neurotransmisión mediada por glutamato y sus receptores. El glutamato normalmente funciona como un neurotransmisor excitador en el cerebro, pero bajo condiciones patológicas tales como isquemia y la activación exagerada de receptores de glutamato puede llevar a la muerte neuronal (excitotoxicidad). La unión de glutamato a sus receptores causa la despolarización de la membrana y el aumento de la concentración de sodio y calcio citosólico libres en la neurona post-sináptica. Bajo condiciones normales, el glutamato es rápidamente retirado de la hendidura sináptica por la activación de mecanismos de recaptura de los astrocitos; durante la isquemia, la activación de receptores de glutamato se incrementa debido tanto a la liberación excesiva de glutamato como a la alteración del mecanismo de su recaptura y biotransformación. Esto da como resultado el aumento sostenido de las concentraciones de calcio citosólico libre, lo que puede dar lugar a la activación de proteasas y lipasas, así como a otros procesos capaces de causar la muerte neuronal [6, 8, 12, 13]. En condiciones normales, las neuronas y los astrocitos mantienen una concentración extracelular de glutamato en el rango 1 a 5 $\mu\text{mol/l}$, mientras que la concentración en el citoplasma es de 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$. Estos gradientes se conservan gracias a la ATPasa de Na^+ y K^+ . Sin embargo, bajo condiciones de isquemia la producción de ATP se verá afectada y por lo tanto, la falla en la recaptura de glutamato conducirá al incremento de sus concentraciones extracelulares [6].

La liberación de glutamato a partir de vesículas sinápticas es un evento inicial durante la isquemia y es activado por la despolarización de la membrana. Este proceso de detiene tan pronto como la cantidad de ATP declina debido a que la liberación sináptica de glutamato es dependiente de ATP. Por otra parte, la liberación no sináptica de glutamato puede ocurrir tanto del citoplasma de la neurona como de la glia. El trayecto principal de esta liberación parece ser vía flujo invertido de glutamato a través de los transportadores de recaptura de glutamato que se ven alterados cuando se pierde la homeostasis iónica. La cantidad de glutamato liberado por esta vía puede exceder en un gran margen respecto de aquel liberado de las vesículas sinápticas[6, 8, 12, 13].

La despolarización neuronal provocada por la isquemia y la entrada en exceso de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, da como resultado el aumento de la liberación de glutamato de los procesos presinápticos de las neuronas excitadoras que utilizan glutamato como neurotransmisor. En estas condiciones, la liberación de glutamato ocurre cuando el flujo sanguíneo cerebral disminuye a la mitad de lo normal. Una vez liberado, éste puede actuar en diversos receptores postsinápticos que incluyen: el receptor a N-metil-D-aspartato (*NMDA*), el receptor ácido kaínico, ácido alfa amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazole propiónico (*KA/AMPA*) y el receptor a quisqualato. La unión de glutamato al receptor *NMDA* origina un flujo principalmente de calcio y en menor cantidad de sodio a través del canal iónico asociado al receptor, siendo el flujo de calcio modulado por zinc, glicina, ión, hidrógeno y sitios redox en el receptor *NMDA*. Antagonistas competitivos al receptor *NMDA* compiten con el sitio de unión de glutamato, en tanto que antagonistas no competitivos del receptor *NMDA* compiten por otros sitios de unión en las subunidades del receptor *NMDA* que limitan el canal de calcio del receptor de *NMDA* y glicina. La importancia potencial de los receptores *NMDA* en el daño por isquemia se ha sustentado en los efectos de antagonistas competitivos y no competitivos de este receptor en la prevención de la neurotoxicidad inducida por la isquemia y la privación de glucosa en modelos *in vitro* y en el mejoramiento en la evolución del infarto en modelos de isquemia focal en roedores. Es notable que los antagonistas del receptor *NMDA* no modifican favorablemente la magnitud de la muerte celular en modelos de isquemia global cuando la temperatura del cerebro se mantiene controlada [6, 13].

La liberación de glutamato también provoca la activación de receptores *KA/AMPA* así como de receptores a quisqualato de tipo metabotrópico. La activación de receptores *KA/AMPA* ocasiona la entrada de sodio a la neurona postsináptica, dando por resultado la entrada de calcio tanto a través de los canales de calcio dependientes de voltaje, así como a través del intercambiador Na^+/CA^{2+} . En algunos receptores *KA/AMPA* se ha mostrado que también fluye calcio a través de canales de calcio asociados a este receptor. Además, se ha sugerido que en la isquemia específicamente de tipo global, puede ocurrir una desregulación de las subunidades del receptor *KA/AMPA* que se sabe son las encargadas del flujo de calcio. Esto ha llevado a la

hipótesis de que la isquemia puede inducir la alteración de las subunidades del receptor KA/AMPA permitiendo una mayor entrada de calcio a la célula isquémica y la eventual muerte celular. Los antagonistas de KA/AMPA disminuyen el daño en las neuronas del campo hipocámpal de CA1 en modelos experimentales de isquemia global, mientras que en modelos de isquemia focal reduce la extensión de la zona de infarto [6].

Las acciones del glutamato en los receptores quisqualato activan proteínas *G*, las cuales modulan la actividad de los receptores NMDA y KA/AMPA y activan la hidrólisis de fosfolípidos de inositol y la liberación de trifosfato de inositol (*IP*₃) que al unirse a receptores para *IP*₃ en la membrana del retículo endoplásmico provoca la liberación de calcio de los depósitos del retículo endoplásmico, así como probablemente de la mitocondria. Esta movilización adicional de calcio contribuirá al daño celular. Siendo la glia la principal responsable de la remoción de glutamato del espacio extracelular, ante la falla de energía, la pérdida o disminución de este fenómeno contribuye a la permanencia de glutamato extracelular. Además el intercambiador sodio/glutamato invierte su función como consecuencia de la deficiencia energética, introduciendo sodio a la célula y liberando glutamato, lo que ocasionará edema celular y la estimulación en exceso de los receptores de glutamato [6, 8, 12, 13]. De hecho, la toxicidad del glutamato durante la anoxia parece estar estrechamente relacionada a su habilidad para estimular la entrada de Ca^{2+} a la neurona.

Un efecto en cascada ocurre en este proceso; las neuronas con falla energética liberan cantidades neurotóxicas de neurotransmisores excitadores los cuales estimulan a las células vecinas vulnerables a liberar sus neurotransmisores, con consecuencias potencialmente fatales. Posiblemente debido a los mecanismos de recaptura dañados, el glutamato, el aspartato y la dopamina pueden permanecer en altas concentraciones o elevarse aun posteriormente, por varias horas después de que la circulación ha sido reestablecida seguida a la isquemia. Esta puede ser una causa importante del daño tardío por anoxia- isquemia que ocurre posterior a la reperfusión del tejido con sangre oxigenada - una situación paradójica llamada daño por reperfusión [4].

La entrada de calcio en las neuronas postsinápticas a través de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos activa la fosfolipasa A2 (PLA2). Esta a su vez, activa

la formación del factor activador de plaquetas (PAF) y la liberación de ácido araquidónico. El ácido araquidónico es metabolizado por la ciclooxigenasa 1 y 2 para producir prostaglandinas y leucotrienos. PAF induce genes de activación temprana, incluyendo c-fos. Las acciones de PAF en los receptores extracelulares pueden modular la liberación de glutamato y la liberación de otros neurotransmisores excitadores. El papel de PAF en la mediación del daño por isquemia se basa en los hallazgos de que los antagonistas de PAF restablecen el flujo sanguíneo y disminuyen el daño cerebral por isquemia. Los antagonistas de PAF disminuyen la degradación de fosfolípidos por PLA2 y protegen las neuronas piramidales de CA1 en el modelo de isquemia global en gerbo [6].

Activación de fosfolipasas. Las concentraciones de ácidos grasos libres aumentan considerablemente en el sistema nervioso durante la isquemia y la reperfusión. El Ca^{2+} parece jugar también un papel clave como activador de lipasas, particularmente la fosfolipasa A2, la cual cataliza la ruptura de fosfolípidos a ácidos grasos libres. La pérdida de ATP también juega un papel importante por sí misma, ya que la síntesis de fosfolípidos a partir de ácidos grasos libres demanda ATP y por lo tanto se detendrá durante la falla de energía. Así, la pérdida de ATP causará que el metabolismo de los lípidos se desvíe hacia una degradación neta de fosfolípidos [9].

Los productos de la hidrólisis de los fosfolípidos durante la anoxia incluyen los ácidos grasos libres, diacil glicerol, lisofosfolípidos y trifosfato de inositol (IP_3). La hidrólisis de fosfolípidos puede ser dañina de diferentes maneras. Primero, la ruptura de los fosfolípidos de membrana causará por supuesto ruptura en varias partes de la estructura de la membrana lipídica, con las consecuentes alteraciones de la dinámica de iones a través de la membrana [9, 14]. En segundo lugar, los productos primarios de la hidrólisis de fosfolípidos son capaces de contribuir a los mecanismos del daño neuronal. IP_3 es un mensajero intracelular que causa la liberación posterior de Ca^{2+} a partir de los depósitos intracelulares, con lo cual se agrega al incremento incontrolable de Ca^{2+} intracelular; los ácidos grasos libres y los lisofosfolípidos pueden actuar como detergentes en las membranas; el ácido araquidónico, así como otros lípidos formados durante la isquemia y reperfusión, son inhibidores potentes del mecanismo de transporte membranar de Na^+/K^+ y pueden, por lo tanto, actuar para perpetuar

el desbalance iónico aún si el tejido es reperfundido con oxígeno [9, 14, 15]. En tercer lugar, algunos de los metabolitos primarios de la hidrólisis de fosfolípidos son transformados posteriormente a factores activadores de plaquetas (PAF), prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos A₂; Todas ellas sustancias que pueden causar alteraciones severas en la regulación del flujo sanguíneo a regiones cerebrales específicas cuando son producidas en cantidades excesivas. Además, la síntesis de los compuestos antes mencionados da origen como subproductos, a radicales libres. PAF es un poderoso agente que facilita la agregación plaquetaria y también puede iniciar reacciones de inflamación en los vasos sanguíneos. La prostaglandina F_{2a} es un potente inhibidor de la bomba de Na^+/K^+ [6, 9, 14, 15]. Finalmente, el suministro de oxígeno durante la reperfusión puede favorecer la excesiva oxidación de los fosfolípidos acumulados durante la isquemia, llevando a la formación de aldehídos altamente reactivos y citotóxicos, así como radicales libres [10, 15].

1.4. Radicales libres

Un radical libre es una especie molecular químicamente inestable y de vida corta, con al menos uno de sus orbitales de valencia conteniendo un solo electrón en vez del par de electrones necesario para su estabilidad. Así, los radicales libres son a menudo altamente reactivos debido a su tendencia a adquirir estabilidad por sustracción de un electrón o un átomo de hidrógeno de moléculas que entren en contacto con él [9, 16, 17].

1.5. Radicales libres derivados del oxígeno

El término *radical libre de oxígeno* se refiere a formas de oxígeno reactivas, parcialmente reducidas: superóxido ($O_2^- \cdot$), radical peroxilo, radical hidroxilo ($OH \cdot$) considerado el más reactivo y el oxígeno singulete. Los radicales libres pueden ser dañinos porque reaccionan indiscriminadamente con otros constituyentes de la célula. Los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados son notablemente sensibles al ataque por radicales libres. La isquemia parece aumentar la producción de radicales libres,

particularmente durante la reperfusión, como se evidencia por la peroxidación de lípidos, la oxidación de proteínas, y el abatimiento de los antioxidantes glutatión peroxidasa y ascorbato. Las fuentes identificadas de producción de radicales libres durante periodos de isquemia/reperfusión incluyen: la mitocondria, la xantina deshidrogenasa endotelial, (la cual es convertida a xantina oxidasa productora de superóxido bajo condiciones de isquemia), los leucocitos marginados, los depósitos de hierro y sintasa de óxido nítrico [6, 17, 18, 19].

El estrés celular por radicales libres y la excitotoxicidad se amplifican entre sí. El daño a las defensas cerebrales contra radicales libres pueden también contribuir al aumento en vulnerabilidad a este tipo de ataque durante la isquemia. Los astrocitos parecen poseer mayores concentraciones de glutatión y mayor o igual actividad de catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, y glutatión reductasa que las neuronas. Lo anterior sugiere que los mecanismos para atrapar radicales libres de la glia pueden servir para favorecer la supervivencia neuronal [6].

Los radicales libres son producidos en las células durante el curso de reacciones de oxidación normales. La conversión de oxígeno a agua y ATP en la cadena de transporte de electrones resulta en la formación de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo(OH). El peróxido de hidrógeno no es un radical. Sin embargo, interacciones de (H_2O_2) y (O_2^-) con metales - particularmente hierro - resulta en la formación del radical (OH), que es un radical altamente reactivo y tóxico. De aquí que, la producción de radicales libres bajo condiciones normales, debe mantenerse estrechamente controlada ya que los radicales libres tienden a producir más radicales libres; la célula posee una batería de mecanismos de defensa altamente específicos, tanto enzimáticos como no enzimáticos, para atrapar radicales libres tan pronto como éstos aparecen [17, 19, 20].

Las enzimas especializadas, superóxido-dismutasas (*SOD*), son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar lugar a la síntesis de oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. En las células de los organismos eucarióticos existen dos enzimas. Una es citoplasmática y contiene un átomo de cobre y uno de zinc en su sitio activo. La otra es mitocondrial y posee manganeso en su sitio activo [6, 10, 21].

Otro grupo de enzimas especializadas son las *catalasas*. Estas participan en la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno para obtener dos moléculas de agua y una molécula de oxígeno. Las peroxidases catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones. En los mamíferos, la glutatión-peroxidasa (una enzima citoplasmática que contiene selenio) es la más importante [9, 19, 21].

Por otro lado, el radical hidroxilo es neutralizado por la vitamina E o alfa-tocoferol, que es un antioxidante excelente y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente efectiva. Otro atrapador endógeno es la melatonina [19].

Durante la anoxia/isquemia ocurre un doble riesgo. No solo la degradación del ATP lleva a la acumulación de xantina e hipoxantina, los sustratos para la síntesis de superóxidos, también ocurre un cambio de la enzima Xantina deshidrogenasa (XDH) a Xantina oxidasa (XO) como la enzima predominante de la producción de uratos. Esto se cree sea debido al aumento en el Ca^{2+} en la célula que activa la enzima calpaína que promueve la conversión de XDH a XO. XO usa O_2 como el aceptor de electrones y produce el radical O_2^- por catálisis de la reacción [10].

Los radicales superóxido pueden producir daño en parte por su unión al óxido nítrico (*NO*), con la formación del radical peroxinitrito que es altamente dañino [6, 18].

Oxido nítrico. El óxido nítrico (*NO*) es un gas que actúa como un potente vasodilatador y fue inicialmente identificado como el factor de relajación dependiente de endotelio. Todas las células en el cerebro pueden potencialmente producir *NO* el cual, a su vez, puede tener efectos notables en los vasos sanguíneos y en células vecinas. Las concentraciones de *NO* aumentan notablemente en el cerebro con isquemia; las evidencias sugieren que la modulación de la producción de *NO* puede, ya sea disminuir o empeorar de daño isquémico dependiendo de cuales células producen *NO* [6].

La enzima sintetasa del óxido nítrico (*NOS*) metaboliza L-arginina a *NO* y citrulina. Por lo menos se han identificado tres isoformas de *NOS* en el cerebro: la neuronal (*nNOS*), la derivada de las células del endotelio (*eNOS*), y una *NOS* inducible (*iNOS*). Está última puede ser inducida en una variedad de células incluyendo macrófagos, astrocitos y microglia [6, 22, 23].

Las recientes observaciones de que diferentes tipos de células localizadas dentro del cerebro producen óxido nítrico, han generado considerable interés acerca del papel del óxido nítrico en la fisiología normal y su relación con la fisiopatología de la isquemia cerebral [22, 23].

La *NOS* está presente en sólo un pequeño porcentaje de neuronas, pero el óxido nítrico liberado por estas neuronas puede ser un mediador importante del flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la actividad neuronal. Las observaciones de que la actividad de la sintetasa de óxido nítrico es aumentada por el incremento en el calcio intracelular y que los agonistas a NMDA causan la liberación de *NO*, sugiere que el óxido nítrico puede ser un contribuyente importante en la fisiopatología del sistema nervioso central durante la isquemia [23].

Los efectos de vasodilatación del óxido nítrico que aumentan el flujo sanguíneo cerebral podrían tener efectos benéficos durante la isquemia focal, especialmente en la zona de penumbra. Adicionalmente, el óxido nítrico inhibe la agregación de leucocitos y plaquetas y puede tener otros efectos benéficos. El óxido nítrico también puede regular negativamente el receptor NMDA [23].

Los efectos dañinos del óxido nítrico primeramente se relacionan con su habilidad para formar radicales libres altamente tóxicos. La reducción del óxido nítrico por el radical superóxido genera el radical libre peroxinitrito, que se caracteriza por su gran agresividad; mientras que la oxidación del óxido nítrico produce el ión nitrosonium que puede nitrosilar proteínas dando por resultado su disfunción como ocurre con los receptores a NMDA. No es aún claro si recomendar el aumento del óxido nítrico o su inhibición como una estrategia de tratamiento potencial en la isquemia focal cerebral. A este respecto, la localización del óxido nítrico en tiempo y espacio puede ser relevante porque el estado redox del tejido isquémico puede condicionar la utilidad de aumentar o inhibir el óxido nítrico, además que el estado redox puede cambiar en el transcurso del daño isquémico. Esta situación sugiere que la intervención farmacológica con relación a los efectos del óxido nítrico en la isquemia, no es fácil [18, 23].

