



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS “DR.
IGNACIO CHAVEZ”
MAESTRIA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA**

**“Características de la citoarquitectura de
las neuronas piramidales de la corteza
prefrontal luego de isquemia cerebral y
tratamiento neuroprotector con
melatonina, en ratas”.**

TESIS DE POSGRADO

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRIA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA**

**PRESENTA
Q.F.B. DAFNE VANESSA GARCIA CHAVEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: DC JOSE MIGUEL CERVANTES ALFARO
CO-DIRECTOR DE TESIS: DC IGNACIO GONZALEZ BURGOS.**

MORELIA, MICH., 2008

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA	4
EXCITOTOXICIDAD	5
PAPEL DEL Ca^{2+} EN EL DAÑO CELULAR POR ISQUEMIA ..	5
RADICALES LIBRES	6
DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	8
APOPTOSIS	9
NEUROPROTECCIÓN	11
ANTECEDENTES	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación Biomédicas de Michoacán del IMSS y en el Laboratorio de Neurociencias de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Biomédicas de Michoacán (IMSS) por las facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

A mis papás por su apoyo y comprensión así como la confianza que depositaron en mí.

A mis hermanas Lay y Lili por su apoyo y muchas otras cosas.

Al Dr. José Miguel Cervantes por su apoyo y confianza que deposito en mí, así como conocimientos.

A la Dra. Chela por sus consejos y amistad que me otorgo así como también el conocimiento que me transmitió y que ella con gusto siempre me dio.

A mis compañeras de la maestría Mony, Haide, Dulce, Silvia, Adriana, Lety P, y Lety G, por su amistad así como compañeros y doctores del CIBIMI que me brindaron su apoyo, conocimiento y amistad.

RESUMEN

La isquemia cerebral global aguda desencadena fenómenos de daño celular que pueden dar lugar a la muerte de grupos neuronales vulnerables; tales como las neuronas piramidales del cuerno de Ammon y las de las capas III y V de la corteza cerebral. Estas estructuras cerebrales y sus relaciones morfológicas y funcionales son relevantes para la integración de las funciones cognitivas como el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo espacial, por lo que las secuelas de la isquemia cerebral incluyen diversas alteraciones de estas funciones. Los resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio mostraron que la población de neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal no se alteró en los animales isquémicos; aunque se observaron diferencias significativas en la memoria de trabajo espacial; la cual mostró pocas alteraciones en los sujetos bajo tratamiento neuroprotector con melatonina (10mg/kg/h, iv) durante 6 h post-isquemia, a diferencia del gran deterioro de dicha función en los sujetos sin tratamiento neuroprotector. En consecuencia parece importante estudiar la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de las capas III y V con objeto de investigar si las diferencias observadas en la memoria de trabajo espacial en presencia o en ausencia de tratamiento neuroprotector se asocian con modificaciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal. Para ello se estudiaron los cerebros de ratas intactas (control), isquémicas tratadas con melatonina (Isq+Mel) e isquémicas tratadas con vehículo (Isq+Veh); mediante técnicas convencionales de evaluación morfológica neuronal basadas en el procedimiento de Golgi. En ausencia de tratamiento neuroprotector la isquemia cerebral global aguda provocó la reducción significativa del número total de bifurcaciones dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal en grupo Isq+Veh (11.5 ± 1.13 ; media \pm EE) en comparación con el grupo Control (14.6 ± 0.77) y el grupo Isq+Mel (14.16 ± 0.12); así, como una disminución de la densidad de espinas dendríticas en segmentos oblicuos ($50\mu\text{m}$) de la dendrita apical (Control: 48.03 ± 3.08 , media \pm EE; Isq+Mel: 53.33 ± 2.68 ; Isq+Veh: 45.5 ± 7.36) y de la dendrita basal (Control: 46.69 ± 4.01 ; Isq+Mel: 51.66 ± 1.94 ; Isq+Veh: 41.16 ± 6.79). Así mismo, el tamaño del soma de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal se redujo significativamente en el grupo Isq+Veh (diámetro esférico 3.21 ± 0.05 ; media \pm EE) en comparación con los grupos Control (3.95 ± 0.18) e Isq+Mel (3.89 ± 0.11). Los valores correspondientes a las arborizaciones dendríticas, la densidad de espinas dendríticas y la longitud de la dendrita apical y la dendrita basal en las neuronas piramidales de la capa III mostraron una tendencia a ser menores que los de los grupos Control e Isq+Mel; sin embargo no alcanzaron el criterio de significación estadística. Estos resultados muestran que la isquemia cerebral indujo alteraciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la capa V, posiblemente relacionadas con la disminución de las conexiones provenientes del hipocampo, que pueden explicar las deficiencias de la memoria de trabajo observadas, aún en ausencia de pérdida neuronal; en tanto que el tratamiento neuroprotector con melatonina en el período inmediato post-isquemia previno estas alteraciones morfo-funcionales de la corteza prefrontal. En conjunto, estos resultados permiten destacar la eficacia de la melatonina para contrarrestar los mecanismos fisiopatológicos inducidos por la isquemia que de otra manera darían lugar a deterioro de la estructura y la función de regiones cerebrales vulnerables a la isquemia, ejerciendo sus acciones solamente durante un período corto, pero crítico en función del desarrollo de mecanismos celulares conducentes al daño cerebral post-isquemia.

ABSTRACT

Acute global cerebral ischemia triggers pathophysiological phenomena leading to death of vulnerable neurons in specific brain structures (pyramidal neurons of the Ammon's horn and layers III and V of the prefrontal cortex) involved in spatial learning and memory. Long-term evaluation of neuron population of pyramidal neurons in layers III and V of the prefrontal cortex did not show significant differences as a result of global cerebral ischemia, however a worst performance in the eight-arm Olton working memory tasks was observed in the ischemic vehicle-treated rats than in the ischemic melatonin-treated and control subjects. Thus, it seems important to study the cytoarchitectonic characteristics of the pyramidal neurons at layers III and V from the prefrontal cortex of rats after global cerebral ischemia and melatonin-induced neuroprotection. Brain tissue samples were obtained from intact rats (Control) and brains of rats having been submitted, to acute global cerebral ischemia during 15 min through four vessel occlusion (4VO) and melatonin, 10mg/kg/h for 6h, iv, (Isch+Mel), or vehicle administration (Isch+Veh). The brains were processed according to a modification of the Golgi method. The total number of dendritic bifurcations of pyramidal neurons at layer V were significantly low in the Isch+Veh group (11.5 ± 1.13 ; mean \pm SEM) than in Control (14.6 ± 0.77) and Isch+Mel (14.16 ± 0.12 ,) groups. Spine density in the apical (Control 48.03 ± 3.08 , mean \pm SEM; Isch+Mel 53.33 ± 2.68 ; Isch+Veh 45.5 ± 7.36) and the basal (Control 46.69 ± 4.01 ; Isch+Mel 51.66 ± 1.94 ; Isch+Veh 41.16 ± 6.79) dendrites of pyramidal neurons at layer V were significantly low in the Isch+Veh group than in Control and Isch+Mel groups. A reduction in the soma size of pyramidal neurons located at layer V were observed in the Isch+Veh (spherical diameter 3.21 ± 0.05 mean \pm SEM) group as compared to Control (3.95 ± 0.18) and Isch+Mel (3.89 ± 0.11) groups; while significant differences of these parameters. Low, high variable values of dendritic bifurcation, spine density and apical and basal dendrite length in layer III pyramidal neurons were observed; though they did not account for significant differences among the other experimental groups. These results show long-term cytoarchitectural alterations i.e., the reduction of dendritic bifurcations and spine density in pyramidal neurons located at the layer V of the prefrontal cortex, possibly due to reduction of neuronal afferent connections from the hippocampus after global cerebral ischemia; which may in turn be related with the significantly bad working memory of Isch+Veh subjects, even though significant changes in pyramidal neuron population did not take place. These results also emphasize the efficacy of melatonin in counteracting the pathophysiological processes induced by ischemia, by exerting its actions during a short but critical period early after the ischemic episode, allowing preservation of cytoarchitectural characteristics of pyramidal neurons at the prefrontal cortex compatible with the integration of working memory functions.

INTRODUCCION

El cerebro representa el 2% del peso corporal total, sin embargo, en condiciones normales su funcionamiento requiere del aporte energético y de oxígeno que provee el 15-20% del gasto cardíaco. La interrupción en el suministro de sangre oxigenada y glucosa es crucial porque las neuronas requieren de un incremento en la síntesis de adenosina de trifosfato (ATP) para mantener sus gradientes iónicos transmembranales, actividad eléctrica, transmisión sináptica, síntesis de macromoléculas, transporte celular eficiente e integridad del citoesqueleto [1].

De acuerdo con datos estadísticos [2,3] los accidentes vasculares cerebrales (AVC) son una de las principales causas de muerte y discapacidad severa a largo plazo. Los datos estadísticos muestran que en los Estados Unidos los AVC afectan anualmente a más de 700,000 individuos (500,000 por primera ocasión y 200,000 de manera recurrente) ocasionando la muerte de 160,000 personas, por lo cual los AVC se han clasificado como la tercera causa de muerte después de los padecimientos cardíacos y el cáncer [4] con una proyección de 1136,000 individuos afectados para el año 2025 [5]. Asimismo se consideran de mayor importancia las implicaciones económicas de estos padecimientos [6].

Del total de los AVC, 80 a 90% son problemas de isquemia y 10 a 15% son problemas de hemorragia [7].

Cuando existe una adecuada presión de perfusión sanguínea, el cerebro controla su propio flujo sanguíneo cerebral (FSC); a este fenómeno se le conoce como autorregulación cerebral [7]. El FSC normal tiene un valor promedio de 50-60ml/100g/min lo cual garantiza un suministro continuo y adecuado de oxígeno y de glucosa para llevar a cabo sus funciones. En general cuando el FSC se reduce de manera importante, el cerebro corre el riesgo de sufrir diversas alteraciones [1]. De hecho se ha mostrado que la actividad eléctrica evocada y espontánea cesa cuando el FSC se encuentra por debajo del 25%; ocurriendo así daño neuronal [1]. No obstante que el desencadenante primario del daño por isquemia es la reducción del FSC, la restitución del mismo no siempre permite la recuperación completa de las alteraciones celulares provocadas por la isquemia; en cambio puede ocurrir daño adicional por reperusión [9].

En la enfermedad cerebrovascular isquémica, la interrupción del flujo sanguíneo en la forma global o en una región encefálica específica, produce patrones característicos de déficit neurológico debido a la pérdida de las funciones controladas por las estructuras cerebrales afectadas [10].

La isquemia focal es el resultado de la oclusión de una rama arterial, usualmente de 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. Por otro lado la isquemia global se asocia con sucesos como el infarto cardiaco o hipotensión severa dando como resultado la hipoperfusión del cerebro completo con la ausencia de flujo colateral al tejido isquémico. En consecuencia diversas funciones cerebrales se verán alteradas [11,12].

Debido a isquemia cerebral global aguda se ha identificado un patrón de vulnerabilidad celular característico; destacando como muy vulnerables las células piramidales de la región CA1 e hilus del hipocampo, seguidas de las células piramidales de las capa III y V de la corteza cerebral, las células de Purkinje del cerebelo; células medianamente vulnerables como las células de tamaño medio y pequeño del cuerpo estriado, y células poco vulnerables como las células granulares del giro dentado y las neuronas de las capas II y IV de la corteza cerebral [13]. Estas estructuras cerebrales más vulnerables, (hipocampo, corteza cerebral, cuerpo estriado y cerebelo) participan de manera importante en la integración de funciones cognitivas [14].

Las evidencias obtenidas en los modelos experimentales de isquemia cerebral focal [15] o global [16,17] han permitido conocer los fenómenos celulares involucrados en las alteraciones y el daño neuronal irreversible inducidos por la isquemia.

Fisiopatología de la Isquemia Cerebral

El evento isquémico consiste en la interrupción permanente o transitoria del suministro de oxígeno y glucosa en el cerebro, ambos utilizados en la síntesis de adenosina de trifosfato (ATP) [18]. La reducción del aporte de oxígeno desencadena, el metabolismo anaerobio de la glucosa que conduce a la producción de ácido láctico y acidosis tisular [19].

La suspensión de los gradientes iónicos transmembranales debido a la falla de los mecanismos de transporte activo de iones, dependientes de energía son el punto de

partida de diversos mecanismos fisiopatológicos de muerte neuronal [20]. Las neuronas y las células gliales se despolarizan exageradamente por la entrada de Na^+ , Cl^- , Ca^{+2} y agua al citoplasma; además de la salida de K^+ , produciéndose un incremento anormal de éste ión en el espacio extracelular [21].

Excitotoxicidad.

La liberación anormal y excesiva del glutamato luego de la despolarización anóxica, resultante de la pérdida de los gradientes y el ingreso anormal de Na^+ y Ca^{+2} a las células nerviosas; así como la activación de los receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido α -amino-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) por el glutamato (cuya recaptura no puede realizarse en ausencia o deficiencia de energía), determinan el ingreso adicional de Ca^{+2} , la persistencia de condiciones eléctricas anormales, e ingreso de Ca^{+2} a través de canales dependientes de voltaje [22]. Estos fenómenos contribuyen a la presencia de una cantidad anormalmente grande de Ca^{+2} intracelular, capaz de activar mecanismos de daño y muerte neuronal que caracterizan al fenómeno de excitotoxicidad [18].

Papel del Ca^{2+} en el daño celular por isquemia.