1.6. Muerte celular programada

La muerte celular programada, también conocida como apoptosis, se presenta en el sistema nervioso durante el desarrollo. Se caracteriza por la segmentación del DNA y otros procesos autolíticos causantes de encogimiento nuclear, formación de cúmulos de cromatina y de burbujas en el citoplasma y, finalmente, la muerte celular. La apoptosis puede ser inducida como consecuencia de un período de isquemia. Esto puede ocurrir porque la magnitud del daño celular provocado es tal que activa los mecanismos del programa de suicidio celular [6, 23, 24, 25]

Durante la apoptosis, el núcleo celular es el primero en dañarse mientras que las membranas de la mitocondria y del citoplasma se conservan por más tiempo. Otra característica es que se requiere la síntesis de proteínas para completar el “suicidio” celular y la activación de endonucleasas que rompen en sitios intermedios a los nucleosomas, produciendo DNA con un aspecto característico de escalera al someterse a electroforesis en geles de agarosa. En los últimos cinco años se ha desarrollado una técnica histoquímica para detectar células que sufren esta forma de fragmentación de DNA; se le denomina TUNEL [6, 24, 25].

La biología molecular de la apoptosis es un campo que ha dado lugar a intensa investigación. Diversos genes controlan la apoptosis. Estos incluyen los que previenen de la muerte celular, como bcl-2 y bcl-xL. Existen otros que por el contrario promueven la muerte celular, como bax y bcl-xs cuya expresión da lugar a su vez a la producción de proteínas que promueven la sobrevivencia celular o a la producción de proteínas que se promueven a la muerte celular. Una característica interesante de la apoptosis es que la muerte celular no evoca respuestas inflamatorias con la consecuente invasión de leucocitos. Por el contrario; pareciera que las células son “engullidas” silenciosamente, probablemente por la microglia o los macrófagos sin daño tisular alrededor o inflamación [26].

Una vez que las células son dirigidas hacia la muerte, proteasas y endonucleasas específicas son activadas para llevar a cabo el programa de muerte. La familia de las proteasas ICE (enzima convertidora de interleucina -1β) está formada por 11 miembros divididos en 3 subfamilias, la subfamilia ICE, la subfamilia CPP32 y la sub-

familia Ich-1 recientemente conocidas como caspasas. Todas tienen en común cisteína y poseen una secuencia invariable de 5 aminoácidos en su sitio activo. La expresión de estas proteasas en diversas células puede causar apoptosis, la cual puede ser prevenida por inhibidores de proteasas o la introducción del gen protector bcl-2 [27, 28].

Muchos estudios recientes han sugerido que en parte la muerte celular que se presenta en la isquemia cerebral es debida a la activación de mecanismos de apoptosis. Mc Manus [27] mostró escalonamiento de DNA indicativo de apoptosis en el hipocampo de ratas que habían pasado por un período de isquemia global. Desde 1993, en muchos reportes - en los que se utilizan las mismas técnicas básicas de evaluación, se han mostrado evidencias de muerte celular con características de apoptosis en diversos sistemas incluyendo modelos de isquemia global o focal [6, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35].

Otros sistemas revelan ciertas relaciones entre los mecanismos básicos de apoptosis y el daño post-isquémico. Intermediarios reactivos derivados de oxígeno que se encuentran fuera de control en la fase de reperfusión, pareciera que están involucrados en la señalización durante la fase inicial de apoptosis [36].

La expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 fue analizada empleando métodos inmunohistoquímicos con anticuerpos policlonales específicos para cada proteína en el hipocampo de gerbos posterior a un período de 5 minutos de isquemia pasajera. Se analizaron secciones de cerebro de animales sacrificados a las 48, 72, 96 horas y 7 días posterior al daño. La intensidad de la expresión de Bax en las neuronas CA1 aumentó con el tiempo llegando a un máximo a las 72 horas. Por el contrario, no se detectó la presencia de Bcl-2 en las neuronas de CA1 en ninguno de los tiempos de evaluación [34].

Estudios recientes han descrito la fragmentación del DNA postisquémico en el hipocampo, en modelos experimentales de isquemia, como un fenómeno característico de la muerte neuronal tardía. Además estudios estructurales de los cambios morfológicos en las neuronas hipocampales de CA1 seguidos de un período de isquemia cerebral pasajera sugieren que la muerte neuronal tardía es diferente de la apoptosis típica. Por lo tanto, persiste la controversia acerca de si la muerte neuronal tardía es apoptosis o necrosis [6, 37].

Aunque el daño isquémico neuronal es clásicamente debido a la necrosis, hay

evidencia que sugieren que algo del daño seguido a la isquemia cerebral e infarto puede considerarse como apoptosis.

En ratas y gerbos que han pasado por un período de isquemia cerebral, existe la evidencia de DNA fragmentado en células necróticas así como en apoptóticas, ha surgido cierta controversia en cuanto a si la muerte celular por apoptosis ocurre posteriormente a un período de isquemia cerebral. Varias investigaciones han mostrado que tanto en modelos de isquemia cerebral como focal se produce escalonamiento del DNA. Esto sugiere que la fragmentación del DNA ocurre por acción de endonucleasas que cortan el DNA en fragmentos de tamaño específico; un hallazgo sugerente de apoptosis más que de necrosis [6].

Diversos estudios muestran que la isquemia induce la activación de genes asociados con apoptosis en otros sistemas. Aunque el papel de cualquier gen es especulativo, estos datos sugieren que los programas genéticos que probablemente mantienen normalmente la viabilidad de las células son interrumpidos por la isquemia y que programas que median la muerte celular por apoptosis pueden también ser activados por isquemia [20, 32, 35].

1.7. Vulnerabilidad neuronal ante la isquemia

Las características del daño neuronal provocado por un período de isquemia cerebral global aguda muestran diferencias, en función principalmente de la ubicación de las neuronas en estructuras cerebrales específicas, de la duración del episodio de isquemia y del tiempo transcurrido a partir de éste. Esta heterogeneidad del daño en función de la topografía y de la duración del episodio de isquemia se ha atribuido a un fenómeno de “vulnerabilidad selectiva” y la heterogeneidad del daño en función del transcurso del tiempo se ha tratado de explicar con base en un conjunto de fenómenos celulares designados como “fenómeno de maduración” del daño post-isquemia [38].

Estos fenómenos dan lugar a la complejidad de los cambios secuenciales de las neuronas consecutivos a un período de isquemia y que pueden evolucionar al daño neuronal irreversible, aunque también provee la oportunidad para el estudio de los mecanismos de la muerte celular por isquemia. En este sentido, Kirino [39] observó que

un período breve de isquemia (5 minutos) provocó daño neuronal y muerte selectivamente en las neuronas del hipocampo, en el subcampo CA1 hipocampal en gerbos, con una alta reproducibilidad topográfica y cronológica. De acuerdo con este trabajo, la región CA1 mostró una destrucción lenta y progresiva de sus neuronas piramidales que aumentó drásticamente a partir del cuarto día posterior a un episodio de isquemia provocado por la oclusión bilateral de la arteria carótida durante 5 minutos. Este fenómeno recibió el término de muerte neuronal tardía y se atribuyó a un “*fenómeno de maduración*” de los procesos celulares de daño con base en su patrón temporal característico [40].

Así, se han identificado células muy vulnerables a la isquemia, como las células piramidales de la región CA1 e hilus del hipocampo, células piramidales ubicadas en la capa 3 y 5 de la corteza cerebral, células de Purkinje del cerebelo; células medianamente vulnerables como las células de tamaño medio y pequeño del estriado, y células poco vulnerables como las células granulares del giro dentado y las neuronas de las capas 2 y 4 de la corteza cerebral [41].

La muerte neuronal tardía que ocurre luego de un período breve de isquemia (5 minutos) es una transformación celular inusual, ya que el reestablecimiento del flujo sanguíneo, el metabolismo energético y la actividad electrofisiológica no impiden la muerte neuronal tardía en las neuronas muy vulnerables. Así, en estas condiciones no se han aclarado cabalmente las causas por las cuales sucumben las neuronas del sector CA1 del hipocampo [40].

En el sector CA1, los fenómenos celulares indicadores de muerte celular tardía en las células piramidales se desarrollan lentamente. Los primeros signos de alteración en la estructura neuronal fina pueden observarse a las 24 horas a partir del episodio de isquemia. Estos hallazgos muestran que la vulnerabilidad hipocampal selectiva no es una vulnerabilidad regional sino celular; a saber, cada neurona tiene sus propiedades particulares y las más vulnerables son las células piramidales ubicadas en el sector CA1 [42].

Los fenómenos de muerte neuronal tardía en el hipocampo, en su mayor parte concluyen en los primeros 3 a 4 días post-isquemia. La gliosis y la reducción de volumen de células del sector CA1 continúan durante 3 a 4 días post-isquemia. La gliosis

y la reducción de volumen de células del sector CA1 continúan durante 3 a 6 meses después del episodio de isquemia. Durante este período las neuronas remanentes en CA1 gradualmente se reducen en número. Aún 6 meses después de la isquemia, las neuronas remanentes en el estrato piramidal aparecen frecuentemente obscurecidas en su citoplasma, aparentemente en un proceso de desintegración. Mas bien pareciera que las neuronas sobrevivientes en el campo CA1 luego de un episodio de isquemia, gradualmente degeneran y a la larga, esta región puede carecer de células piramidales [42]. Estas neuronas parecieran estar destinadas a morir como consecuencia de fenómenos celulares que ocurren “*en cascada*” luego de un episodio de isquemia. Sin embargo, también se ha observado que la mayoría de estas neuronas son salvables mediante el tratamiento adecuado iniciado tan pronto ocurre un daño isquémico [42].

El patrón de distribución de las neuronas del hipocampo más vulnerables a la isquemia esta restringido a los sectores CA1 Y CA4, aunque con la mayor magnitud en el sector CA1. Estudios neuronatómicos han revelado que el subcampo de CA1 es especialmente rico en receptores para aminoácidos excitadores (EAA) de la clase N-metil-D-aspartato (NMDA) y también tiene abundantes terminales glutametérgicas las cuales se originan de las fibras colaterales de Shaffer provenientes de las células piramidales del sector CA3. Estas características anatómicas en el hipocampo sustentan el riesgo potencial de la excitotoxicidad inducida por la isquemia cerebral y, en efecto, existen evidencias experimentales que sugieren que la muerte neuronal por isquemia en las células piramidales del sector CA1 es consecuencia de la excitotoxicidad inducida por glutamato [42]. Asimismo, estudios recientes mostraron que los depósitos de calcio del retículo endoplásmico son controlados por el receptor IP_3 -R. También se mostró que la densidad de dicho receptor es particularmente elevada en neuronas del sector CA1 mientras que la actividad de la bomba de calcio del retículo endoplásmico es baja. Estos hechos podrían tener importancia en determinadas situaciones patológicas como la isquemia, en las que el daño neuronal irreversible puede ser consecuencia de procesos celulares inducidos por el incremento anormal de Ca^{2+} intracelular [43].

Diversas investigaciones que se han realizado especialmente durante los últimos 30 años en el campo de las neurociencias, referente por una parte a los mecanismos

patológicos generados por situaciones agresivas y dañinas para la integridad del SNC (sistema nervioso central); así como a las posibilidades de recuperación morfológica y funcional de las diferentes estructuras nerviosas afectadas por este daño, han dado lugar entre otros aspectos importantes del conocimiento al concepto de neuroprotección. En este se incluyen procedimientos farmacológicos o no farmacológicos capaces de prevenir o reducir el daño resultante de la exposición de las células nerviosas que forman parte del SNC a situaciones tales como la isquemia, el trauma o la hemorragia; condiciones que en los seres humanos dan lugar de manera inmediata o en muy corto tiempo a lesiones neurológicas permanentes, de naturaleza y magnitud diversas. Así mismo, se ha considerado importante a la potencialidad de la neuroprotección como parte del manejo clínico-terapéutico de las enfermedades neurológicas crónico-degenerativas (enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntigton, entre otras) y de las alteraciones cerebrales asociadas al envejecimiento [3, 44, 45]

Conforme se han acumulado las evidencias en el sentido de que los procesos patológicos celulares que dan lugar al daño irreversible de estructuras subcelulares o a la activación de mecanismos celulares proapoptóticos conducentes todos ellos a la muerte de las neuronas, requieren de cierto tiempo para su culminación, se ha consolidado la idea de la existencia de una “ventana de oportunidad terapéutica” [46], de la mayor importancia para las posibilidades de éxito de los procedimientos de neuroprotección. En efecto la “ventana de oportunidad terapéutica” en procesos fisiopatológicos agudos, como la isquemia global o focal, el trauma o la hemorragia, es un período (usualmente unas cuantas horas) comprendido desde el inicio de la exposición de las estructuras del SNC a estas condiciones y al establecimiento del daño neuronal irreversible que antecede de manera inmediata a la muerte neuronal; e incluye el tiempo durante el cual se desencadenan y permanecen activos los diversos mecanismos de muerte neuronal. Cada uno de estos puede adquirir diferente relevancia por su naturaleza y por su curso temporal en función de su capacidad para dar lugar al daño neuronal inmediato (minutos a horas) mediato (horas a días) o tardío (días a semanas); así como en función de la posibilidad de ser contrarrestados mediante procedimientos neuroprotectores con la siguiente reducción del daño neuronal

correspondiente [7].

Desafortunadamente los resultados de los ensayos clínicos tendientes a probar la eficacia y la seguridad de fármacos neuroprotectores han mostrado en la gran mayoría de los casos una notable discrepancia con los resultados usualmente promisorios de los estudios preclínicos de los mismos fármacos. A este respecto, se ha señalado que los modelos experimentales de isquemia, trauma y otras enfermedades neurológicas que cursan con daño cerebral no reproducen cabalmente en el laboratorio las condiciones clínicas de los pacientes que podrían decidir, dado el caso, los fármacos neuroprotectores. Por otra parte, la administración del fármaco neuroprotector fuera de la ventana de oportunidad terapéutica, o en dosis y esquemas de tratamiento inadecuado para las condiciones de los seres humanos, diferentes de las de los animales de experimentación, parece influir en contra del éxito de la neuroprotección clínica. Sin embargo, una de las razones para la falla puede estar relacionada con el hecho de que todos esos estudios se han centrado en impedir o reducir solamente uno de los varios procesos celulares causantes del daño cerebral, dejando de lado otros procesos igual o mayormente importantes que pueden por si mismos producir la muerte neuronal. Esta posibilidad ha sido sugerida ante la evidencia de que luego de bloquear los mecanismos celulares de la excitotoxicidad, las neuronas mueren por apoptosis; lo mismo podría ocurrir si se bloquearan los mecanismos celulares de la muerte por apoptosis, dejando de lado el hecho de que las neuronas podrían morir por efecto de otros mecanismos de muerte celular [47]. Por tal motivo el consenso Internacional de Neuroprotección propuso que una droga neuroprotectora ideal debe demostrar su eficacia en 2 especies experimentales por lo menos, ser efectiva tanto en isquemia focal como isquemia global y que las evaluaciones preclínicas del fármaco deben incluir no sólo evaluaciones morfológicas en el corto plazo sino también evaluaciones funcionales realizadas a largo plazo [48].

Aquellos pacientes que se recuperan de una isquemia global muestran deficiencias neuropsicológicas que se manifiestan en amnesia anterograda o deficiencias en memoria semántica. Estos datos clínicos muestran claramente que las deficiencias neuropsicológicas posteriores a un proceso de isquemia cerebral llevan a consecuencias enormes tanto para el individuo afectado como para la sociedad. Antes de desarrollar estudios

clínicos para encontrar como pueden ser disminuidas estas deficiencias inducidas por un evento de isquemia es necesario examinar los procesos fisiopatológicos que llevan al daño isquémico y los alcances terapéuticos en estudios experimentales. De tal manera algunos críticos plantean la posibilidad de desarrollar estudios experimentales a futuro encaminados a proporcionar resultados de mayor relevancia para estudios clínicos donde se prueben nuevas estrategias terapéuticas. Uno de los aspectos que se ha mencionado es el desarrollo de evaluaciones funcionales a largo plazo adicionales a las evaluaciones morfológicas. Es decir, la aplicación de pruebas funcionales que nos permitan conocer el estado morfo-funcional final de las redes neuronales que integran el SNC, luego de un proceso de isquemia [49].

Dado que las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia cerebral global aguda, (hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado y cerebelo) participan de manera importante en la integración de las funciones cognoscitivas, diversas modalidades de aprendizaje y memoria han sido utilizadas como indicadores de normalidad o alteración de dichas funciones cognoscitivas. Adicionalmente, las características del aprendizaje y la memoria han sido utilizadas para identificar la lesión y/o alteración funcional de las estructuras cerebrales involucradas [50].

1.8. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje consiste en la adquisición de información acerca del medio ambiente interno y externo que produce modificaciones conductuales transitorias o permanentes, mientras que la memoria es el almacén de la información mantenida, y su existencia es mostrada por la persistencia de las modificaciones conductuales. Es generalmente aceptado que el proceso de memoria es constituido de varias fases secuenciales: adquisición, consolidación, almacenado y recuperación [51].