La entrada de calcio en las neuronas postsinápticas a través de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos y los ionóforos de Ca^{2+} dependientes de voltaje puede activar la fosfolipasa A_2 (PLA2), la fosfolipasa C- β , calpaínas, y la proteína cinasa II calcio calmodulina (CaMKII) y endonucleasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

La activación de la PLA2 dependiente de calcio en condiciones de isquemia/reperfusión da lugar a la degradación de fosfolípidos de membrana y a la liberación de ácidos grasos como el ácido araquidónico. En primer lugar, la ruptura de los fosfolípidos de membrana modifica la estructura molecular de la membrana lipídica, con las consecuentes alteraciones de los mecanismos de permeabilidad selectiva y homeostasis iónica membranales [23, 24, 25]. En segundo lugar, el ácido araquidónico resultante de la hidrólisis de fosfolípidos puede ser convertido por acción de las enzimas ciclooxigenasa o lipooxigenasa en derivados de icosanoides como las prostaglandinas, los leucotrienos y los tromboxanos; compuestos que pueden causar, aumento del tono del músculo liso vascular y fenómenos pro-inflamatorios con la consiguiente alteración de la regulación del flujo sanguíneo en regiones cerebrales específica [18,25,26]. Por otra parte, en el proceso de formación de estos

eicosanoides se producen especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la pérdida de la integridad de la membrana. Así mismo, la activación de fosfolipasa C-β por Ca^{2+} , trae como consecuencia la liberación de inositol trifosfato (IP_3) y diacil glicerol (DAG) provenientes de los fosfolípidos de membrana. El IP_3 , al unirse a canales liberadores de Ca^{2+} sensibles a IP_3 situados en el retículo endoplásmico uno de los principales reservorios de este catión en la célula, ocasiona la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma celular.

El DAG, es capaz de activar a una proteína cinasa C que activa una cascada de fosforilaciones mediante la cual ocasiona la activación de una serie de moléculas de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Así como, la fosforilación de IκB, la cual, libera a la proteína reguladora de genes NF-κB (factor nuclear κB) que forman parte de mecanismos celulares proapoptóticos.

La activación anormal de calpaínas por Ca^{2+} induce la segmentación anormal de proteínas importantes (espectrina, fodrina, Ca^{2+} - ATPasa, proteína cinasa C y factor nuclear kappa B, NF-κB) para el funcionamiento celular, la remodelación dendrítica, el transporte membranar, la modulación de la expresión génica y la degeneración neuronal [18]. La activación de la proteína cinasa II dependiente del complejo calcio/calmodulina (CaMKII), por el Ca^{2+} que ingresa masivamente, se ha observado en neuronas de la corteza cerebral e hipocampo luego de isquemia cerebral. A partir de la activación de CaMKII, pueden ser activadas una serie de moléculas de la familia de proteínas cinasas MAPKs, las cuales una vez activadas, actúan como mediadores en la ejecución del programa de apoptosis neuronal [18].

Asimismo, la activación de CaMKII por el Ca^{2+} puede originar el desarreglo estructural del citoesqueleto y favorecer de esta manera el daño neuronal [27]. La activación de endonucleasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, da lugar a la fragmentación internucleosomal del DNA en segmentos formados por pares de bases en números múltiples de 200 [18].

Radicales Libres

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón no apareado en los orbitales del oxígeno; por tener un electrón de más se les confiere un gran poder oxidativo destacándose su grado de toxicidad [28]. Los radicales libres, tanto las especies reactivas de oxígeno (ROS) como los de nitrógeno (RNS) participan en procesos de daño por isquemia en el sistema nervioso central los cuales han sido

extensamente estudiados [21, 29, 30]. En condiciones normales, la reducción escalonada del O_2 ocurre a través de varios metabolitos intermediarios ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot}$) denominados especies reactivas de oxígeno. Esta reacción procesa el O_2 que ingresa a la mitocondria hasta la formación de agua, excepto una fracción del orden del 1-2 % del oxígeno que se transforman en ROS, los cuales parecen ser parte de las señales involucradas en el control del balance de los procesos celulares de óxido-reducción [31].

Las características de reactividad química de los ROS les confiere la potencialidad de dañar por sí mismos estructuras químicas celulares importantes, tales como proteínas, lípidos y DNA; o mediante su interacción con metales, particularmente hierro, que da por resultado la formación del radical OH^{\cdot} , altamente reactivo y citotóxico.

De aquí la importancia de la operación de los mecanismos celulares, enzimáticos y no enzimáticos, involucrados normalmente en el control de la producción y manejo de ROS [30-33]. De esta manera, diversas enzimas antioxidantes que incluyen superóxido dismutasas (SOD) SOD-Zn²⁺/Cu²⁺ localizada en el citoplasma y SOD-Mn³⁺ en la mitocondria, catalasas y peroxidasas. En el cerebro la glutatión peroxidasa (GPx) es considerada más importante que la catalasa debido a la baja actividad de esta última enzima en la mayoría de las regiones cerebrales [34]. Estas enzimas antioxidantes participan en la conversión inmediata de ROS en compuestos tales como peróxido de hidrógeno, oxígeno molecular y agua [31,35]. Por otro lado, la presencia de compuestos antioxidantes exógenos o endógenos tales como las vitaminas E (alfa-tocoferol), A (beta- carotenos) y C (ascorbato), glutatión en su forma reducida (GSH), o melatonina, también forman parte de los mecanismos celulares antioxidantes [34, 35].

Así mismo, los radicales libres forman parte importante de los mecanismos fisiopatológicos de daño en condiciones de isquemia/reperfusión cerebral. Se ha descrito que la restauración del suministro de oxígeno y glucosa durante la reperfusión de las regiones cerebrales expuestas a la isquemia global o focal, puede rebasar la capacidad de manejo metabólico mitocondrial del oxígeno y llevar a la activación de reacciones enzimáticas generadoras de ROS (xantina deshidrogenasa \rightarrow xantina oxidasa) por lo que la producción anormal de radicales libres puede dar lugar a la insuficiencia de los mecanismos celulares antioxidantes y dejar expuestos diversos constituyentes de la célula, (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) a las acciones tóxicas de ROS [30, 35].

Las características bioquímicas del sistema nervioso, lo hacen particularmente susceptible al daño mediado por ROS [36]. Las concentraciones celulares elevadas de hierro no unido al grupo hemo y a la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados cuyos dobles enlaces son notablemente susceptibles al daño por radicales libres, contribuyen a su mayor vulnerabilidad al daño post-isquemia [36].

Asimismo, el óxido nítrico (NO^\bullet) es sintetizado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y por la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), ambas enzimas constitutivas y dependientes de calcio y calmodulina; y por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), no dependiente de calcio y calmodulina. La nNOS es activada por el complejo calcio-calmodulina después de que se produce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , resultado de la excitotoxicidad. El NO^\bullet , una vez sintetizado, tiene la posibilidad de formar RNS, especialmente peroxinitrito (ONOO^-) al reaccionar con el radical superóxido. Esto, le confieren importancia al NO^\bullet , entre los posibles mecanismos de daño neuronal post-isquemia (nitrición de ADN y proteínas), dependientes de la formación y la actividad de radicales libres [8, 18, 37, 38].

Disfunción mitocondrial.

En condiciones normales, la fosforilación oxidativa mitocondrial es la principal vía de síntesis de ATP en eucariontes. En este proceso, los electrones liberados a partir de los sustratos son transferidos al O_2 mediante los complejos enzimáticos (I-IV) que constituyen la cadena de transporte de electrones. La actividad de estos complejos provoca un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial y la energía electroquímica de este gradiente es entonces usada para impulsar la síntesis de ATP por el complejo V (ATP Sintasa) [31].