La actividad dependiente de la entrada de calcio en las neuronas puede iniciar una forma de plasticidad sináptica llamada potenciación de largo plazo (LTP). Este fenómeno es considerado por muchos como un posible mecanismo que subyace al aprendizaje y la memoria. Estos cambios de ganancia sináptica afectan la comunicación neural y pueden ser la base de los cambios conductuales que se presentan en

el aprendizaje [52]. Los receptores NMDA se requieren para la inducción del LTP, mientras que en la expresión se requieren receptores AMPA. De igual manera, los receptores GABA parecen participar en los mecanismos de LTP, debido a que la administración de antagonistas GABAérgicos producen una facilitación de la inducción del LTP. Otros sistemas de neurotransmisores no han sido relacionados con el aprendizaje espacial *per se*, sino con procesos de atención como la actividad colinérgica y bien con procesos de motivación en los que participa la actividad dopaminérgica [50].

Se sabe que un gran porcentaje de pacientes que sobreviven a un paro cardíaco han presentado un síndrome amnésico bastante circunscrito, caracterizado por daño en el aprendizaje y la memoria de eventos ocurridos después del daño. Así mismo, en estudios post-mortem de pacientes que tuvieron un paro cardíaco mostraron un daño severo en el hipocampo en particular en la región CA1 [53].

Modelos de isquemia cerebral global han revelado que las células piramidales de la región CA1 del hipocampo son selectivamente vulnerables a las deficiencias de energía y oxígeno. Además lesiones del hipocampo dañan la habilidad de la rata para resolver tareas de aprendizaje espacial [54] que impliquen memoria de referencia y trabajo espaciales [55].

En la memoria de referencia espacial que es adquirida paulatinamente como consecuencia de múltiples ensayos y es aquella donde la información visoespacial permanece estable a través de los ensayos. Es un tipo de memoria que se basa en la expectativa o referencia. La memoria de referencia es un sistema que se apoya en la información previamente almacenada, puede emplearse como un conocimiento general del mundo y tiende a ser más importante después de que la tarea ya se aprendió y cuando las situaciones ya no varían o son familiares. Este tipo de memoria está organizado en forma de mapas o esquemas cognoscitivos, es decir como un conjunto de referencias organizadas [56].

Aunque el laberinto radial y el laberinto acuático de Morris tradicionalmente han sido usados para medir deficiencias espaciales asociadas con el daño hipocámpal, el desarrollo en estos laberintos puede ser alterado por el daño en el caudado-putamen y la corteza [57].

La memoria de referencia espacial puede ser evaluada mediante el laberinto acuáti-

co de Morris. El laberinto acuático de Morris se desarrolló para evaluar la habilidad de las ratas para aprender, recordar e ir a un lugar en el espacio definido solamente por su posición relativa a señales espaciales fuera del laberinto [49, 58] y consiste en una tina llena con agua opaca donde el animal es entrenado para nadar a una plataforma sumergida que esta localizada por debajo de la superficie del agua. La temperatura es usualmente mantenida a temperatura ambiente, esto es aversivo para el animal, por lo que los animales son motivados para encontrar la plataforma y escapar del agua. Debido a que la plataforma no está visible el animal depende de su memoria espacial y el uso de señales espaciales fuera del laberinto que le permitan localizar la plataforma [57].

Tradicionalmente, la latencia para localizar la plataforma y la distancia de la ruta recorrida han sido usados como indicios de aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris, sin embargo, la naturaleza imprecisa de estas mediciones han orillado a desarrollar métodos adicionales para medir la estrategia de resolución del laberinto. El uso de la estrategia de lugar (adquisición del conocimiento de la localización de la plataforma sumergida basado en señales visoespaciales) para resolver el laberinto se infiere si la rata gasta más tiempo en el cuadrante que previamente contuvo la plataforma o cruza más veces por el lugar donde se encontraba la plataforma en comparación con las posiciones equivalentes en los tres cuadrantes [49, 58]. Se cree que el hipocampo participa en la formación de representaciones mentales de la información espacial (mapa cognoscitivo) [59]. La teoría de O'Keefe y Nadel sostiene que el hipocampo almacena información espacial en forma de mapas cognoscitivos aloécnicos (o exocéntricos) [59]; esto debido a que los estudios de lesión del hipocampo y todas sus estructuras asociadas (fórnix, septum, corteza entorrinal, subículo y post-subículo) inducen deficiencias permanentes en una variedad de habilidades espaciales [60]. Además O'Keefe y Nadel sugieren que el hipocampo derecho esté involucrado en el mapeo de información espacial aloécnica y el hipocampo izquierdo esté principalmente implicado en mapeo lingüístico [59]. Esta función de mapeo del hipocampo puede depender de manera crítica de múltiples conexiones recíprocas con otras áreas corticales que son importantes en el procesamiento espacial, como la corteza parietal [59].

Así mismo, estudios en humanos con lesión en la formación hipocampal, mostraron deficiencias de memoria espacial, en tareas como la memoria de trabajo espacial entre otras. El deterioro encontrado en la memoria de trabajo espacial fue menor lo que sugiere que el hipocampo no es crucial para el procesamiento de este tipo de información [59]. La memoria de trabajo según Baddeley se define como un sistema de información mantenida y manipulada temporalmente (desde segundos hasta pocos minutos por ser un tipo de memoria de corto plazo) [61]. En tareas de memoria de trabajo la información acerca de la disposición espacial puede ser mantenida activa durante breves periodos de tiempo [59]. Experimentos de imagen funcional en humanos sugieren que las porciones dorsolateral y ventrolateral de la corteza prefrontal contribuyen tanto a la memoria de trabajo espacial como no espacial. Sin embargo, experimentos con animales sugieren que la corteza prefrontal dorsal puede estar relacionada de manera más estrecha a la memoria de trabajo espacial mientras que la corteza prefrontal ventral puede estar más relacionada con memoria de trabajo para objetos [62]. De acuerdo a estudios neuroanatómicos la corteza prefrontal medial de la rata es considerada como el área homóloga a la corteza prefrontal dorsolateral del primate; en ambas especies esta área recibe proyecciones masivas de la porción medial del núcleo dorsomedial del tálamo [63]. Por otro lado existen evidencias de que el campo CA1 y el subículo de la formación hipocampal envían proyecciones directas hacia la corteza prefrontal medial ipsilateral en la rata [64], de forma que la corteza prefrontal misma tiene acceso a información espacial [65]. Así mismo aferentes glutamatergicas, dopaminérgicas, y colinérgicas a la corteza prefrontal regulan la memoria de trabajo espacial en la rata [50]. La memoria de trabajo espacial puede ser evaluada en el laberinto radial de 8 brazos (laberinto de Olton). En el laberinto radial, los brazos se proyectan fuera de una plataforma central. Al final de cada uno de los brazos contiene pequeñas cantidades de comida que sirven de recompensa para el animal. Los animales son restringidos de comida, con la finalidad de motivarlos a que realicen una búsqueda de comida de manera más eficiente. La estrategia óptima es visitar cada brazo una vez antes de retornar a cualquier brazo previamente visitado. Así, para desarrollar una tarea exitosa, los animales deben recordar donde permanece la comida disponible. En otras palabras, el animal requiere tanto la memoria de

referencia como la memoria de trabajo. La memoria de referencia contiene memorias estables acerca de la tarea, por ejemplo que la comida se encuentra al final de cada brazo. La memoria de trabajo contiene información de corto plazo, donde el animal debe recordar que brazos han sido o no visitados [57].

2

Antecedentes

Debido a la naturaleza de la lesión cerebral resultado de la hipoxia y anoxia, especialmente cuando es seguida por reoxigenación, es importante limitar el tamaño de la lesión inicial cuando ocurre un accidente cerebrovascular. Para alcanzar este objetivo, una serie de procedimientos han sido examinados como tratamientos paliativos. Muchos de éstos procedimientos incluyeron el uso de agentes farmacológicos; por ejemplo, drogas antiexcitotóxicas [66, 67], antagonistas a calcio [68, 69] agonistas a serotonina [70, 71], agonistas de adenosine [72, 73] y antioxidantes [74, 75]. En general, estas aproximaciones se han enfrentado a resultados variables y en algunos casos el daño cerebral post-isquémico fue mayor empleando alguna propuesta farmacológica [76].

A la melatonina se le atribuye un interés particular para el uso en daño cerebral por su facilidad en atravesar la barrera hematoencefálica [77], su elevada concentración de manera normal en el líquido cefalorraquídeo [78, 79], la ubicuidad de sus acciones antioxidantes [80, 81, 82], su alta eficacia como un antioxidante [83, 84, 85] y como agente neuroprotector en general [17, 86, 87], y su virtual ausencia de toxicidad [88, 89, 90]. Además la melatonina ha sido exitosamente empleada en pacientes para reducir el daño oxidativo por radicales libres [91, 92].

A final de la década de los 70's empezaron a surgir publicaciones sugiriendo que los radicales libres, especialmente aquellos derivados del oxígeno, destacan por su participación en el daño neuronal asociado con isquemia acompañada por hipoxia/anoxia de los tejidos y la subsiguiente reperusión caracterizada por la reoxigenación de los

tejidos [93, 94]. Desde entonces, no sólo los derivados del oxígeno [95, 96, 97] han sido implicados en la destrucción molecular de neuronas y glia durante el daño por I/R, adicionalmente, moléculas derivadas del nitrógeno han mostrado también ser tóxicas en el tejido cerebral [98, 99, 100]. Los radicales libres y reactivos relacionados son generados en el SNC, como en otros tejidos, por diversas vías. Si estas moléculas no son neutralizadas, son capaces de mutilar moléculas vecinas de manera indiscriminada llevando eventualmente a la disfunción de organelos celulares y de la propia célula pudiendo desencadenar la pérdida celular vía apoptosis o necrosis. Mediante métodos de imagen se ha logrado detectar la generación de radicales libres en el cerebro de animales que experimentaron un episodio de isquemia [101].

Dada la evidencia irrefutable del papel principal de los radicales libres tóxicos y reactivos relacionados, generados durante la isquemia transitoria y reperfusión, en la destrucción neuronal, la aplicación de moléculas que neutralizan estos agentes es uno de los objetivos de investigación en este campo. En la búsqueda de moléculas neutralizantes de radicales, se han usado para combatir la pérdida neuronal, tanto moléculas sintéticas [66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 102] así como antioxidantes que ocurren de manera natural [75, 103, 104] con grados variables de éxito. La eficacia de cualquier agente para reducir el daño consecuencia normal de la I/R depende de un número de factores; por ejemplo, la actividad depuradora (secuestradora) intrínseca por el agente, su habilidad para influir otros procesos antioxidantes dentro de las células, su capacidad para reducir la generación de radicales libres, su distribución dentro de la célula, y su habilidad para cruzar la barrera hematoencefálica. En general, estos estudios han confirmado la utilidad del uso de atrapadores de radicales libres en la reducción del daño neuronal, con tasas de éxito altamente variables, en eventos cerebrales de isquemia, con posterior reperfusión.

Considerando estos hallazgos, fue lógico probar melatonina con respecto a su habilidad para intervenir en procesos patológicos asociados con daño por I/R. La melatonina pareció ser una molécula particularmente apropiada para tales estudios ya que cruza la barrera hematoencefálica, y ha mostrado que protege al cerebro de la toxicidad por oxígeno [105], como atrapador de radicales libres [81, 82, 106, 107] como antioxidante indirecto [80, 108, 109] y se ha encontrado su utilidad en diferen-

tes modelos de degeneración neuronal donde los radicales libres son los componentes principales del daño neurológico resultante [110, 111, 112]. Los experimentos que se mencionan muestran que la melatonina es, de hecho, una molécula con numerosos efectos benéficos en la reducción de daño neuronal por I/R.

Poco después de que las propiedades antioxidantes de la melatonina fueron descubiertas [113, 114] y dada la facilidad con la que penetra al cerebro, los investigadores pronto empezaron a probar si esta molécula podría limitar el daño cerebral bajo condiciones donde el flujo sanguíneo al órgano fuera temporalmente interrumpido y posteriormente reestablecido. La mayoría de estos estudios han sido conducidos *in vivo* en diversas especies de mamíferos y numerosos puntos terminales han sido evaluados. Resulta interesante, que los estudios iniciales, más que probar si la melatonina podría ser usada como un agente farmacológico para reducir el daño por I/R en el cerebro, determinaron si la melatonina endógenamente sintetizada, en realidad contribuía a la protección cerebral durante la anoxia y reoxigenación. En las primeras investigaciones, seguidas a oclusión bilateral de las carótidas por una hora, el volumen de infarto fue marcadamente mayor en el cerebro de ratas pinealectomizadas que en aquellas que tienen la pineal intacta [115]. La *pinelectomia* es un procedimiento quirúrgico comúnmente usado para reducir los niveles fisiológicos de la melatonina. Adicionalmente a un volumen de infarto mayor, las ratas relativamente deficientes en melatonina debido a la remoción quirúrgica de la glándula pineal, presentaron un índice de apoptosis mayor y una menor cantidad de neuronas sobrevivientes, resultados obtenidos 4 a 6 horas después de establecida la reperusión. En un segundo reporte, el mismo grupo confirmó sus hallazgos de que la pinealectomia aumenta el tamaño del infarto cerebral después de isquemia focal y adicionalmente se reportó un daño al DNA mayor en ratas pinealectomizadas que en animales con la pineal intacta sometidas al mismo procedimiento de I/R [116]. En este estudio, ellos también inyectaron dosis farmacológicas de melatonina (4x 2.5mg/kg antes del establecimiento de la isquemia) y encontraron una disminución del daño cerebral inducido por la anoxia y reoxigenación.

La relevancia de los niveles fisiológicos de melatonina en la inhibición del daño cerebral debido al fenómeno de I/R fue confirmado por Kilic et al [117]. Nuevamente,

tanto las ratas pinealectomizadas y ratas control fueron sometidas a isquemia cerebral focal reversible de 120 min. De nuevo, el volumen del infarto fue mayor en el cerebro de las ratas pinealectomizadas y la administración de melatonina (4mg/kg antes de la isquemia y reperfusión) redujo significativamente el tamaño del infarto. La pinealectomía también tuvo un impacto negativo en los déficits neurológicos, evaluados conductualmente, mientras que éstos fueron mejorados en las ratas que se les había administrado melatonina. Dado que en ambos estudios que emplearon pinealectomía se encontró que empeoraba el desempeño después de I/R, ambos grupos de investigadores concluyeron que los niveles fisiológicos de melatonina proveen de algún tipo de protección neuronal durante la isquemia focal. Estos hallazgos tienen implicaciones interesantes a la luz del hecho de que los niveles endógenos de melatonina están disminuidos en muchos individuos viejos; [118] así, los individuos envejecidos pueden incrementar su vulnerabilidad a los efectos dañinos por isquemia focal puesto que ha perdido de manera natural la melatonina, un protector endógeno contra el daño [119].

En numerosos estudios se han empleado modelos experimentales similares de isquemia focal y una amplia variedad de objetivos de evaluación final para determinar que tan bien protege la melatonina contra el daño que normalmente sigue a periodos temporales de interrupción de flujo sanguíneo y reperfusión. Cho y colaboradores [120] específicamente examinaron las neuronas hipocámpales de CA1 después de 10, 20 o 30 minutos de isquemia cerebral transitoria y siete días de reperfusión. La densidad neuronal del cuerno de Ammon, se vio disminuida en ratas que padecieron la I/R solamente, sin embargo en ratas inyectadas con 10 mg/kg de melatonina el número de neuronas en el hipocampo fue significativamente mayor. Administrada la melatonina con mucha anticipación al episodio de isquemia o mucho tiempo después del inicio de la reperfusión fue, sin embargo, ineficaz en la prevención de la pérdida de neuronas de CA1.

Aunque los resultados de los reportes antes citados fueron consistentes con los efectos protectores de melatonina relacionándolos con sus propiedades antioxidantes, no hubo mediciones de una reducción de radicales libres en el cerebro de los animales tratados con melatonina (aunque en todos los casos el daño por radicales libres se vio disminuido). Esta pregunta fue contestada en una publicación por Li et al [121]

que uso *in vivo* microdiálisis y trampas de salicilato para estimar la generación de $OH\cdot$ durante I/R en el cerebro de ratas con o sin la administración de melatonina. En las ratas no tratadas con melatonina, el ácido 2, 3, dihidrobenzoico (*DHBA*), un producto resultante de la reacción de salicilato con $OH\cdot$, aumentó su concentración en el microdializado colectado del cerebro de rata isquémico y reperfundido; contrariamente, si a los animales se les administra 4mg/kg de melatonina previo a la inducción de la isquemia, las concentraciones de *DHBA* en los microdializados fueron significativamente menores, así se documentó una disminución en los niveles *in vivo* del OH altamente tóxico. Este estudio proporcionó fuertes evidencias de que la melatonina entra a el cerebro en cantidad suficiente para neutralizar radicales libres de tal modo que reduce el daño normalmente asociado con la I/R. Esta evidencia no excluye otras acciones de la melatonina que pueden también contribuir a su habilidad para disminuir la mutilación oxidativa de moléculas esenciales.

Este mismo grupo fue el primero en examinar la influencia de la melatonina en dos protoncogenes, es decir bcl-2 y bax, involucrados en apoptosis en células cerebrales que experimentan hipoxia/anoxia y reoxigenación.

Las ratas fueron sometidas a oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) durante 60 minutos seguida por 24 horas de reperfusión; los grupos de ratas recibieron 0, 2.5, 5 o 10 *mg/kg* de melatonina 15 minutos previos al episodio de MCAO y 6 y 12 horas seguido de isquemia. Bcl-2, el cual promueve supervivencia celular, se encontró que estaba regulado hacia arriba en el área de penumbra de la lesión como se analizó en un ensayo ciego individual en el grupo de animales tratados; los niveles de bax sin embargo no fueron diferentes entre los cuatro grupos. El tamaño del infarto fue también determinado en laminillas teñidas con violeta de cresillo usando un analizador de imágenes y como se observó en estudios previos, el tamaño del infarto fue menor en los cerebros de las ratas tratadas con melatonina. Finalmente, se reportó que la melatonina mejora la apariencia histopatológica de lesiones cerebrales resultado de I/R. No hubo aparentemente una relación dosis respuesta para las tres dosis de melatonina que fueron empleadas. Considerando los cambios en los niveles de bcl-2, la razón bcl-2 y bax se aumentó, sugiriendo que un mecanismo potencial para las acciones neuroprotectoras de la melatonina en los cerebros I/R es la inhibición de

la apoptosis celular. La habilidad de la melatonina para reducir la apoptosis es un hallazgo común en muchas células no cancerosas [122, 123]. Esto puede relacionarse con la habilidad de la melatonina para destoxificar los radicales libres y reactantes relacionados ya que estas especies químicas promueven procesos apoptóticos [124].

Un estudio diseñado para definir acciones protectoras adicionales de la melatonina contra el daño neuronal por I/R fue recientemente llevado a cabo por Sinha y colaboradores [125]. Ratas Wistar sometidas a una MCAO de dos horas fueron tratadas varias veces con 20 *mg/kg* de melatonina o vehículo. A los 30 minutos de la reperfusión, usando imágenes de resonancia magnética, se determinó que el tamaño de la lesión en el cerebro de las ratas tratadas con melatonina fue menor a la mitad de los animales inyectados con vehículo. Usando una escala neurológica de 6 puntos diseñada por Tatlisumak y colaboradores [126] también estimaron que las ratas con I/R que recibieron melatonina exhibieron deficiencias neurológicas significativamente menores. Finalmente, la melatonina redujo los niveles de lípidos oxidados, evaluados por la medición de la malondialdehído y restableció los niveles del antioxidante intracelular, glutatión, en el cerebro de ratas con I/R. Así, como los autores previos, este grupo considera que las acciones protectoras de la melatonina contra el daño por I/R, proceso que se caracteriza por generar radicales libres de forma copiosa, probablemente esté relacionada a sus actividades eficientes de atrapador de forma directa o indirecta.

En los últimos años, la frecuencia de artículos que documentan las acciones protectoras de la melatonina en I/R cerebral ha aumentado y el número de parámetros usados para documentar sus efectos benéficos se ha expandido. En una serie de tres artículos, Pei y colaboradores [127, 128, 129] documentaron la protección morfológica producida por melatonina en ratas con daño por I/R usando un rango de dosis de melatonina (1.5-50 *mg/kg*). Nuevamente, el volumen de infarto fue menor en los animales tratados con melatonina aunque no fue aparente una relación dosis-respuesta; adicionalmente, los autores no reportaron respuesta hemodinámica negativa por la melatonina. La ausencia de una relación dosis-respuesta cuando las dosis de melatonina variaron en un rango de 1.5 a 50 *mg/kg* hace suponer que la protección máxima contra I/R cerebral fue alcanzada con la dosis mínima de melatonina probada, esto

es, 1.5 mg/kg. En un estudio más reciente [129] ellos también reportaron que el tratamiento con melatonina redujo la concentración de *NO*, en las regiones cerebrales lesionadas. El *NO* en altas concentraciones se cree que contribuye ampliamente al daño neurológico [130], quizá debido al hecho de que se acopla con el Ion superóxido para generar peroxinitrito, un radical libre altamente reactivo. Debido a estos hallazgos, así como los resultados de trabajos previos, Pei y colaboradores [129] sugieren el uso de melatonina en un ensayo clínico en pacientes humanos con isquemia focal.

La tinción doble fluorescente en combinación con microscopia confocal fueron usados para investigar la habilidad de la melatonina para influir en la frecuencia de rompimiento de hebras de DNA neuronal inducido por isquemia en ratas sujetas a MCAO [131]. Nuevamente, en este estudio se mostró que la administración de melatonina redujo significativamente el volumen de infarto e incrementó la viabilidad celular. Adicionalmente, la expresión aumentada de *bcl-2* así como la expresión del RNAm del factor ERCC6 en el área de penumbra de la lesión cerebral; la desregulación de este gen es importante para la reparación. La conclusión de este grupo fue que la melatonina no sólo reduce el rompimiento de hebras sencillas o dobles de DNA neuronal inducido por I/R, sino también modula la reparación endógena de DNA, lo cual se adiciona a los efectos benéficos de la melatonina en isquemia focal.

En nuestro laboratorio se han investigado los efectos protectores de la melatonina contra la destrucción neuronal en un modelo de isquemia cerebral global aguda en gatos inducida por paro cardiorrespiratorio de 15 a 19 *min* de duración [132]. En los siete días siguientes al episodio de isquemia los animales fueron evaluados en su deficiencia neurológica y en el octavo día los cerebros fueron colectados para evaluación histológica. La melatonina (10 *mg/kg*) fue administrada por infusión intravenosa continua por 6 horas iniciando al final de la isquemia global. Los gatos que recibieron melatonina exhibieron una mejoría neurológica, en relación a los animales tratados con vehículo, en cada día post-isquemia. El tratamiento con melatonina, mejoró ampliamente el número de neuronas piramidales sobrevivientes en el hipocampo a ocho días después de la anoxia neuronal.

Así como los estudios resumidos anteriormente, existen otros que han documentado las acciones protectoras de la melatonina en los tejidos neuronales dañados.

3

Planteamiento del Problema

Se ha demostrado que la melatonina tiene efectos neuroprotectores a corto plazo sin embargo sus efectos en el largo plazo se desconocen.

4

Hipótesis

La melatonina reduce las alteraciones de la memoria y del aprendizaje, así como la despoblación neuronal del cuerno de Ammon del hipocampo, inducidas por la isquemia cerebral global aguda (ICGA) en rata y evaluadas a los 90 días después del episodio de isquemia.

Objetivos

5.1. Objetivo General

Medir el efecto neuroprotector de la melatonina 90 días de un episodio de isquemia cerebral global aguda utilizando indicadores funcionales del aprendizaje y memoria, así como la evaluación de la población neuronal del cuerno de Ammón del hipocampo.

5.2. Objetivos Específicos

- Mediante pruebas de memoria de referencia y memoria de trabajo espacial, indicadores funcionales del aprendizaje y la memoria, evaluar el efecto neuroprotector de la melatonina 90 días después de un período de 15 minutos de ICGA inducido en ratas por la técnica de “oclusión de los cuatro vasos”.
- Evaluar el efecto neuroprotector de la melatonina en el hipocampo mediante el análisis de las poblaciones neuronales de las regiones *CA1*, *CA2*, *CA3* y la zona hilar de dicha estructura cerebral.

6

Material y Métodos

6.1. Métodos

Se utilizaron 32 ratas macho adultas jóvenes, de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de 200–300 g, de 6 semanas de edad aproximadamente al inicio del experimento, alojadas en grupos de 5 por caja, alimentadas *acl libitum* y conservadas en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ C$) e iluminación (ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad) que fueron asignadas al azar a cualquiera de los siguientes grupos:

- Grupo I (INTACTO): Se asignaron 8 animales que se mantuvieron en las condiciones antes mencionadas.
- Grupo II (CONTROL): Se asignaron 8 animales que se sometieron exclusivamente a la oclusión permanente de las arterias vertebrales siguiendo el procedimiento descrito en el modelo de isquemia cerebral global aguda (ICGA) en ratas por “oclusión de los cuatro vasos” (Ver sección 6.2), sin interrumpir el flujo sanguíneo de las arterias carótidas.
- Grupo III (ISQ+VEH): Se asignaron 8 animales a los que se provocó un episodio de ICGA mediante el modelo de “oclusión de los cuatro vasos” (Ver sección 6.2) (oclusión permanente de las arterias vertebrales y 48 h después oclusión transitoria de las arterias carótidas durante 15 min) y se administró solución vehículo (etanol 10 % en solución de NaCl 0.9 %) *iv*, (3 ml/kg/h) en bolo, y

30 *min* después se continuo la administración de vehículo en infusión continua intravenosa (3 ml/kg/h), durante las 5 *h* siguientes al episodio de isquemia, mediante el uso de una bomba de infusión continua (RD scientific model 100).

- Grupo IV (ISQ+MEL): Se asignaron 8 animales y a cada uno de ellos se provocó un episodio de ICGA mediante el modelo de “oclusión de los cuatro vasos” (Ver sección 6.2) y se administró melatonina (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) a cada rata 10 mg/kg disuelta en vehículo, (3 ml/kg/*iv*) en bolo y 30 *min* después melatonina (10 mg/kg/h) disuelta en vehículo en infusión continua intravenosa (3 ml/kg/h) mediante el uso de una bomba de infusión continua (RD scientific model 100) durante las 5 *h* siguientes al episodio de isquemia.

6.2. Modelo de isquemia cerebral global aguda mediante la oclusión de los cuatro vasos

El episodio de ICGA fue provocado siguiendo el procedimiento descrito previamente por otros autores [133, 134, 135]. Bajo anestesia con xilacina (2.5 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg) se practicó una incisión en la piel de la nuca y se separaron los músculos por disección en la línea media hasta lograr el acceso a las primeras vértebras cervicales. La arteria vertebral se localizó en cada lado, entre la primera y segunda vértebra y fue cauterizada luego de su disección, con lo que quedó ocluida permanentemente. Se suturó la herida. A través de un acceso en la parte ventral del cuello, se localizaron las arterias carótidas comunes, se disecaron y se dejaron referidas mediante hilos de seda para su acceso 48 *h* después. En los animales que recibieron vehículo o tratamiento por vía intravenosa se implantó una cánula endovenosa en la vena yugular derecha. Se suturó la herida y se permitió la recuperación total del animal. Dos días después, bajo anestesia ligera con éter, se abrió la incisión que permite el acceso a las carótidas, se separó del tejido adyacente y se permitió que el animal se recuperara de la anestesia. Cuando la rata inició esta recuperación, se ocluyeron ambas carótidas en forma simultánea durante 15 *min* usando clips microvasculares, verificando bajo microscopio que el flujo quedó suspendido. La rata perdió el estado

de conciencia, es decir, no recuperó la respuesta de enderezamiento. Al cabo de este período se quitaron los clips que ocluían el flujo y se verificó que éste se reiniciara. El criterio de inclusión en el estudio que se aplicó a los animales experimentales es que la rata debió permanecer inconsciente al menos 20 *min* luego de restituirse el flujo. Se suturó la herida y se permitió la recuperación total del animal. Este modelo ha sido validado en el laboratorio y se ha obtenido un grado de despoblación neuronal severa en el hipocampo cuando se cumplen los criterios de inclusión.

Noventa días después del episodio de isquemia, cada uno de los animales de los diferentes grupos fue sometido a las siguientes evaluaciones conductuales:

6.3. Memoria de referencia espacial

Para evaluar la memoria de referencia espacial se utilizó el laberinto acuático de Morris [136], para lo cual se empleó una tina circular de 140 *cm* de diámetro y 45 *cm* de profundidad que se llenó con agua teñida de azul. Dentro de la tina se colocó una plataforma de vidrio de 15 x 15 x 42 *cm* cuya superficie quedó de 3 *cm* por abajo del nivel del agua. Cada rata fue sometida a dos ensayos diarios durante 7 días. Al octavo día se realizó una prueba de transferencia. La rata se introdujo de cara a la pared de la tina y nadó hasta localizar la plataforma hundida o hasta que transcurrieron 60 *s* luego de los cuales la rata fue colocada sobre la plataforma donde se le permitió permanecer por un período de 15 *s*. Al término del ensayo la rata fue retirada de la plataforma y se colocó en su caja de mantenimiento por 20 *min* antes del segundo ensayo. El desempeño de la rata en el laberinto de Morris se midió a través de los siguientes parámetros: latencia de escape (tiempo en segundos que transcurre desde que el animal es colocado en el agua hasta que logra llegar a la plataforma) y distancia del recorrido (distancia en metros desde que el animal es colocado en el agua hasta que logra llegar a la plataforma), además se trazaron las rutas de nado de los animales para observar el despliegue de las estrategias de búsqueda. La prueba de transferencia consistió en eliminar la plataforma del sitio donde había estado colocada los 7 días previos y se permitió el nado del animal en la búsqueda de la plataforma por un tiempo de 30 *s*. Para el análisis de la prueba

de transferencia la tina se dividió de manera imaginaria en cuatro cuadrantes y se calculó el porcentaje de tiempo de permanencia de los animales en cada uno de los cuadrantes, así mismo, se contó el número de veces que la rata cruzó por cada una de las plataformas colocadas de manera imaginaria en cada uno de los cuadrantes los cuales se encontraban a la misma altura que la plataforma original.

Se realizaron comparaciones intragrupalas e intergrupales [137]

6.3.1. Tratamiento estadístico

Análisis intragrupalas

- Análisis de varianza no paramétrico de Friedman y prueba post-hoc de Wilcoxon (pares igualados/rangos señalados) para las latencias de escape promedio/día.

Análisis intergrupales

- Prueba de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc U de Mann-Whitney, para las latencias de escape promedio/día.
- Anova de medidas repetidas y prueba post-hoc de Tuckey para la distancia total recorrida, número de cruces por sitios de la plataforma y el porcentaje de tiempo por cuadrante.

6.4. Memoria de trabajo espacial

Para evaluar la memoria de trabajo espacial se utilizó el laberinto radial de Olton [138]. Este laberinto está constituido por una plataforma central de 40 *cm* de diámetro de la que se derivan 8 brazos de 60 *cm* de longitud, 10 *cm* de ancho y 5 *cm* de alto. Al final de cada brazo se encuentra un depósito de alimento. El laberinto está elevado a 60 *cm* del piso y está fabricado en acrílico color blanco. El laberinto se colocó en una habitación que proporcionó diversas señales visuales. Tres días previos y durante toda la prueba se redujo el 20% del alimento diario de todos los animales. Durante los tres días previos a los ensayos se colocó al animal en el laberinto para que se habituara con

este, se colocó alimento en los depósitos localizados al final de cada brazo y en diversas regiones del laberinto, se les mantuvo por un período de 10 minutos. Posteriormente se realizaron 10 ensayos (un ensayo diario), cada ensayo consistió en colocar a la rata en el centro del laberinto y se le permitió el libre acceso a los 8 brazos, a los que se les colocó alimento al final de cada uno de ellos. La estancia de la rata en el laberinto fue hasta que comió todos los fragmentos de comida colocados al final de cada brazo o de 10 minutos como máximo y su desempeño en el laberinto radial se midió a través del número de errores (número de veces que el animal entra a brazos previamente visitados) promedio durante los 10 días de prueba.

6.4.1. Tratamiento estadístico

- Anova de medidas repetidas y prueba post-hoc de Tuckey para los errores promedio ejecución de los 10 días de prueba.

6.5. Evaluación de la población neuronal del hipocampo

Al término de las evaluaciones conductuales efectuadas después del episodio de isquemia, se analizaron las poblaciones del hipocampo. Bajo anestesia general, se perfundió a los animales por vía intracardíaca con 100 *ml* de solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) seguida de 100 *ml* de solución fijadora compuesta de formaldehído al 4% en la solución amortiguadora de fosfatos. Ambas soluciones fueron perfundidas a una presión de 120 *cm* de agua [139]. Los cerebros fueron extraídos inmediatamente y post-fijados por inmersión en formaldehído al 4% amortiguado por un mínimo de 24 *h*.

Los análisis de las poblaciones neuronales del cuerno de Ammon del hipocampo, fueron realizados a partir del procesamiento histológico de bloques de tejidos, el cual se detalla a continuación: una vez extraído el cerebro del cráneo de la rata, se realizaron cortes coronales que comprendían al hipocampo. La porción obtenida (2 *mm* de grosor) fue sometida a un proceso de deshidratación y finalmente incluida en para-

fina. Se obtuvieron cortes de $10\ \mu\text{m}$ que fueron teñidos empleando violeta de cresilo al 0.5%, pH 3.9 [140]. De cada cerebro se tomaron 10 cortes de hipocampo dorsal (1 cada $100\ \mu\text{m}$) localizados entre $3.0\ \text{mm}$ a $5.0\ \text{mm}$ anteriores al bregma, de acuerdo a las consideraciones esterotáxicas de Paxinos [141]. Se examinaron al microscopio óptico, a 400X. Empleando el analizador de imágenes (Zeiss image 3.0) en cada corte se llevó a cabo el conteo de las neuronas piramidales del hipocampo en extensiones de $150,000\ \mu\text{m}^2$ de las regiones CA1, CA2, CA3 y Zona Hilar, donde únicamente se contaron las neuronas piramidales que mostraban características morfológicas normales y nucleolo visible, así mismo, se tomaron microfotografías de algunos cortes representativos de cada grupo.

Análisis intergrupales.