Las consecuencias de la isquemia cerebral y la reperfusión sobre la estructura y el funcionamiento mitocondrial de las células nerviosas incluyen alteraciones metabólicas, estrés oxidativo, alteración de los mecanismos mitocondriales de control de la concentración de Ca^{2+} , e inducción de mecanismos pro-apoptóticos. De hecho, se han mostrado evidencias de muerte neuronal por apoptosis luego de isquemia global o focal en diversos tipos neuronales vulnerables que forman parte de estructuras cerebrales específicas [39-42].

En condiciones normales el calcio citoplásmico que ingresa normalmente a la mitocondria mediante un sistema de transporte unidireccional, favorecido por el potencial de membrana negativo ($\Delta\psi_m$) de la mitocondria, tiene un papel importante

para las características del funcionamiento mitocondrial al participar en la activación alostérica de diversas enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa, tales como piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa y ATP sintasa [43,44].

Sin embargo, en condiciones de isquemia/reperfusión, el incremento anormal de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial da por resultado despolarización de la membrana mitocondrial, inhibición de la fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP, e incremento de la producción de ROS.

Por otra parte, el incremento anormal del Ca^{2+} intramitocondrial y las acciones de ROS promueven la apertura de poros de permeabilidad transitoria (PT), la liberación y translocación del citocromo c desde la membrana interna de la mitocondria hacia el citoplasma con la consiguiente formación de apoptosomas y activación de moléculas pro-apoptóticas [31, 45-47].

La disminución de la síntesis de ATP resultante de la disfunción mitocondrial inducida por la isquemia interfiere con la operación de aquellos sistemas de transporte activo de Ca^{2+} dependientes de ATP, intensificando la acumulación de Ca^{2+} y propiciando el daño y la muerte celular al través de mecanismos dependientes de Ca^{2+} . Se ha considerado a la integridad estructural y funcional de la mitocondria como factores de la mayor importancia para la ejecución de las funciones celulares en condiciones normales; así como a las alteraciones del funcionamiento mitocondrial como elementos clave para el daño y la muerte neuronal, en el curso de diversas situaciones fisiopatológicas cerebrales [31, 43, 48].

Apoptosis

Las causas de muerte posterior a isquemia pueden ser apoptosis o necrosis. La apoptosis es responsable del más del 50% de la muerte celular por isquemia. Se han identificado tanto señales intracelulares como extracelulares que inician este proceso. No hay duda, que la disfunción mitocondrial origina las señales intracelulares para apoptosis mientras que las señales extracelulares involucran la activación de la familia de receptores TNF. Los mecanismos que llevan a la muerte celular por apoptosis son complejos e implican la participación de diferentes vías como la del factor nuclear kappa B (NFkB), la vía dependiente de p53, y la activación de diversos genes proapoptóticos. La inducción de estos factores lleva a la formación de caspasas, las cuales están presentes en las células como proenzimas y son segmentadas a su forma activa por otras caspasas. La vía de las caspasas

requiere de la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de la procaspasa 9. A partir de este punto, se activa una serie de caspasas en cascada, que culmina con la caspasa 3 efectora. Esta ultima, activa enzimas que cortan el ADN (endonucleasas) y enzimas de reparacion del ADN como PARP (poliADP- ribosa polimerasa), llevando al final al rompimiento de ADN y muerte celular [49].

NEUROPROTECCION

A partir de la acumulación de evidencias acerca de las características y el curso temporal de los procesos fisiopatológicos celulares, inducidos por la isquemia, que dan lugar a la muerte de neuronas vulnerables, por necrosis y/o apoptosis, al daño irreversible de estructuras cerebrales y a las alteraciones funcionales correspondientes, se ha propuesto la existencia de una “ventana de oportunidad terapéutica” que permite intervenir exitosamente en la prevención y reducción del daño neuronal [50]. Los procedimientos de neuroprotección abarcan propuestas farmacológicas y no farmacológicas dirigidas a las células nerviosas que forman parte del SNC alteradas por condiciones tales como la isquemia, el trauma o la hemorragia [51,52]; 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 Huntington, entre otras) y de las alteraciones cerebrales asociadas al envejecimiento. [43, 53-55].

En procesos fisiopatológicos agudos, como la isquemia global o focal, el trauma o la hemorragia cerebrales, la “ventana de oportunidad terapéutica”, es un periodo (usualmente unas cuantas horas) [56] comprendido desde el inicio de la exposición de las estructuras del SNC a estas condiciones y el 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 celulares conducentes a muerte neuronal. Cada uno de éstos puede adquirir en un momento dado 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 consiguiente reducción del daño neuronal correspondiente [52, 53, 57].

Sin embargo, se ha identificado una problemática a resolver en función de la eficacia y seguridad de la neuroprotección, que incluye: la multiplicidad de procesos celulares que deberían ser contrarrestados para prevenir o reducir el daño cerebral; la relación temporal de la implementación del procedimiento neuroprotector con la “ventana de oportunidad terapéutica” correspondiente a uno o varios mecanismos de daño

cerebral (minutos a horas para necrosis, días a semanas para apoptosis). Así mismo, establecer las dosis y esquemas de administración de los fármacos neuroprotectores; que se establecen primeramente en base a evidencias obtenidas en modelos experimentales [49], para posteriormente sustentar su posible aplicación futura en seres humanos.

Las estrategias que se han seguido para la investigación experimental de los efectos neuroprotectores de diversos fármacos han tomado en cuenta estas consideraciones. De esta manera, la relación de oposición entre los mecanismos de acción farmacológica y la naturaleza de los procesos fisiopatológicos celulares conducentes al daño irreversible de las estructuras cerebrales vulnerables ha dado lugar a grupos de fármacos neuroprotectores: antagonistas de receptores glutamatérgicos [56, 57], calcio-antagonistas [58], antioxidantes [59, 60], anti-inflamatorios [53], antiapoptóticos [61], etc., entre otros. En este sentido se ha considerado relevante como parte de la estrategia de neuroprotección, a los fármacos que pueden contrarrestar varios mecanismos fisiopatológicos de daño mediante múltiples mecanismos de acción, como es el caso de algunos esteroides neuroactivos [62, 63], la melatonina [36, 64] y la Acetil-L-carnitina [65]. De ahí la sustentación de las propuestas para ensayos clínicos de neuroprotección basados en la administración de diferentes fármacos [66, 67].

Ante las evidencias de la participación de los radicales libres generados durante la isquemia transitoria y la reperfusión en la destrucción neuronal, la identificación de compuestos capaces de contrarrestar de una u otra forma los efectos nocivos de estos agentes oxidantes ha sido uno de los objetivos de la investigación en este campo. Para ello se han estudiado compuestos químicos identificados originalmente por su participación en procesos fisiológicos relevantes en los seres vivos [36, 55, 63, 68]; así como compuestos químicos de origen sintético [69, 70, 71], con el propósito de sustentar experimentalmente su eficacia y seguridad como neuroprotectores, lo mismo que sus características farmacocinéticas compatibles con su distribución en el sistema nervioso central. En general, estos estudios han confirmado experimentalmente la eficacia del uso de compuestos antioxidantes en la reducción del daño neuronal en condiciones de isquemia cerebral y reperfusión.

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina. Fig. 1), que es sintetizada en la glándula pineal, tiene un patrón circádico de secreción relacionado estrechamente con los ciclos luz /oscuridad. Así, las concentraciones plasmáticas de la melatonina en individuos jóvenes son mínimas durante el día y alcanzan un máximo durante la

noche (rata macho Wistar, 3 meses de edad: 35 pg/ml a las 16:00 h; 198 pg/ml a las 02:00 h. Seres humanos: 10.0 pg/ml a las 16:00 h; 200 pg/ml a las 02:00 h) [72, 73].

Se ha observado que los valores de secreción máxima nocturna se reducen progresivamente con la edad (40.0 pg/ml a los 51-55 años; 20 pg/ml a los 82-86 años) [32].

La melatonina posee propiedades antioxidantes [64, 74-77], las cuales han generado un interés particular en el estudio de sus efectos neuroprotectores debido a sus características fisicoquímicas favorables para su ubicación en los compartimentos intracelulares y extracelulares en el SNC [78-80]; así como por sus efectos en contra del daño cerebral por estrés oxidativo [35, 64, 74, 77], incluyendo el resultante de la isquemia cerebral [36, 81, 82, 83].

La eficacia de la melatonina como neuroprotector, tanto en concentraciones fisiológicas [84-86] como en concentraciones suprafisiológicas, ha sido sustentada por evidencias obtenidas en modelos experimentales de isquemia focal [36, 55, 83, 87, 88] y en modelos experimentales de isquemia global [81, 82, 87] y se ha explicado como debida principalmente a la actividad de la melatonina como atrapador de radicales libres, a la activación de enzimas que reducen la producción y la acumulación anormal de ROS [65, 73, 77, 90-92] y a la preservación de la eficiencia de los procesos mitocondriales que operan en contra del estrés oxidativo y de los mecanismos pro-apoptóticos [93-95].

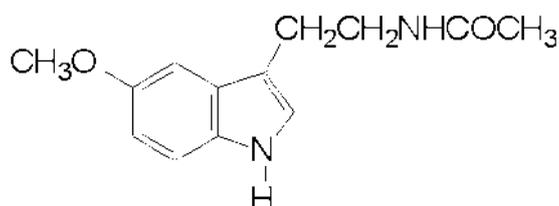


Figura 1. Estructura molecular de N-acetil-5-metoxi-triptamina, comúnmente conocida como melatonina.

La melatonina, al igual que otros derivados del indol y metabolitos del triptofano posee propiedades de oxidorreducción debido a la presencia de un sistema aromático rico en electrones que permite a la indolamina funcionar como molécula donadora de electrones. Adicionalmente la presencia de radicales metoxy y N-acetilo le confieren características de molécula anfifílica. Se ha sugerido que estas propiedades son las bases moleculares que sustentan la capacidad antioxidante de la melatonina en los diferentes compartimentos subcelulares [96].

Algunos de los efectos neuroprotectores de la melatonina pueden ser mediados o amplificados por algunos de sus metabolitos. La cascada antioxidante resultante de la actividad sucesiva atrapadora de radicales libres de la melatonina y sus metabolitos pueden dar lugar a una característica importante de la melatonina en comparación con otros antioxidantes con efecto neuroprotector. Múltiples acciones neuroprotectoras en contra del daño inducido por isquemia/reperfusión pueden ser ejercidos por los principales metabolitos de la melatonina tal es el caso de N¹-acetil-N²-formil-5 metoxi kinuramina (AFMK), N¹-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) y 3-ciclo hidroxí melatonina que favorecen la reducción de la peroxidación lipídica ejercida por la producción excesiva ROS (H₂O₂, HO·, oxígeno singulete, HOCl) y enzimas que sintetizan el óxido nítrico (NOS) como el NO· y ONOO· [97-101]. El AMK y la 6-hidroximelatonina, como precursores de la melatonina, promueven la actividad mitocondrial del complejo I (deshidrogenada de NADH) elevando la producción de ATP y del complejo IV (oxidasa de citocromo) de la cadena de transporte de electrones favoreciendo la normalización del manejo de los radicales libres en condiciones de isquemia, en contra de la liberación del citocromo c y la subsecuente activación de mecanismos proapoptóticos. [101-103]. Así también, el AMK y el AFMK reducen los fenómenos pro-inflamatorios inducidos por la isquemia mediante el incremento anormal de la concentración y la actividad de la COX 2, así como la acumulación de polimorfonucleares y sus acciones enzimáticas oxidantes en estructuras cerebrales expuestas a la isquemia [93, 95, 97-99, 101-104].

También se han propuesto como mecanismos de neuroprotección de la melatonina al antagonismo para la formación de complejos calcio-calmodulina involucrados en el proceso del desarreglo estructural del citoesqueleto neuronal inducido por la isquemia [105, 106].

Diversas investigaciones han abordado el estudio de los efectos neuroprotectores de la melatonina contra el daño neuronal inducido por isquemia cerebral focal o global en estructuras cerebrales vulnerables, principalmente a través de la evaluación de parámetros morfológicos y funcionales a corto plazo [87, 89, 107]. La evidencia experimental de los efectos neuroprotectores de la melatonina contra el daño provocado por isquemia cerebral focal aguda incluyen: la reducción del volumen del infarto y de la zona de penumbra isquémica resultantes de la oclusión de la arteria cerebral media [86, 108-112], la reducción de la despoblación neuronal en estructuras cerebrales vulnerables afectadas por la isquemia [113, 114], la disminución de la generación de radicales libres y de la lipoperoxidación subsecuente [110, 115, 116], la reducción de la expresión y la síntesis de compuestos químicos involucrados en los

procesos celulares de apoptosis [114, 117], así como la reducción significativa de las alteraciones neurológicas post-isquemia [110].

Se ha mostrado que el tratamiento con dosis altas de melatonina (10mg/ kg) administrado inmediatamente antes o inmediatamente después del episodio de isquemia, en dosis única, dosis múltiple o en infusión continua, reduce significativamente la producción de radicales libres y la lipoperoxidación consecuente, la muerte de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo especialmente de la región CA1; así como las alteraciones neurológicas y conductuales post-isquemia [81, 82].

En particular, se ha sugerido que el tratamiento con melatonina, 10 mg/ kg/ h, en forma de infusión continua intravenosa (iv) durante las 6 h inmediatas siguientes a un período de 15 a 19 min de isquemia cerebral global aguda inducida, coincide con una ventana de oportunidad terapéutica durante la cual la melatonina ejercería, durante un período crítico para el daño cerebral post-isquemia, diversas acciones en contra de mecanismos fisiopatológicos relevantes para el daño cerebral [118]. En este estudio, la evidencia del efecto neuroprotector del tratamiento con melatonina consistió en la preservación de más del 80% de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon y la preservación casi normal de la memoria de referencia espacial, así como también cambios en la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo como fue la disminución del patrón de arborización dendrítica, de la densidad de espinas dendríticas y cambios en la proporción de espinas en hongo y delgadas [119].