- Anova de medidas repetidas y prueba post-hoc de Tuckey para los valores promedio y porcentajes de neuronas piramidales observadas en las áreas CA1, CA2, CA3 y zona hilar de las ratas de los cuatro grupos.

Resultados

La característica de peso de los animales incluidos en los diferentes grupos experimentales fueron semejantes durante el período en que fueron evaluadas las funciones cognitivas y la población neuronal del hipocampo, 90 días después de haber sido integrados los grupos de animales INTACTO, CONTROL, ISQ+VEH e ISQ+MEL. En general, se observó un incremento del orden de los 200 *g* en el peso corporal al final del intervalo de los 90 días entre las maniobras experimentales iniciales y la evaluación de la estructura y funciones cerebrales en el presente estudio. La tabla 7.1 muestra los valores promedio del peso corporal de los animales incluidos en los cuatro grupos inmediatamente antes de los procedimientos anestésico-quirúrgicos del modelo de isquemia cerebral aguda por oclusión de los cuatro vasos, las maniobras “sham” (CONTROL) o la inclusión en el grupo correspondiente como animales intactos; así como 90 días después, sin diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 7.1: Peso corporal (MEDIA \pm DE) de los animales de los diferentes grupos

GRUPO	Peso al inicio del estudio	Peso al final del estudio
INTACTO	242 \pm 35 <i>g</i>	464 \pm 29 <i>g</i>
CONTROL	229 \pm 29 <i>g</i>	465 \pm 25 <i>g</i>
ISQ+VEH	234 \pm 30 <i>g</i>	435 \pm 52 <i>g</i>
ISQ+MEL	235 \pm 32 <i>g</i>	439 \pm 53 <i>g</i>

La supresión del flujo sanguíneo cerebral durante 15 *min*, siguiendo los procedi-

mientos del modelo de isquemia cerebral global aguda mediante la “oclusión de los cuatros vasos” provocó en los animales incluidos en los grupos ISQ+VEH e ISQ+MEL períodos de por lo menos 20 *min* de inconciencia post-isquemia (criterio de inclusión). Puede observarse en la figura 7.1, que en la mayoría de los casos la duración de los períodos de inconciencia post-isquemia varió entre 21 y 40 *min*.

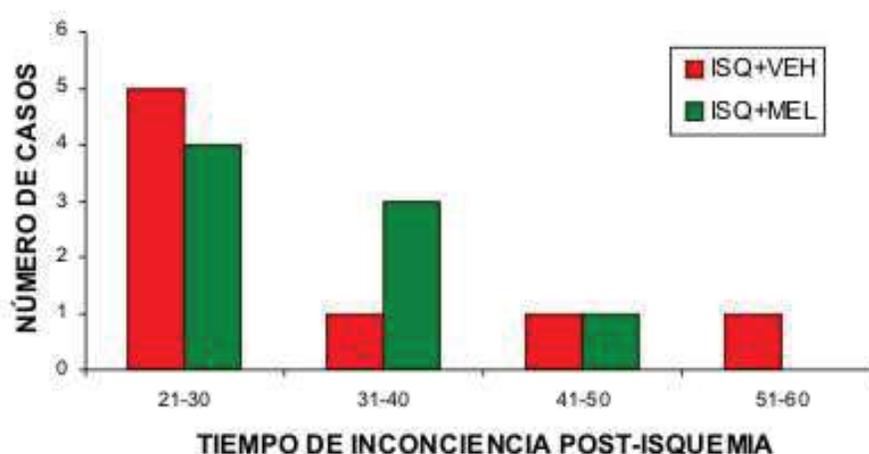


Figura 7.1: Número de casos de los grupos ISQ+VEH que presentaron periodos de inconciencia post-isquemia de 21-30, 31-40, 41-50 y 51-60 minutos

Las características y el curso temporal de la memoria de referencia espacial de los diferentes grupos se muestran en la figura 7.2. En los grupos de animales INTACTO y CONTROL, puede observarse la disminución de la latencia de escape desde valores superiores a los 50 *s*, el primer día de prueba, hasta valores del orden de los 10 *s*, al tercer día de prueba, que se mantuvieron con la misma magnitud en los días de prueba siguientes. Sin embargo, las latencias de escape del grupo ISQ+VEH, fueron significativamente mayores que las del grupo INTACTO o CONTROL a partir del segundo día de prueba, con persistencia de valores de latencia de escape cercanos al máximo admitido en la prueba (60 *s*) durante 4 de los 7 días de prueba. Las latencias de escape del grupo ISQ+MEL, se redujeron progresivamente a partir del primer día de prueba; pero fueron significativamente mayores a los del grupo de animales INTACTO y CONTROL durante los primeros 3 días de prueba, para adoptar valores

que se mantuvieron en el orden de los 20 s, sin diferencias significativas los días 4, 5 y 6 y significativamente mayores al día 7 con respecto a los grupos de animales INTACTO y CONTROL y significativamente menores los días 4 a 7 de prueba, con respecto al grupo ISQ+VEH.

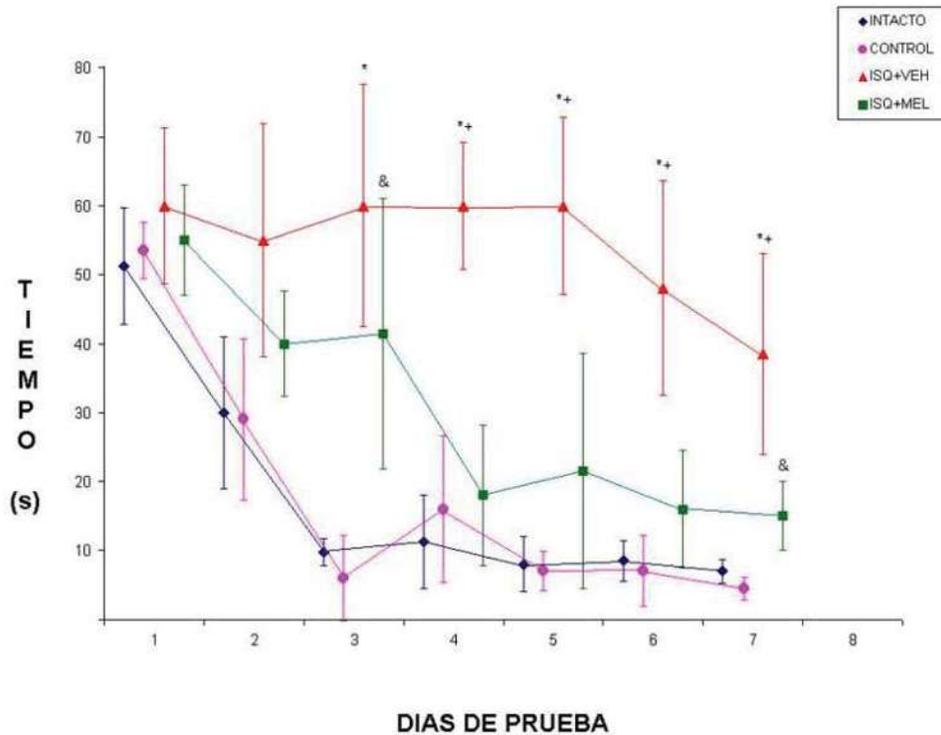


Figura 7.2: Magnitud y curso temporal de la latencia de escape (mediana \pm EE) de los diferentes grupos en el laberinto acuático de Morris. Pueden observarse las características del aprendizaje espacial de los grupos INTACTO y CONTROL significativamente diferentes de las del grupo ISQ+VEH; así como las semejanzas y diferencias de estos grupos con las características del aprendizaje en el grupo ISQ+MEL. * $p < 0.05$ con respecto al grupo INTACTO o CONTROL; + $p < 0.05$ con respecto al grupo ISQ+MEL, & $p < 0.05$ con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL.

En la distancia de nado durante los 7 días de prueba de los cuatro grupos se ilustran en la figura 7.3, puede observarse que en los animales de los grupos INTACTO y CONTROL recorrieron en promedio 6 m. El efecto del episodio de isquemia en el

grupo ISQ+VEH fue el aumento significativo de la distancia de nado total, mientras que en los animales del grupo ISQ+MEL se registró un aumento con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL diferencia que no llega a ser significativa siendo de 7.5 *m* aproximadamente.

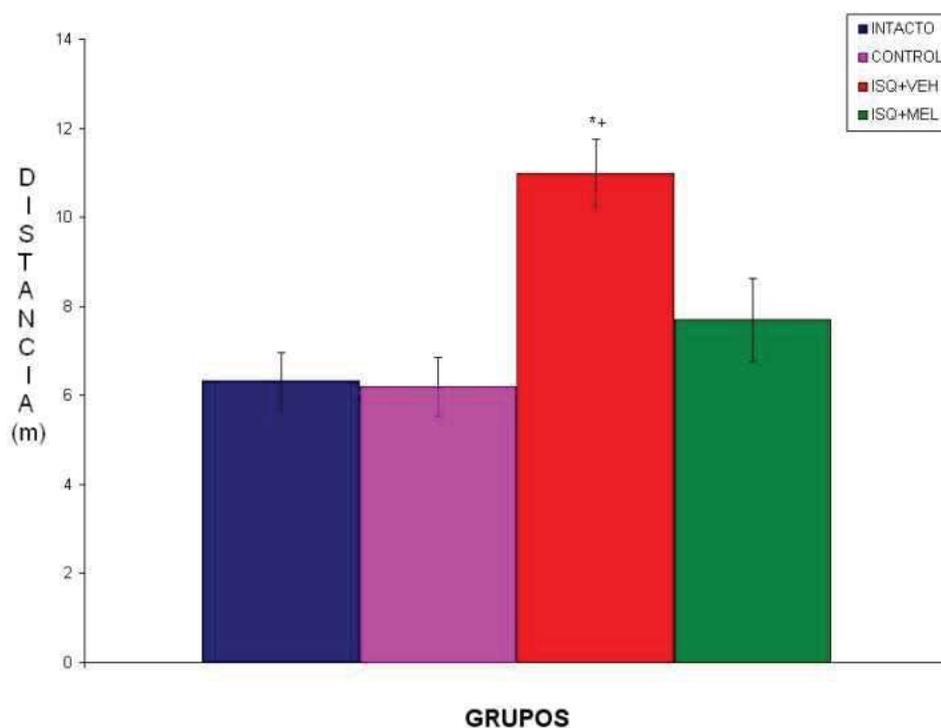


Figura 7.3: Distancia total recorrida (mediana \pm EE) para localizar la plataforma por los animales de los diferentes grupos experimentales durante los 7 días de prueba. Puede observarse el aumento significativo ($*p < 0.05$) con respecto a los grupos intacto y control, así como al grupo tratado con melatonina ($+p < 0.05$).

La figura 7.4 muestra las trayectorias que siguieron animales de los diferentes grupos para encontrar la plataforma, los días 1, 3 y 7 de prueba; así como las trayectorias de los mismos animales en búsqueda de la plataforma que fue retirada para realizar la prueba de transferencia 24 *h* después (día 8) de la última prueba de aprendizaje. Puede observarse la correspondencia de la eficiencia del aprendizaje de referencia espacial con la marcada reducción de la extensión de las trayectorias y la diferente

estrategia de búsqueda de la plataforma en la prueba de transferencia.

En la figura 7.6 se ilustra el número de cruces de los animales de los diferentes grupos por el cuadrante 1 (cuad 1) que fue el cuadrante en el que estuvo colocada la plataforma de escape durante los 7 días de prueba, así mismo por una posición equivalente en los otros tres cuadrantes (cuad 2, cuad 3, cuad 4) en los que se dividió el laberinto acuático de Morris durante la prueba de transferencia. Puede observarse que los grupos INTACTO y CONTROL realizaron un promedio de 5 cruces por el lugar donde se encontraba la plataforma y solamente 2 por el cuadrante opuesto (cuad 4). En el grupo ISQ+MEL se observa una reducción que no llega a ser significativa con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL siendo de 3 este número de cruces, en cambio en el grupo ISQ+VEH, esta reducción si llega a ser significativa siendo el número de cruces por debajo de 2 en el cuadrante 1. En los otros cuadrantes no existen diferencias entre los grupos.

Al calcular el porcentaje de tiempo de permanencia de los animales de cada uno de los grupos se obtuvo en los diferentes cuadrantes lo siguiente (figura 7.6): en el cuadrante 1 (cuadrante donde estuvo la plataforma) los animales de los grupos INTACTO, CONTROL e ISQ+MEL tuvieron un porcentaje de permanencia de 37% para INTACTO y CONTROL y 34% para ISQ+MEL, no habiendo diferencia significativa entre estos grupos. En el grupo ISQ+VEH el porcentaje es menor significativamente obteniéndose 24% de permanencia, así mismo existe diferencia en el cuadrante donde se encontraba la plataforma, ya que el grupo ISQ+VEH permaneció un tiempo significativamente mayor con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL.

Las características de la ejecución de las pruebas de los diferentes grupos en el laberinto radial de 8 brazos de Olton se muestran en la figura 7.7 en la que el principal indicador de aprendizaje y memoria de trabajo es el número de errores.

La mejor ejecución de las pruebas de aprendizaje y memoria de trabajo de los animales de los grupos INTACTO y CONTROL, así como las modificaciones observadas en los grupos isquemia + vehículo e isquemia + melatonina, se ilustra en la figura 7.6, con base en el total de errores de trabajo durante el período de prueba de 10 días.

Los resultados de la evaluación de la población neuronal del hipocampo en los

diferentes grupos se encuentran consignados en la tabla 7.10 y se ilustran en las figuras 7.8 y 7.9. La interrupción del flujo sanguíneo al cerebro durante 15 *min* a través del modelo de oclusión de cuatro vasos provocó una reducción importante de la población neuronal piramidal de los sectores del cuerno de Ammon del hipocampo.

El efecto de la isquemia cerebral global aguda en el grupo isquemia+vehículo fue la reducción significativa de la población neuronal del cuerno de Ammon del hipocampo, la cual fue máxima en el sector CA1, donde la población de células piramidales se redujo en un 80 %; en tanto que la magnitud de la reducción de células piramidales varió entre el 27 % en CA3, 36 % en el hilus y 48 % en CA2, una intensa reacción glial astrocítica y microglial se asoció con la desaparición de los componentes neuronales de la capa piramidal en el cuerno de Ammon.

El tratamiento con melatonina previno parcialmente la pérdida de neuronas en los sectores CA1 y CA2 seguido del episodio de isquemia (78.7 % y 88.1 % de preservación celular comparado con el grupo INTACTO). No se observó diferencia en la pérdida neuronal en los sectores CA3 y CA4 en relación a las ratas tratadas con vehículo.

La figura 7.8 ilustra la apariencia histológica del hipocampo dorsal de ratas incluidas en los grupos INTACTO y CONTROL (primera y segunda línea vertical), ISQ+VEH (tercera línea vertical) e ISQ+MEL (cuarta línea vertical). Las fotografías de cada línea muestran los sectores del cuerno de Ammon, seguidas por imágenes de los sectores CA1 y zona Hilar con una magnificación mayor.

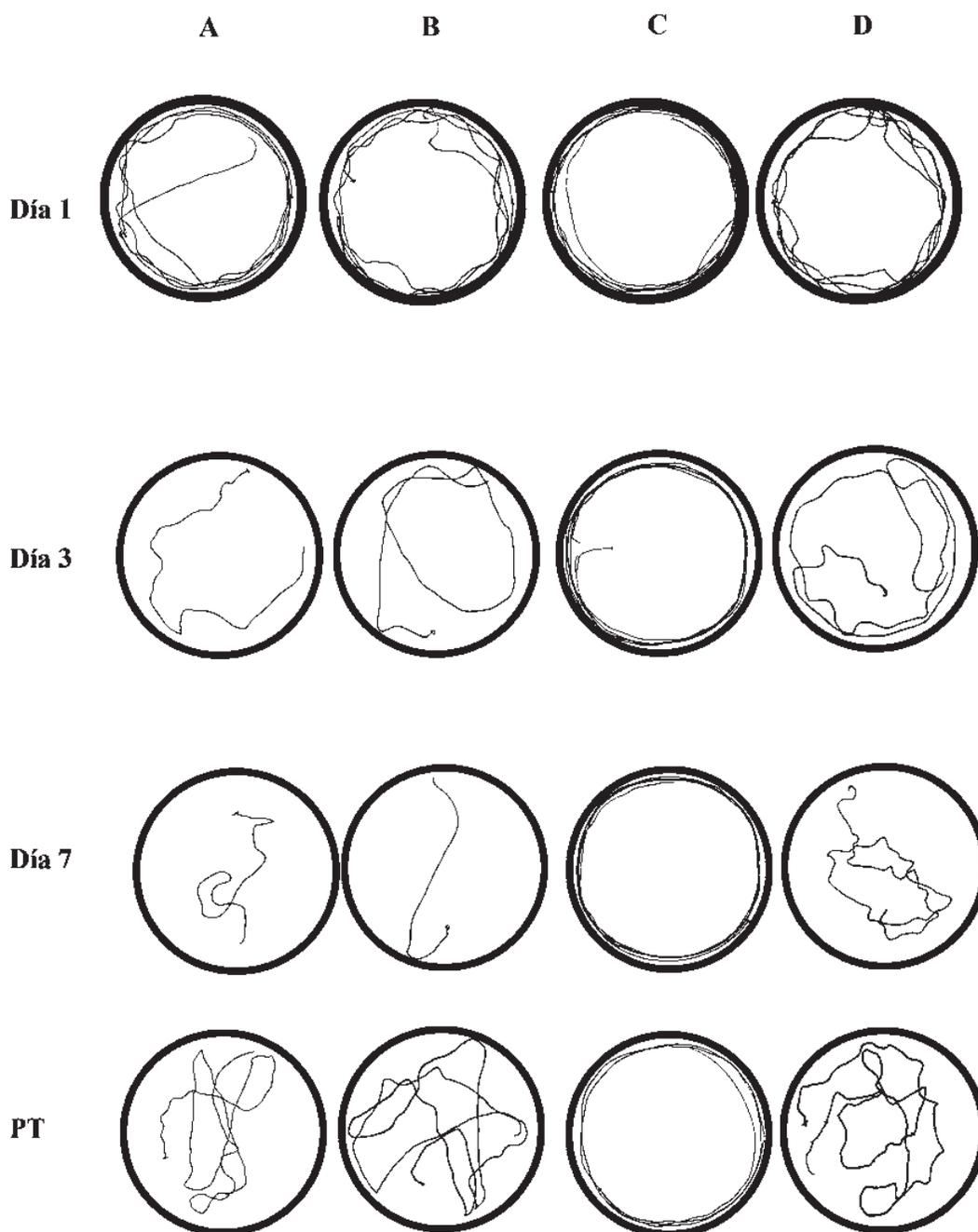


Figura 7.4: Trayectorias de los días 1,3 y 7 de uno de los animales de los grupos INTACTO, CONTROL, ISQ+VEH e ISQ+MEL. De igual manera la prueba de transferencia (PT) de cada uno de ellos.