Por otra parte, dado que las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia cerebral global aguda, (hipocampo, neocorteza, cuerpo estriado – núcleo caudado, putamen, estriado ventral - y cerebelo) participan de manera importante en la integración de las funciones cognitivas, las características de diversas modalidades de aprendizaje y memoria han sido utilizadas como indicadores de la lesión y/o alteración funcional de las estructuras cerebrales involucradas [120, 121]. Se sabe que un gran porcentaje de pacientes que sobreviven a un paro cardíaco y a la isquemia cerebral consecutiva han presentado alteraciones del aprendizaje y de la memoria para eventos ocurridos después del episodio isquémico [122, 123], que pueden relacionarse con el daño severo del hipocampo, especialmente en la región CA1, observado en estudios post mortem en este tipo de pacientes [124, 125]. Cabe señalar que las neuronas piramidales ubicadas en los segmentos del cuerno de Ammon del hipocampo y en las capas III y V de la corteza cerebral están incluidas

entre las neuronas más vulnerables a la isquemia, tanto en seres humanos como en animales de experimentación [120-126].

ANTECEDENTES

Datos recientes en nuestro laboratorio muestran que no obstante la preservación de más del 80% de neuronas del Cuerno Amonn del hipocampo y la ejecución casi normal de las pruebas de memoria de referencia espacial [118] hay cambios en la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la región CA1; tales como: disminución de la arborización dendrítica, de la densidad de espinas dendríticas, y cambios en la proporción de espinas en hongo y delgadas [119]. Así mismo, los resultados obtenidos recientemente [118] muestran que tanto los animales isquémicos tratados con melatonina como los tratados con vehículo, no presentan pérdida significativa del número de neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal. Sin embargo, en ambos grupos la ejecución de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial de trabajo en laberinto radial de 8 brazos de Olton, fueron deficientes en comparación con los animales control.

Un importante mecanismo que contribuye a la recuperación funcional después del daño neuronal es la plasticidad cerebral, la cual se pone de manifiesto por la reorganización anatómica y funcional del sistema nervioso central. El término plasticidad se refiere a los fenómenos que regulan la capacidad del sistema nervioso central de cambiar, en respuesta a daño cerebral. Entre los cambios plásticos observados después de la isquemia cerebral se encuentra la integración de vías neurales alternativas que toman la función de otras vías que han sido dañadas [127], cambios en las características de las arborizaciones dendríticas, de la sinaptogénesis [128-136] y la activación de una variedad de procesos promotores del crecimiento neuronal, en las neuronas remanentes de las estructuras vulnerables a la isquemia, probablemente como cambios adaptativos que contribuyen al establecimiento de condiciones que favorecen la plasticidad sináptica y la recuperación funcional [137, 138].

Se ha encontrado evidencia de que en las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza sensitivo motora de la rata, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda, presentan fenómenos de reorganización plástica continua, progresiva, a largo plazo, del árbol dendrítico y de las espinas dendríticas tanto de la capa III como de la capa V de la corteza sensitivo motora [139-141].

En la rata, la corteza prefrontal se define como la parte del lóbulo frontal que recibe proyecciones del núcleo mediodorsal del tálamo, [142, 143] la cual está constituida por dos regiones diferentes, un área dorsomedial y un área ventromedial. El área

dorsomedial de la corteza prefrontal esta constituida por la corteza precentral medial y la corteza del cíngulo dorsal anterior; y el área ventromedial esta constituida por la corteza prelimbica y la corteza infralimbica [143]. En primates y humanos, la corteza prefrontal puede dividirse en tres regiones principales: orbital, medial y dorsolateral. La región orbital y la región medial estan involucradas en el comportamiento emocional y la region dorsolateral, la cual es la más desarrollada en humanos, proporciona un sostenimiento cognitivo de la organización temporal del comportamiento, del habla y del razonamiento [144].

De acuerdo a estudios neuroanatómicos la CPF medial de la rata (figura 2) es considerada como el área homologa a la CPF dorsolateral del primate [145].

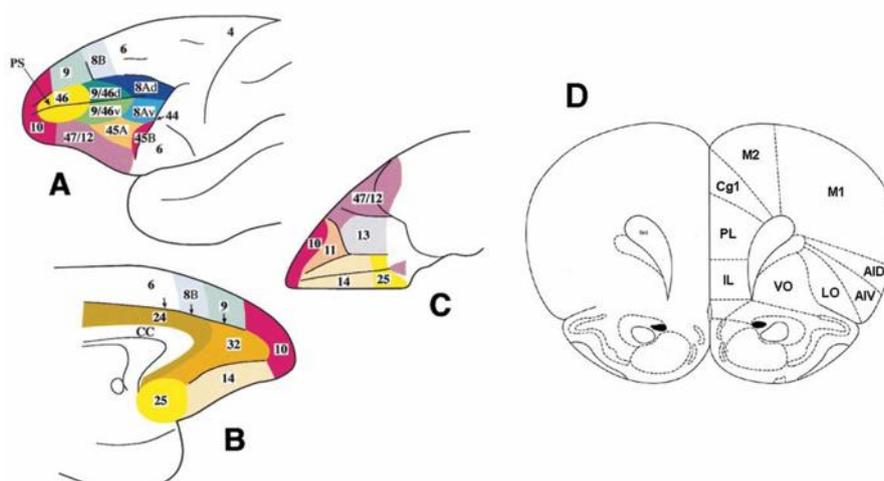


Figura 2. Estructura de la corteza prefrontal de mono y rata. Vista lateral (A), vista medial (B), vista inferior (C) de la corteza prefrontal de mono (actualización de Petrides y Pandya (1994) del mapa de Brodmann). D) Vista coronal de la corteza prefrontal de rata (+3.2 mm anterior a bregma, atlas de Paxinos y Watson, 1998). Área lateral: AID y AIV, corteza agranular insular dorsal y ventral; área ventral: VO y LO, corteza orbital ventral y lateral; área medial: Cg1, corteza cingulada; PL, corteza prelimbica; IL, corteza infralimbica. También se muestran las áreas motoras 1 y 2, M1 y M2. (tesisenxarxa.net.pdf)

Así, también la corteza prefrontal recibe fibras aferentes del tallo cerebral, el hipotálamo, el sistema límbico (amígdala e hipocampo) y otras áreas de la neocorteza. El tallo cerebral, el hipotálamo y las entradas límbicas probablemente llevan a la corteza prefrontal información acerca del medio interno; mientras que las aferencias del hipocampo son probablemente esenciales para la formación de memoria motora. A su vez, las aferencias a la corteza prefrontal, procedentes de la corteza posterior,

están aparentemente involucradas en la integración sensorial y motora a nivel superior [145, 146]. La gran cantidad de conexiones de la corteza prefrontal con estructuras corticales y subcorticales son recíprocas, con la excepción del estriado y el hipocampo [142].

Se han descrito neuronas en la CPF especializadas en la organización y el análisis de la información sensorial y temporal; la información de dicho estímulo es transferida hacia la corteza premotora para la codificación y la preparación del movimiento voluntario, y posteriormente a la corteza motora mediante fibras de asociación provenientes de las neuronas piramidales, fundamentalmente de la tercera capa cortical. Del área motora, las neuronas piramidales gigantes de la quinta capa proyectan sus axones que conforman un haz cortico-espinal para producir el movimiento voluntario, lo que permite que la evocación de recuerdos de eventos ocurridos previamente en el corto plazo sean organizados serialmente y se establezcan patrones de respuesta motriz adecuados. Debido a la fina remodelación y diferenciación, así como su topografía y conexiones que establecen, se ha propuesto que las neuronas piramidales de la capa III son las células directamente relacionadas con el procesamiento profrontocortical de funciones cognitivas [145].

En la rata la diferenciación entre las 5 capas de la CPF medial es compleja porque se trata de una zona muy empaquetada al lado de la línea media del cerebro. Según Swanson (1998) [147] se distinguen tan sólo cuatro: la capa I, II/III, V y VI. La capa I es la más fácil de delimitar ya que en ella no existen somas de neuronas piramidales [147]. El cuerpo de las neuronas piramidales se localiza principalmente en las capas II/III (pequeñas pirámides), V (grandes pirámides) y VI.

Las dendritas apicales de las neuronas piramidales se disponen perpendicularmente a la línea media y terminan en capa I.

Las neuronas piramidales son la población neuronal mayoritaria en la corteza (alrededor de un 75-80% del total) y son glutamatérgicas. A nivel morfológico, están constituidas por un soma de aproximadamente 25-50 μm de diámetro, un conjunto de dendritas basales que se encuentran cerca del soma y una dendrita apical, que proyecta hacia las capas superficiales. Gracias a esta dendrita apical las neuronas piramidales tienen la capacidad de captar la información que llega a través de las distintas capas corticales y una vez integrada emitir un impulso eléctrico hacia las áreas de proyección.

Existe una especificidad laminar en el tipo de proyecciones de la corteza frontal: las neuronas piramidales de las capas II/III tienden a proyectar a otras áreas de la corteza, las de la capa VI al tálamo y algunas zonas corticales y son principalmente

las neuronas piramidales de capa V las que canalizan la señal de salida hacia la multitud de estructuras subcorticales [148].

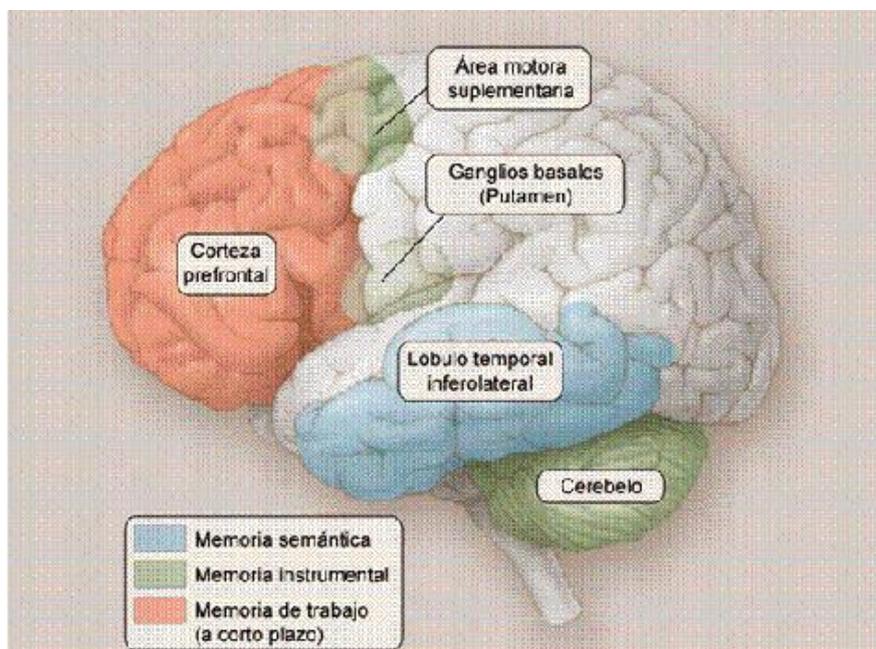


Figura 3. Representación esquématica de la corteza prefrontal. Tomada de Budson AE, Price BH. Memory dysfunction. N Engl Med. 2005; 352: 692-695.

La corteza prefrontal (figura 3) está encargada de la organización temporal de la conducta, pues participa en la seriación temporal de las acciones encaminadas a la resolución de tareas que requieren tanto de la orientación espacial como de la orientación no espacial; así como en la organización y planeación de respuestas; [149] también interviene en la organización del aprendizaje y la memoria a corto plazo [146, 150].

La memoria se ha conceptualizado como la capacidad de retener y de evocar eventos del pasado, mediante procesos neurobiológicos de almacenamiento y de la recuperación de la información, básica en el aprendizaje y en el pensamiento. Esta integrado por tres procesos básicos: 1) codificación de la información: es el proceso en el que se prepara la información para que se pueda almacenar, puede codificarse como una imagen, sonido, experiencias o acontecimientos. 2) almacenamiento de la información: esta etapa se caracteriza por el ordenamiento de la información mientras se desarrolla el proceso en curso. 3) evocación o recuperación de la información: es el proceso por el cual se recupera la información, si ésta ha sido bien almacenada será mas facil utilizarla en el momento en que se solicite [150].

Se ha pensado que la memoria de trabajo participa significativamente en funciones cognitivas como el pensamiento, la planeación, el razonamiento, en la toma de decisión y ejecución así como también en la comprensión del lenguaje [151].

El término memoria de trabajo, se originó en experimentos realizados por David Olton y Werner Honig en los 70's. Olton y Samuelson crearon una prueba para evaluar este tipo de memoria en roedores en un laberinto radial, el cual está constituido por una plataforma central octagonal y 8 brazos dispuestos de manera radial con una cavidad en su extremo distal [152].

Por lo que se ha descrito a la memoria de trabajo como un sistema neural de almacenamiento temporal a corto plazo [144, 149] que permite retener a la vez algunos datos de información en la mente, compararlos, contrastarlos, o en su lugar, relacionarlos entre sí. Se responsabiliza del almacenamiento a corto plazo, a la vez que manipula la información necesaria para los procesos cognitivos de alta complejidad; participa en por lo menos dos tipos de procesos: a) Control ejecutivo: hace referencia al mecanismo de procesamiento de la información, b) Sosténimiento activo: constituye el concepto de almacenamiento temporal [150, 151].

La corteza prefrontal está implicada en la integración de funciones cognitivas, tales como la memoria de trabajo [143, 144, 155-157]. También se ha mostrado que lesiones de la corteza prefrontal medial en la rata produce daño en la memoria de trabajo espacial, [143, 144, 153-156] el cual ha sido corroborado mediante la evaluación de pruebas conductuales en el laberinto radial de 8 brazos, de Olton y en el laberinto acuático de Morris [143, 155, 156].

También se han observado deficiencias en la memoria de trabajo en el laberinto radial de 8 brazos de Olton, después de un episodio de isquemia cerebral global aguda [157, 158].