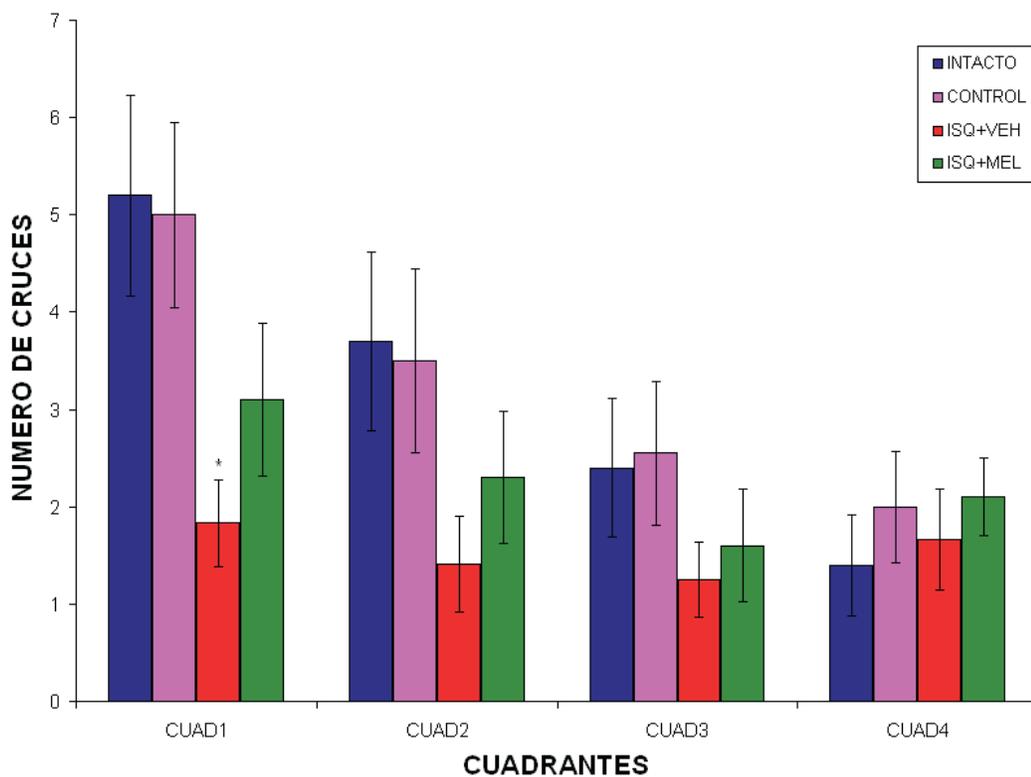


Figura 7.5: Número de cruces (media \pm EE) por los diferentes cuadrantes del laberinto acuático de Morris observados en los diferentes grupos experimentales. Puede observarse la reducción significativa del número de cruces en el cuadrante 1 del grupo ISQ+VEH (* $p < 0.05$) con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL.

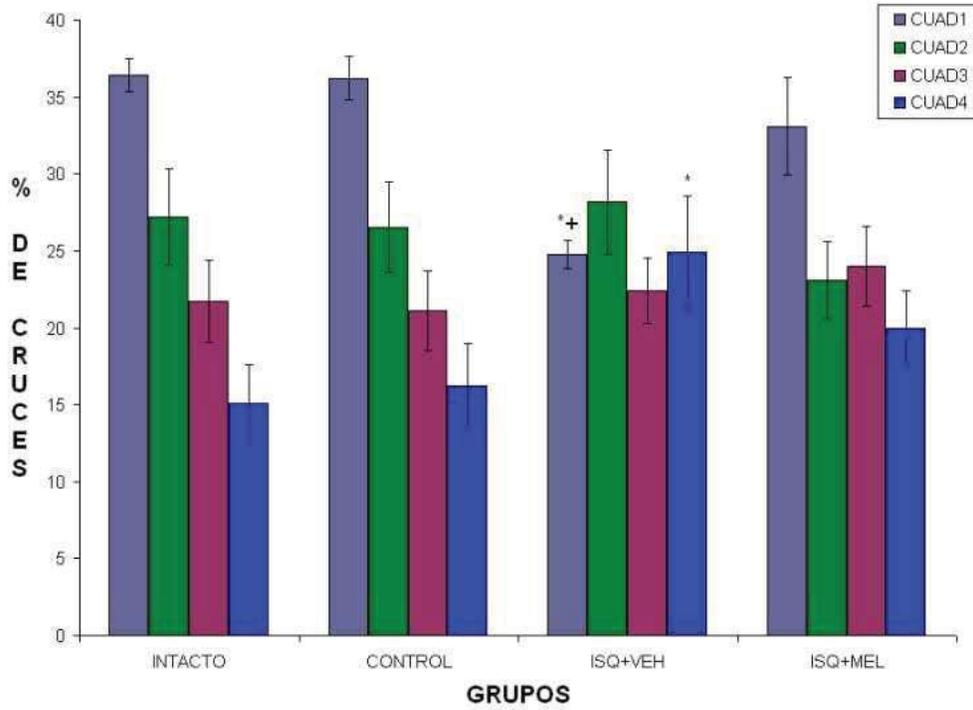


Figura 7.6: Porcentaje del tiempo total de la prueba de transferencia (media \pm EE) que permanecieron los animales de los distintos grupos en cada uno de los cuadrantes del laberinto acuático de Morris. Puede observarse la reducción significativa del grupo ISQ+VEH en el cuadrante 1 ($*p < 0.05$) con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL, así como al grupo tratado con melatonina ($*p < 0.05$) y un aumento significativo ($*p < 0.05$) de estancia en el cuadrante 4 (opuesto) con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL.

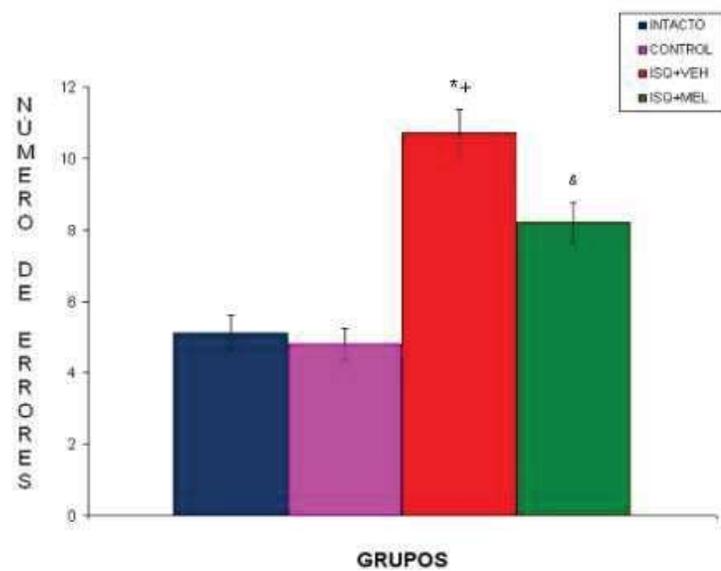


Figura 7.7: Total de errores de trabajo (media \pm EE) de los diferentes grupos durante el período de prueba de 10 días. Puede observarse el incremento significativo del número de errores del grupo ISQ+VEH con respecto a los grupos INTACTO, CONTROL e ISQ+MEL. * $p < 0.05$ con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL; + $p < 0.05$ con respecto al grupo ISQ+MEL; & $p < 0.05$ con respecto a INTACTO y CONTROL

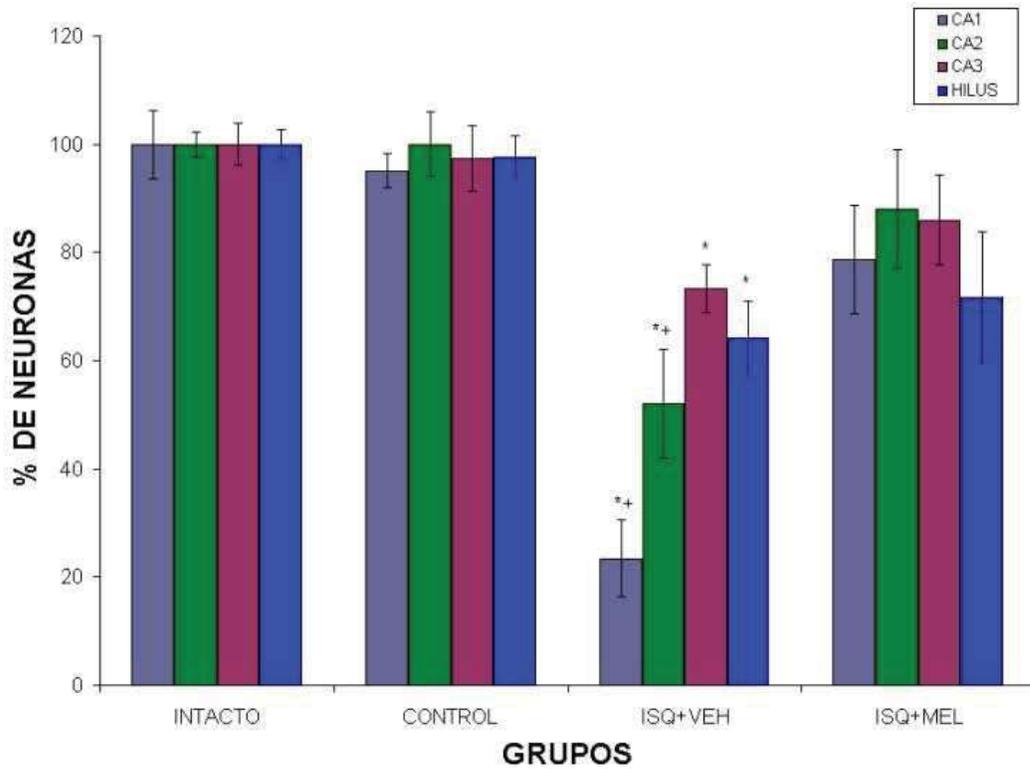


Figura 7.8: Valores porcentuales del número de neuronas piramidales (media del número de neuronas en el grupo INTACTO = 100 %) de los diferentes sectores del cuerno de Ammon del hipocampo en los grupos INTACTO, CONTROL, ISQ+VEH, ISQ+MEL. Puede observarse la reducción de la población neuronal del cuerno de Ammon del hipocampo en el grupo ISQ+VEH y la reducción importante de la pérdida neuronal en el ISQ+MEL. $*p < 0.05$ con respecto a los grupos INTACTO y CONTROL; $+p < 0.05$ con respecto al ISQ+MEL.

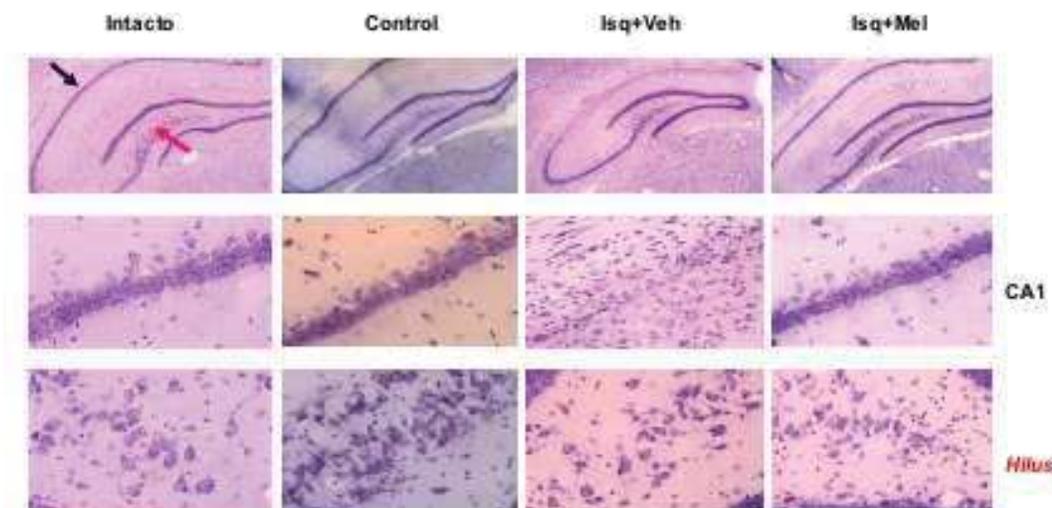


Figura 7.9: Cortes coronales representativos de cerebros de ratas pertenecientes a los grupos INTACTO, CONTROL o sometidos a la isquemia global que recibieron vehículo (ISQ+VEH) o melatonina (ISQ+MEL). Las imágenes de la parte superior muestran los sectores del cuerno de Ammon, seguidas por imágenes de mayor magnificación de los sectores CA1 y zona hilar o Hilus. La isquemia global provocó una reducción importante de la población de las neuronas piramidales en CA1 y CA2, y una pérdida moderada en CA3 y zona hilar. El tratamiento con melatonina preservó parcialmente la población neuronal piramidal en CA1 y CA2.

GRUPOS	CA1	CA2	CA3	HILUS
INTACTO	36.49 2.39(100)	21.79 0.57(100)	17.99 0.70(100)	19.16 0.54(100)
CONTROL	34.72 1.27(95.1)	21.94 1.39(100.6)	17.53 1.11(97.4)	18.72 0.75(97.7)
ISQ+VEH	8.55 2.67*(23.4)	11.37 2.24*(52.1)	13.19 0.85*(73.3)	12.30 1.39*(64.2)
ISQ+MEL	28.73 3.72&(78.7)	19.20 2.42&(88.1)	15.48 1.53(86.0)	13.74 2.31(71.7)

Figura 7.10: Número (media \pm EE) de neuronas/15,000 μm^2 , en las regiones CA1, CA2, CA3 e hilus del hipocampo dorsal de las ratas de los cuatro grupos en estudio

ISQ+VEH=isquemia y tratamiento con vehículo, ISQ+MEL=isquemia y tratamiento con melatonina (10 mg/kg). El número entre paréntesis es el porcentaje en relación al grupo INTACTO.

* $p < 0.05$ comparado con INTACTO y CONTROL.

& $p < 0.05$ comparado con ISQ+VEH.

Discusión

El cerebro en su conjunto es un órgano especialmente susceptible al daño por isquemia cerebral, en especial varios tipos de neuronas que forman parte de los circuitos neuronales del hipocampo, corteza cerebral, el estriado y el cerebelo pueden morir por necrosis o por apoptosis luego de un período breve, transitorio de isquemia [3]. El daño en el hipocampo y prácticamente todas sus estructuras asociadas (fomix, septum, corteza entorrinal, subículo) inducen deficiencias severas y permanentes de una amplia variedad de habilidades espaciales [60].

El presente estudio tuvo como finalidad mostrar a largo plazo el efecto neuroprotector de la melatonina administrada durante las horas inmediatas, siguientes a un episodio de ICGA de 15 minutos de duración. Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con melatonina, durante las horas siguientes al episodio de isquemia cerebral global aguda reduce el deterioro del aprendizaje y la memoria espacial inducidos por el episodio de isquemia. En efecto, la reducción significativa de la latencia de escape en el laberinto acuático de Morris que caracterizó el aprendizaje y la memoria de referencia espacial de los grupos INTACTO y CONTROL, no fue observado en el grupo ISQ+VEH mostrando el deterioro de estas funciones atribuible a las consecuencias de la isquemia sobre la integridad morfológica de estos fenómenos [60]. En cambio, a juzgar por la magnitud y curso temporal de los cambios de la latencia de escape en el grupo tratado con melatonina semejantes a los de los grupos INTACTO y CONTROL, sustenta el efecto neuroprotector de esta molécula

en contra del daño cerebral provocado por la isquemia en estructuras cerebrales muy vulnerables, tales como el hipocampo.

En este mismo sentido, en la prueba de transferencia, la mayor persistencia del grupo tratado con melatonina en comparación con el grupo tratado con vehículo, para permanecer en el cuadrante donde estuvo colocada la plataforma, puede sustentar el efecto neuroprotector de la melatonina, contra el daño provocado por la isquemia cerebral en el hipocampo. Así mismo, las diferencias en las trayectorias de nado observadas entre el grupo ISQ+VEH con respecto a los grupos INTACTO, CONTROL e ISQ+MEL pone de manifiesto, la mejor estrategia de búsqueda de la plataforma (estrategia de lugar) en estos grupos, compatible con el mejor funcionamiento del hipocampo y el deterioro funcional del hipocampo en el grupo sometido a isquemia, sin tratamiento neuroprotector. En efecto los patrones de nado entre los que destacan la Tigmotaxis (observada en algunos animales del grupo) persistente en muchos de los días de prueba y en la prueba de transferencia lo que de acuerdo a los hallazgos de otros autores corresponden a los observados en animales con lesiones del caudado putamen [142] o del hipocampo [143] incapaces de utilizar las estrategias de lugar que implica el uso de información para construir mapas cognoscitivos dependientes del hipocampo. Sin embargo, dentro del grupo ISQ+VEH, animales que si encontraron la plataforma, lo lograron haciendo un muestreo eficiente del laberinto. La mejor ejecución de las tareas de la memoria de referencia espacial en el laberinto acuático de Morris observados en los grupos INTACTO, CONTROL e ISQ+MEL en comparación con el grupo de ISQ+VEH se relacionan claramente con la preservación de las células piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, sugiriendo que el tratamiento con melatonina contrarresta al menos parcialmente los mecanismos que darían lugar a la muerte neuronal en esta estructura. A este respecto se ha descrito que el daño neuronal que resulta durante la isquemia es una consecuencia de una variedad de factores negativos. Para prevenir el daño extenso, lo más importante es restablecer el flujo sanguíneo al tejido isquémico tan pronto como sea posible; sin embargo, el hacer esto, es decir la reperfusión con sangre oxigenada causa destrucción molecular y pérdida neuronal/glial adicional. Los factores que generalmente se cree son responsables del daño por I/R incluyen una variedad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

generadas a partir de diversos fenómenos fisiopatológicos (excitotoxicidad, acidosis, incremento de calcio intracelular, activación de enzimas, etc.). Por esta razón muchos intentos para disminuir el daño neuronal resultante de la I/R han incluido el uso de antioxidantes y atrapadores de radicales libres dirigidos a neutralizar estas especies tóxicas.

La elevada sensibilidad del SNC a los radicales libres lo hace particularmente vulnerable al daño por I/R. Por esta razón es imperativo que cualquier molécula con propiedades antioxidantes que pretenda proteger neuronas y glia de radicales libres altamente reactivos y especies asociadas, alcance una concentración intracerebral suficiente para neutralizar dichas especies. En este contexto, la melatonina ha mostrado tener ventajas sobre antioxidantes que normalmente no se generan en el cerebro. La vitamina E y C, por ejemplo, tienen dificultades en atravesar la barrera hematoencefalica. Por el contrario, en un período de 10 *min* posterior a la administración periférica de melatonina, es posible detectarla en el SNC [77]. Adicionalmente a su habilidad para entrar al cerebro, es importante que un antioxidante posea una amplia distribución intracelular y diversas acciones para ser efectiva en la protección contra el estrés oxidativo. Nuevamente, la melatonina es superior a otros antioxidantes clásicos. Dentro de las neuronas y la glia, la vitamina E por su solubilidad se restringe su acción antioxidante a las membranas ricas en lípidos.

De manera contraria la concentración más elevada de vitamina C se localiza en el citoplasma. Sin embargo, la alta lipofilidad de la melatonina le permite estar presente en membranas celulares. Por otros estudios inmunocitoquímicos y por radioinmunoensayo han mostrado su presencia en la mitocondria [144] y en el núcleo [77]. Considerando la distancia extremadamente corta que la mayoría de los radicales altamente reactivos viajan antes de dañar una molécula, la melatonina (o cualquier atrapador de radicales libres) debe estar ubicado en el sitio donde los radicales son producidos.

En numerosos estudios han documentado que la melatonina es un agente altamente efectivo para disminuir la pérdida tisular y los déficits neurofisiológicos asociados con el daño por I/R en modelos animales. La habilidad de melatonina para limitar la destrucción celular como consecuencia de la interrupción transitoria del flujo san-

guíneo a un órgano no está confinada solo al cerebro sino que ocurre en otros tejidos como en caso de corazón. Ya que tanto la isquemia focal como global son condiciones que provocan secuelas incapacitantes para el individuo así como alteraciones en su entorno social, el uso de la melatonina como un agente neuroprotector debe ser considerada seriamente. El hecho de que la melatonina es una molécula producida endógenamente debiera favorecer su seguridad dado que no es una sustancia extraña al organismo.

En el presente trabajo, los resultados también sustentan el efecto neuroprotector de la melatonina en tareas de memoria de trabajo espacial. Se ha mostrado que la memoria de trabajo espacial depende principalmente de la integridad morfológica y funcional de la corteza prefrontal [145], la cual es capaz de participar extensivamente en diferentes aspectos del procesamiento de información actuando como área rectora del manejo de información espacial en la memoria de trabajo [65].

De acuerdo con este concepto, el deterioro de la memoria de trabajo espacial observada en el grupo ISQ+VEH, no fue observado en los grupos INTACTO y CONTROL a juzgar por el número de errores de trabajo significativamente mayor en el grupo ISQ+VEH durante los 10 días de ensayos en laberinto radial de Olton. En estas condiciones el tratamiento con melatonina parece haber tenido solamente un efecto parcial con la memoria de trabajo espacial significativamente mejor que el grupo ISQ+VEH los primeros días de prueba, pero sin alcanzar los parámetros de normalidad observados en los grupos INTACTO y CONTROL. Los resultados en el laberinto radial de Olton sugieren poco efecto neuroprotector de la melatonina sobre la corteza prefrontal o bien un efecto similar en neuronas que forman parte de las vías aferentes a la corteza prefrontal procedentes del sector CA1 y subículo que se conoce, son las vías a través de las cuales la corteza tiene acceso a la información espacial [64]. En el presente trabajo debe destacarse que el daño cerebral provocado por la isquemia, tiene repercusiones sobre funciones cognoscitivas dependientes del hipocampo y de la corteza prefrontal sugiriendo que el daño cerebral y sus consecuencias funcionales no fueron compensados por mecanismos cerebrales de restauración y/o plasticidad. Sin embargo, las evidencias del efecto neuroprotector obtenidas a largo plazo, indican la importancia de los fenómenos que ocurren en el período inmediato post-isquemia

como determinantes del daño cerebral y la eficacia neuroprotectora de la melatonina durante este período.

Las deficiencias de aprendizaje espacial y la pérdida neuronal del sector CA1 del hipocampo observadas en las ratas después del episodio de ICGA son similares a las observadas en humanos después de una isquemia cerebral transitoria (ataque cardíaco o embolia) sugiriendo que existen mecanismos neuropatológicos similares que pueden ser observados en diferentes especies [49].

Es posible que la melatonina puede ejercer un efecto neuroprotector a nivel hipocampal evitando la muerte neuronal probablemente por sus propiedades antioxidantes y por ende promoviendo la preservación de las funciones cognitivas (memoria espacial), que van a impactar en la vida diaria de los individuos.

Referencias

- [1] DIEZ TEJEDOR E DEL BRUTTO O, ALVAREZ-SABEN J, MUNOS M, ABISUI G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad iberoamericana de las enfermedades cerebrovasculares. En: *Rev neurol.* 2001 págs. 33:455–464.
- [2] KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM. Principles of neural science 3^{ed}. 1991 pág. 1041.
- [3] SARRAF-YAZDI S, LASKOWITZ D, WARNER DS. Pathophysiology of ischemic brain damage en: Shuaib A, Goldstein ib (Ed). Management of Acute Stroke. Marcel Deker Inc New York, 1999 págs. 243–277.
- [4] SIESJÖ BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I, Pathophysiology J. Neurosurg, 1992 págs. 77: 169–184.
- [5] MEIER-RUGE W, THEODORE D, ABRAHAM J. Pathology of ischaemic brain damage:. En: NY Plenum Press, ed., *Somjen G (Ed) Mechanisms of Cerebral Hypoxia and Stroke*, tomo 35. Advances in Behavioral Biology, 1988 págs. 73–82.
- [6] SHARP FR, SWANSON RA, HONKANIEMI J, KOGURE K, MASSA SM. Neurochemistry and molecular biology. En: C Livingstone, ed., *Barnett JM (Ed.) Stroke. Pathophysiology, diagnosis and management 3rd Ed*, 1998 págs. 51–83.
- [7] BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Inflammatory mediators and stroke. new opportunities for novel therapeutics., 1999 págs. 819–834.

-
- [8] SIESJO BK, HU B, KRISTIAN T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? *J. Cerebral Blood Flow Metab*, 1999 págs. 19: 19–26.
- [9] CHOI DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1988 págs. 1: 623–634.
- [10] LUTZ PL, NILSSON GE. The brain in crisis. En: *Lutz PL, Nilsson GE (Ed). The Brain without Oxygen. Causes of Failure and Mechanisms for Survival*. Mecial Intelligence Unit, U.S.A., 1994 pág. 117.
- [11] SIESJÖ BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part II. Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurgery*, 1999 págs. 77: 337–354.
- [12] PELLEGRINI DE, CHERICI G, ALESIANI M, CARLA V, MORONI F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia - induced neuronal damage. *J Neurosci*, 1990 págs. 10: 1035–1041.
- [13] LESS GJ. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience*, 1993 págs. 54: 287–322.
- [14] DEMEMIUK P, FADEN AI. Arachidonic acid metabolites and membrane lipid changes in central nervous system injury. En: *Stein DG, Sabel BA (Ed). Pharmacological approaches to the treatment of brain and spinal cord injury*. Plenum Press, New York, 1988 págs. 23–41.
- [15] HOO CP, FISHMAN RA, LONGAR S, CHEN S, YU A. Cellular and molecular effects of polyunsaturated fatty acids in brain ischemic and injury. En: *Kogure K A, Hoss mann B, Siesjö K Welsh FA (Ed). Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage*. Progress in Brain Research Vol 63. Elsevier science Publishers, 1985 págs. 227–236.
- [16] KOGURE K, ARAI H, ABE K, NAKANO M. Free radical damage of the brain following ischemia. En: *Kogure K A, Hossmann B, Siesjö K, Welsh FA (Ed).*

- Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage. Progress in Brain Research Vol 63. Elsevier science Publishers, 1985 págs. 237–260.
- [17] REITER R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 1995 págs. 9:526–533.
- [18] JENNER P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet*, 1994 págs. 344:796–798.
- [19] SHOHAMI E, BEIT-YANNAI E, HOROWITZ M, KOHEN R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity and an indicator of functional outcome. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 1997 págs. 17:1007–1019.
- [20] CHAN PH. Role of oxidantes in ischemic brain damage. *Stroke*, 1996 págs. 27:1124–1129.
- [21] HUBERMAN A. Biología de los radicales de oxígeno. En: *Díaz Z, Hicks J. Bioquímica*. Ed Interamericana 2ª Ed. México, 1995 págs. 715–723.
- [22] SZABO C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull*, 1996 págs. 41:131–141.
- [23] FISHER M, TAKANO K. Topics in experimental stroke. En: *Marc F, Julien B (Ed)*. Current review of cerebrovascular disease Current Medicine Philadelphia 2ª Ed, 1996 págs. 175–187.
- [24] WATERS CM. Mechanisms of neuronal cell death. *Mol Chem Neuropathol*, 1996 págs. 28:145–151.
- [25] ROSS ME. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *TINS*, 1996 págs. 19:62–68.
- [26] DUKE RC, OJCIUS DM, D-E YJ. Cell suicide in health and disease. *Sci Amer*, 1996 págs. 12:80–87.

- [27] MAC MANUS JP, LINNIK MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J. Cerebral Flow Metab*, 1997 págs. 17:815–832.
- [28] CHEN J, GRAHAM SH, NAKAYAMA M, ZHU RL, JIN K, STETLER A, SIMON RP. Apoptosis repressor genes bcl-2 y bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J. Cerebral Flow Metab*, 1997 págs. 17:2–10.
- [29] HARA H, FRIEDLANDER RM, GABLIARDINI V, AYATA C, FINK K, HUNG Z, SHIMIZU-SASAMATA M, YUAN J, MOSKOWITZ. Inhibition of interleukin 1b converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci*, 1997 págs. 94: 2007–2012.
- [30] DAVIS JN, ANTONAWICH FJ. Role of apoptotic proteins in ischemic hippocampal damage. En: *Resi DJ, Posner JB (Ed) Frontiers of Neurology: a symposium in honor of Fred Plum. Ann N Y Acad Sci*, tomo 835. The New York Academy of Sciences, New York, NY, 1997 págs. 309–320.
- [31] HONKANIEMI J, MASSA SM, SHARP FR. Apoptosis associated genes are induced in gerbil hippocampus following global ischemia. *Restor Neurol Neurosc*, 1996 págs. 9: 227–230.
- [32] MATTSON MP, FURUKAWA K. Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Restor Neurol Neurosc*, 1996 págs. 9: 191–205.
- [33] GRAHAM SH, CHEN J, STETLER RA, ZHU RL, JIN KL, SIMON RP. Expression of the proto-oncogene bcl-2 is increased in the rat brain following kainate-induced seizures. *Restor Neurol Neurosc*, 1996 págs. 9: 243–250.
- [34] HARA A, IWAI T, NIWA M, UEMATSU T, YOSHIMI N, TANAKA T, MORI H. Immunohistochemical detection of bax and bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res*, 1996 págs. 711: 249–250.

- [35] MARTINOU JC, DUBOIS MD, STAPLE JK, RODRIGUEZ I, FRANKOWSKI H, MISSOTTEN M, ALBERTINI P, TALABOT D, CATSICAS S, PIETRA C, HUARTE J. Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 1994 págs. 13: 1017–1030.
- [36] BUTTKE TM, SANDSTROM PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology today*, 1994 págs. 15: 7–10.
- [37] DESHPANDE J, BERGSTEDT K, LINDEN T, KALIMO H, WIELOCH T. Ultrastructural changes in the hippocampal ca1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death *exp brain res.* 1992 págs. 88: 91–105.
- [38] SUZUKI R, YAMAGUCHI T, INABA Y, WAGNER HG. Microphysiology of selectively vulnerable neurons. En: *Kogure K A, Hossmann B, Siesjö K, Welsh FA (Eds). Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage.* Progress in Brain Res. Elsevier Science Publ Co New York, 1985 págs. 63: 59–68.
- [39] KIRINO T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982 págs. 239: 57–69.
- [40] KIRINO T, TAMURA A, SANO K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia - reversible and irreversible types of ischemic cell damage. En: *Kogure K A, Hossmann B, Siesjö K, Welsh FA (Eds). Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage.* Progress in Brain Res. Elsevier Science Publ Co New York, 1985 págs. 63: 39–56.
- [41] PULSINELLI W. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. En: *Kogure K A, Hossmann B, Siesjö K, Welsh FA (Eds). Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage.* Progress in Brain Res. Elsevier Science Publ Co New York, 1985 págs. 63: 29–37.
- [42] SCHMIDT-KASTNER R, GROSSE OB, HOSSMANN KA. Pattern of neuronal

- vulnerability in the cat hippocampus after one hour of global cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*, 1990 págs. 79: 444–455.
- [43] PASCHEN W, DOUTHEIL J. Disturbances of the functioning of endoplasmic reticulum: A key mechanism underlying neuronal cell injury? *J Cerebral Blood Flow Metab*, 1999 págs. 19: 1–18.
- [44] HARMAN D. Aging: overview. healthy aging for functional longevity. Molecular and cellular interactions in senescence. PARK CS, HWANG ES, KIM HS, PARK WY. (Eds). *Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol 928*. The New York Academy of Sciences New York, 2001, 2001 págs. 1–21.
- [45] TREMBLY B. Clinical potential for the use of neuroprotective agents. En: *Neurodegenerative agents. Clinical and experimental aspects*. TREMBLY B, SLIKKER W (Eds). *Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol 765*. The New York Academy of Sciences New York, 1995 págs. 1–20.
- [46] PULSINELLI W, JACEWICS M, LEVY DE, PETITO CK, F P. Ischemic brain injury and the therapeutic window. En: *Reis DJ, Posner JB (Ed) Frontiers of Neurology: a symposium in honor of Fred Plum. Ann N Y Acad Sci*, tomo 835. The New York Academy of Sciences, New York, 1997 págs. 187–192.
- [47] LEKER RR, SHOHAMI E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Rev.*, 2002 págs. 39:55–73.
- [48] STAIR. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*, 1999 págs. 30(12):1–14.
- [49] BLOCK F. Global ischemia and behavioral deficits. *Progress in neurobiology*, 1999 págs. 58: 279–295.
- [50] MYHRER T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain research reviews*, 2003 págs. 41: 268–287.

- [51] AMBROGI G, BALDI E, BUCHERELLI C, SACCHETTI B, TASSONI G. Neuronal topography and chronology of memory consolidation: A review of functional inactivation findings. *Neurobiology of learning and memory*, 1999 págs. 71: 1–18.
- [52] WOODSIDE B, BORRONI A, HAMMONDS M, TEYLER T. Nmda receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiology of learning and memory*, 2004 págs. 81: 105–114.
- [53] DAVIS H, TRIBUNA J, PULSINELLI W, VOLPE T. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiology and behavior*, 1986 págs. 37: 387–392.
- [54] OLSEN G, SCHEEL-KRUGER J, MOLLER A, JENSEN L. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. *Neuroscience*, 1994 págs. 4: 681–690.
- [55] GALANI R, OBIS S, COUTUREAU E, JARRARD L, CASSEL J. A comparison of the effects of fimbria-fornix, hippocampal, or entorhinal cortex lesions on spatial reference and working memory in rats: short versus long postsurgical recovery period. *Neurobiology of learning and memory*, 2002 págs. 77: 1–16.
- [56] BERMUDEZ R, PRADO R. Memoria. dónde reside y cómo se forma. Editorial trillas, 1ra. Edición, 2001 págs. 24–25.
- [57] COURTNEY A, NELSON R, TRAYSTMAN R, HURN P. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: Hill it prove useful? *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 2001 págs. 25: 325–342.
- [58] MCNAMARA R, SKELTON R. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the morris water maze. *Brain research reviews*, 1993 págs. 18: 33–49.

- [59] KESSELS R, HAAN E, JAAP L, POSTMA A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain research reviews*, 2001 págs. 35: 295–303.
- [60] POU CET B, BENHAMOU S. The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Critical reviews in Neurobiology*, 1997 págs. 11(2 y 3): 101–120.
- [61] BADDELEY A. *Human memory: theory and practice*. Hove. England: Psychology Press.
- [62] MARKOWITSCH H. *Memory and amnesia* .
- [63] FUSTER M. Frontal lobes. *Current Opinion in Neurobiology*, 1993 págs. 3: 160–165.
- [64] VERWER R, MEIJER HFM. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex en hippocampus. *Van Vum y MP Ritter*, 1997 págs. 7: 397–402.
- [65] OLVERA ME. El papel de la corteza prefrontal en la orientación espacial. En: *GUEVARA MA, HERNANDEZ M, DURAN P “Aproximaciones al estudio de la corteza prefrontal”*. Guadalajara, Jal 1^{ra}. Ed, 2004 págs. 188–189.
- [66] SAUER D, NUGLISCH J, ROSSBERG C, MENNEL HD, BECK T, BIELENBERG GW, KRIEGLSTEIN J. Phencyclidine reduces postischemic neuronal necrosis in rat hippocampus without changin blood flow. *Neurosc. Lett*, 1988 págs. 91:327–332.
- [67] STEINBERG GK, SALEH J, KUNIS D. Delayed treatment with dextromethorphan and dextrorphan reduces cerebral dmage after transient focal ischemia. En: *WELCH KMA CAPLAN LR, REIS DJ, et al, Eds. Primer on Cerebrovascular diseases*. *Neurosci. Lett*, 1988 págs. 84:193–197.
- [68] RESPHANDE J, WIELOCK T. Amelioration of ischemic brain damage following postischemic treatment with flunarizine. *Neurol. Res*, 1985 págs. 7:27–29.

- [69] NUGLISCH J, KARKOUTLY C, MENNEL HD, ROSSBERG C, KRIEGLSTEIN J. Protective effect of nimodipine against ischemic neuronal damage in rat hippocampus without changing postischemic cerebral blood flow. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 1990 págs. 10:654–659.
- [70] BODE-GREVEL KM, KLISCH J, HORVATH EA E. Effects of 5-hydroxytryptamine-receptor agonist on hippocampal damage after transient forebrain ischemia in the mongolian gerbil. *Stroke*, 1990 págs. 21:(Suppl. IV): 164–166.
- [71] PREHN JH, BACKHAUSS C, KARTOUTLY C, NUGLISCH J, PERUCHE B, ROSSBERG C, KRIEGLSTEIN J. Neuroprotective properties of 5-HT_{1A} agonist in rodent models of focal and global cerebral ischemia. *Eur. J. Pharmacol*, 1991 págs. 203:231–222.
- [72] EVANS MC, SWAN JH, MELDRUM BS. An adenosine analogue 2-chloroadenosine, protects against long-term development of ischemia cell loss in the rat hippocampus. *Neurosc. Lett* .
- [73] SAUER D, RISCHKE R, BECK T, ROSSBERG C, MENNEL HD, BIELENBERG GW, KRIEGLSTEIN J. Vinpocetine prevents ischemic cell damage in rat hippocampus. *Life Sci*, 1988 págs. 43:1733–1739.
- [74] MARTZ D, RAYOS G, SCHIELKE GP, L BA. Allopurinol and dimethylthiourea reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke*, 1989 págs. 20:488–494.
- [75] PREHN JHM, KARKOUTLY C, NUGLISCH J, PERUCHE B, KRIEGLSTEIN J. Dihydrolipoate reduces neuronal injury after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 1992 págs. 12:78–87.
- [76] WIELOCH T, KOIDE T, WESTERBERG E. Inhibitory neurotransmitter and neuromodulators as protective agents against ischemic brain damage. En: *KRIEGLSTEIN J, Ed. Pharmacology of cerebral ischemia*. Elsevier Science, Amsterdam, 1996 págs. 191–197.

- [77] MENENDEZ-PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ, BARLOWWALDEN L, PABLOS MI, TAN D. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radio immunoassay evidence. *J. Cell Biochem*, 1993 págs. 53:353–382.
- [78] TRICOIRE H, LOCATELLI A, CHEMINEAU P, MALPAUX B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, 2002 págs. 143:84–90.
- [79] REITER RJ, TAN DX. Role of CSF in the transport of melatonin. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 33:61.
- [80] REITER RJ, TAN DX, OSUNA C, GITTO E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review *j. biomed. sci.* 2000 págs. 7:444–458.
- [81] TAN DX, REITER RJ, MANCHESTER LC, ET AL. Chemical and physiological properties and potencial mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr. Topics Med. Chem.*, 2002 págs. 2:181–198.
- [82] ALLEGRA M, REITER RJ, X TD, GENTILE C, TESORIEREL, LIVREA MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res*, 2003 págs. 34:1–10.
- [83] REITER RJ. Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News Physiol Sci*, 2000 págs. 15:246–250.
- [84] TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, ET AL. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of melatonin interaction with hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Res*, 1998 págs. 253:614–620.
- [85] PROEGGELER B, THEURMANN S, ROSE A, ET AL. Melatonin's unique radical scavenging properties-roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogues. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 33:20–30.

- [86] REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol*, 1998 págs. 56:359–384.
- [87] CUZZOCREA S, REITER RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol*, 2001 págs. 426:1–10.
- [88] JAHNKE G, MARR M, MYERS C, WILSON R, TRAVLOS G, PRICE C. Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant sprague-dawley rats. *Toxicol. Res*, 1999 págs. 50:271–274.
- [89] JAN JE, HAMILTON D, SEWARD N, ET AL. Clinical trails of controlled release melatonin in children with sep-wake cycle disorders. *J. Pineal Res*, 2000 págs. 29:34–39.
- [90] SEABRA MLV, BIGNOTTO M, PINTO LR, TIFIK S. Randomized, double blind clinical trial, controlled with placebo, of the toxicology of chronic melatonin treatment. *J. Pineal Res*, 2000 págs. 29:193–200.
- [91] GITTO E, KARBOWNIK M, REITER RJ, ET AL. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediat. Res*, 2001 págs. 50:756–760.
- [92] FULIA F, GITTO E, CUZZOCREA S, REITER RJ, DUGO L, GITTO P, BARBERI S, CORDARO S, BARBERI I. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J. Pineal Res* págs. 31:343–349.
- [93] FLAMM ES, DEMAPAULOS HB, SELIGMAN ML, POSER RG, RANSOHOFF J. Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 1978 págs. 9:445–447.
- [94] DEMOPAULOS HB, FLAMM ES, SELIGMAN ML, ET AL. Membrane perturbations in cns injury: theoretical basis for free radical damage and a review of the experimental data. En: *POPP AJ, BOURKE RS, NELSON LR, KIMELBERG HK (Eds)*. neural truma. New York, 1979 págs. 63–68.

- [95] OLIVER CN, STARK-REED RE, STADTMAN ER, LIU GJ, CARNEY JM, FLOYD RA. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990 págs. 87:5144–5147.
- [96] FLOYD RA, CARNEY JM. Free radical damage to proteins and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann. Neurol*, 1992 págs. 32:S22–S27.
- [97] DEL ZOOPO GJ. Reperfusion damage: the role of PMN leucocytes. En: *WELCH KMA, CAPLAN LR, REIS DJ, et al, (Eds). primer in cerebrovascular diseases*. Academia Press San Diego, 1997 págs. 217–220.
- [98] BECKMAN JS. The double edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol*, 1991 págs. 15:53–59.
- [99] DALKARA T, MOSKOWITZ MA. Complex role of nitric oxide in cerebral ischemia. *Brain Pathol*, 1994 págs. 4:49–57.
- [100] DAWSON TM, DAWSON VL. Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist*, 1994 págs. 1:9–20.
- [101] KAYAMA T, NAKAJIMA M, K O, HIRAMATSU M. Free radical imaging during ischemia in rat brain. En: *PACKER L, HIRAMATSU M, YOSHIRKAWA T. (Eds). Free radicals in brain physiology and disorders*. Academic Press, San Diego, 1996 págs. 279–285.
- [102] HALL NC, CARNEY JM, CHENG MS, BUTTERFIELD DA. Prevention of ischemia/reperfusion-induced alterations in synaptosomal membran-associated proteins and lipids by n-tert-butyl- α -phynylnitron and diflouromethylornithine. *Neuroscience*, 1995 págs. 69:591–600.
- [103] WOLF PA. Epidemiology and risk factors management. En: *WELCH KMA, CAPLAN LR, REIS DJ, et al, (Eds). Primer in cerebrovascular diseases*. Academia Press San Diego, 1997 págs. 751–757.

-
- [104] YASUI Y, MAUATARI K, HIGUCHI Y, ET AL. Oxygen radicals in glutamate toxicity of c6 glioma cells via transporter system. En: *PACKER L, HIRAMATSU M, YOSHIRKAWA T. (Eds). Free radicals in brain physiology and disorders.* Academic Press, San Diego, 1996 págs. 51–67.
- [105] PABLOS MI, REITER RJ, CHUANG JI, ORTIZ GG, GUERRERO JM, SEWERYNEK E, AGAPITO MT, MELCHIORRI D, LAWRENCE R, DENEKE S. Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen. *J. Appl. Physiol*, 1997 págs. 83:354–358.
- [106] TAN DX, MANCHESTER LC, REITER RJ, QI WB, KARBOWNIK M, CALVO J. Significance of melatonin in antioxidative defense system. *Biol. Signals Recept*, 2000 págs. 9:137–159.
- [107] REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC, QI W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cel Biochem. Biophys*, 2001 págs. 34:327–256.
- [108] REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC, CALVO JR. Antioxidative capacity of melatonin. En: *CADENAS E, PACKER L. (Eds). Handbook of antioxidantes, 2da. Ed.* Dekker New York, 2002 págs. 556–613.
- [109] SENER G, SEHIRLI AO, ALTUNBAS HZ, ERSOY Y, PASKALOGLU K, ARBAK S, AYANOGLU-DULGER G. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 32:231–236.
- [110] PAPPOLLA MA, CHYAN YJ, POEGGELER B, ET AL. An assessment of the antioxidant and antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for alzheimer's disease. *J. neural Transm*, 2000 págs. 107:203–231.
- [111] HSU CH, CHI BC, CASIDA JE. Melatonin reduces phosphine-induced lipid and DNA oxidation *in vitro* and *in vivo* in rat brain. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 32:53–62.

- [112] CHEN ST, CHUANG JI, HONG MH, LI EIC. Melatonin attenuates MPP+-induced neurodegeneration and glutathione impairment in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 32:262–269.
- [113] TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B, ET AL. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J*, 1993 págs. 1:57–60.
- [114] HARDELAND R, REITER RJ, POEGGELER B, TAN DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci. Biobehav. Dev*, 1993 págs. 17:347–357.
- [115] MANEV H, UZ T, KHARLAMOV A, JOO JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J*, 1996 págs. 10:1546–1551.
- [116] JOO JY, UZ T, MANEV H. Opposite effects of pinealectomy and melatonin administration on brain damage following cerebral focal ischemia in rat. *Rest. Neurol. Neurosci*, 1998 págs. 13:185–191.
- [117] KILIC E, OZDEMIR YG, BOALY H, KELESTIMUR H, DALKARA T. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J. Cerebr. Blood Flow Metab*, 1999 págs. 19:511–516.
- [118] REITER RJ. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bio-Essays*, 1992 págs. 14:169–175.
- [119] MANEV H, UZ T. The role of the light-dark cycle and melatonin in stroke outcome. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis*, 1998 págs. 7:165–167.
- [120] CHO S, JOH TH, BAIK HH, DIBINIS C, VOLPE B. Melatonin administration protects *ca1* hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res*, 1997 págs. 755:335–338.

- [121] LI XJ, ZHANG LM, GU J, ZHANG AZ, SUN FY. Melatonin decreases production of the hydroxyl radical during cerebral ischemia-reperfusion. *Acta Pharmacol. Sinica*, 1997 págs. 18:394–396.
- [122] SAINZ RM, MAYO JC, URIA H, KOTLER M, ANTOLIN I, RODRIGUEZ C, MENENDEZ-PELAEZ A. The pineal neurohormone melatonin prevents *in vivo* and *in vitro* apoptosis in thymocytes. *J. Pineal Res*, 1995 págs. 19:178–188.
- [123] LEE V, RANDHAWA AK, SINGAL PK. Adriamicyn-induced myocardial dysfunction *in vitro* mediated by free radicals. *Am. J. Physiol*, 1991 págs. 261:H985–H995.
- [124] MCLAUGHLIN KA, OSBOURNE BA, BOLDSBY RA. The role of oxygen in thymocytes apoptosis. *Eur. J. Immunol*, 1996 págs. 26:1170–1174.
- [125] SINHA K, DEGAONKAR MN, JAGANNATHAN NR, GUPTA YK. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur. J. Pharmacol*, 2002 págs. 428:185–192.
- [126] TATLISUMAK T, CARANO RAD, TAKANO K, ET AL. A novel endothelium antagonist, A-1277ZZ, attenuates ischemic lesion size in rats with temporary middle cerebra artery occlusion: a diffusion and perfusion study. *Stroke*, 1998 págs. 29:850–857.
- [127] PEI Z, HO HT, CHEUNG RTF. Pre-treatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model in the rat. *Neurosci. Lett*, 2002 págs. 318:1–4.
- [128] PEI Z, PANG SF, CHEUNG RTF. Pre-treatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 32:168–172.
- [129] PEI Z, FUNG PCW, CHEUNG RTF. Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain-barrier breakdown during reperfusion in

- a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res*, 2003 págs. 34:110–118.
- [130] CSABA F. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 1996 págs. 6:74–88.
- [131] SUN FY, LIN X, MAO LZ, GE W, ZHANG L, HUANG Y, GU J. Neuroprotection by melatonin against ischemic neuronal injury associated with modulation of DNA damage and repair in the rat following a transient cerebral ischemia. *J. Pineal Res*, 2002 págs. 33:48–56.
- [132] LETECHEPIA-VALLEJO G, GONZALEZ-BURGOS I, CERVANTES M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global ischemia in cats. *Arch. Med. Res*, 2001 págs. 32: 186–192.
- [133] PULSINELLI WA, BRIERLEY JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1997 págs. 10:267–272.
- [134] PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 1982 págs. 11:491–498.
- [135] PULSINELLI WA, BUCHAN AM. The four-vessel occlusion rat model; methods for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke*, 1988 pág. 19:913.
- [136] NETTO CA, HODGES H, SINDEN JD, LEPEILLET E, KERSHAW T, SOWINSKI P, MELDRUM BS, GRAY JA. Effects of fetal hippocampal field grafts on ischemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *neuroscience*, 1993 pág. 54:69.
- [137] SIEGEL S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York; McGraw-Hill, 1956 .
- [138] OLTON DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology and Behavior*, 1987 págs. 40:793–797.

-
- [139] FERIA-VELASCO A, KARNOVSKY MJ. Óptima preservación ultraestructural del sistema nervioso central por perfusión intravascular de glutaraldehído. *ARCh Invest Med (Méx)*, 1970 pág. 1:210.
- [140] LUNA G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd Ed. New York; Mc-Graw Hill, 1960 .
- [141] PAXINOS G, WATSON C. The rat in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, N.Y., 1982 .
- [142] DEVAN BD, McDONALD RJ, WHITE NM. Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place-and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res.*, 1999 págs. 100:5–14.
- [143] DAY LB, SCHALLERT T. Anticholinergic effects on acquisition of place learning in the Morris water task: spatial mapping deficit or inability to inhibit nonplace strategies? *Behav Neurosci*, 1996 págs. 110:998–1005.
- [144] MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G, LEON J, ACUNA-CASTROVIEJO D. Melatonin but no vitamins c and e maintain glutathione hemostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial stress. *FASEB J*, 2000 págs. 14:1677–1679.
- [145] OWEN AM, STERN CE, B LR, TRACEY I, ROSEN BR. Functional organization of spatial and nonspatial working memory processing within the human lateral frontal cortex. *Neurobiology*, 1998 págs. 95:7721–7726.