Por otro lado, existen evidencias de que el segmento CA1 y el subículo de la formación hipocámpal envían proyecciones hacia la corteza prefrontal dorsomedial y ventromedial [156, 159], y algunas funciones dependen de la integridad de ambas estructuras; por ejemplo: tareas que requieren orden temporal [160]. Por lo que se ha sugerido que tanto el hipocampo como la corteza prefrontal están participando en procesos de memoria espacial dentro de un rango a corto plazo [156]. En ausencia de alguna de estas estructuras, ocurre un sistema compensatorio, donde una estructura toma el mando de la función para la resolución de tareas que requieren un orden temporal o a corto plazo, es decir, información que necesita ser almacenada por solo unos segundos. Sin embargo, una inactivación de ambas estructuras, da lugar al deterioro severo de la memoria de trabajo espacial a corto plazo, sugiriendo

que se requiere la integridad morfológica y funcional de ambas estructuras para el procesamiento neural de la memoria de trabajo espacial a corto plazo [156].

Se ha señalado que el mecanismo por el cual el sistema nervioso codifica, analiza y retiene la información es mediante modificaciones de la transmisión del impulso nervioso; por lo que se ha sugerido que cambios en la transmisión sináptica pueden alterar el flujo de la actividad cerebral y, consecuentemente la respuesta del organismo. Así, el aprendizaje es producto de modificaciones en la transmisión del impulso nervioso en sistemas neurales específicos; dicho cambio podría reflejar una mejora en el funcionamiento de circuitos neuronales, o bien dar lugar a la formación de conexiones nerviosas nuevas, por lo que se ha propuesto que el sustrato neuroanatómico en el que subyace la memoria está representado por las espinas dendríticas de regiones cerebrales involucradas en dicho proceso cognoscitivo [119].

Las espinas dendríticas fueron observadas por primera vez por Ramón y Cajal hace ya un siglo, cuando las describió como protuberancias de pequeño tamaño presentes en la superficie de las dendritas de las células de Purkinje del cerebelo, y las denominó con el nombre por el que actualmente las conocemos [161]. Estas pueden estar presentes en el soma neuronal, aunque generalmente se localizan en porciones específicas de la arborización dendrítica. Existen neuronas que no poseen espinas; en tales neuronas los contactos excitadores se establecen entre el elemento presináptico y porciones específicas del tronco dendrítico, aún así es claro que los contactos excitadores ocurren al menos en un 80% sobre espinas dendríticas [162].

Las espinas dendríticas son minúsculas protuberancias protoplásmicas que revisten la superficie de muchas neuronas y representan el sitio de contacto sináptico excitador en neuronas principales del hipocampo, la neocorteza y otras regiones cerebrales. [145, 163].

La morfología de las espinas varía considerablemente; por lo que se han clasificado en función de las características de su cuello y cabeza (figura 4 y 5) en: larga o delgada, forma en hongo, gorda, ramificada y doble o varicosa [145].

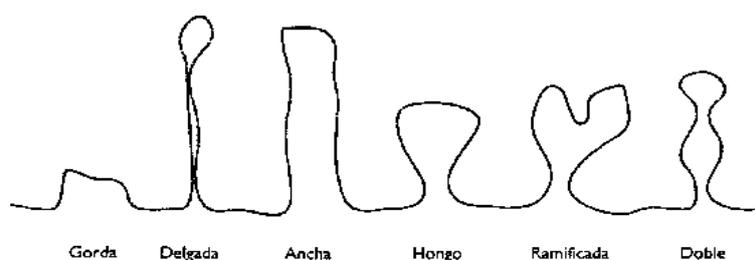


Figura 4. Composición de los diferentes tipos de espinas dendríticas.

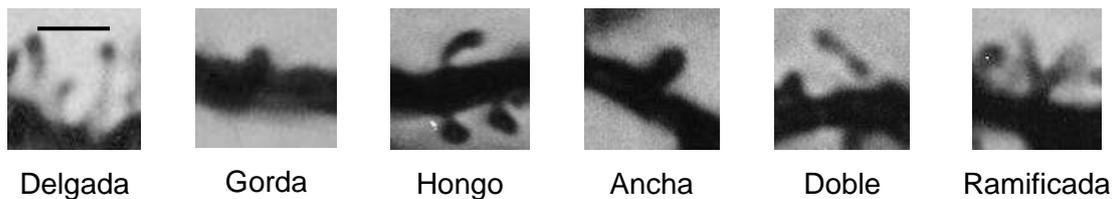


Figura 5. Microfotografías de los diferentes tipos de espinas. Escala 5 μ m.

El grado de longitud y ramificación dendrítica, así como la densidad, forma y distribución de las espinas dendríticas parece estar influenciada por una gran variedad de factores medioambientales como la desnutrición, la privación sensorial, el estrés, la denervación y por procesos de aprendizaje, entre otros [164]. Las espinas dendríticas representan el mayor sitio de contacto sináptico excitador en las neuronas y ocasionalmente forman sinapsis inhibitorias moduladoras, las cuales modifican la fuerza de entrada de la información excitadora [145, 164].

Dado que las espinas dendríticas están ampliamente asociadas con el flujo de información de tipo excitatorio, las sitúa idealmente como moduladores del procesamiento de información que fluye a través de diversas estructuras cerebrales como el hipocampo y la corteza cerebral entre otras [164, 165]; por lo que se ha propuesto que podrían estar implicadas en la formación de procesos de memoria [166].

Así también, la densidad de las espinas sobre las dendritas esta relacionada con el grado de conectividad entre las neuronas y los axones que pasan a través de sus arboles dendríticos [164].

En consecuencia parece importante estudiar la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de las capas III y V con objeto de investigar en isquemia con o sin tratamiento con melatonina da lugar a modificaciones en la citoarquitectura de dichas neuronas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Resultados obtenidos recientemente en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento neuroprotector con melatonina en animales sometidos a isquemia cerebral global aguda preserva la población neuronal del Cuerno de Amonn del hipocampo y las capacidades de aprendizaje y memoria espacial en ratas; sin embargo en estas condiciones las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Amonn del hipocampo presentan diferencias importantes en el número y características de las arborizaciones dendríticas, así como en la densidad de espinas dendríticas y en las proporciones de espinas delgadas y “en hongo”, en comparación con los animales control. Por otra parte en el estudio referido no se observaron modificaciones significativas del número de neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial; en los animales isquémicos con o sin tratamiento neuroprotector con melatonina; sin embargo la ejecución de estos animales en las pruebas de memoria de trabajo espacial en el laberinto radial de 8 brazos, de Olton fueron deficientes en comparación con la de los animales control. En vista de la importancia de la corteza prefrontal dorsomedial en la integración de la memoria de trabajo espacial ¿existen modificaciones de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial que pudieran estar asociadas a la ejecución deficiente de las pruebas de memoria de trabajo espacial?

HIPÓTESIS

Las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial: bifurcaciones dendríticas totales, longitud de la dendrita apical, longitud de la dendrita basal, densidad de espinas dendríticas, proporción relativa de los distintos tipos de espinas dendríticas y las características del soma, presentarán diferencias por efecto de la isquemia cerebral global aguda y del tratamiento neuroprotector con melatonina.

OBJETIVOS

Evaluar las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial (precentral medial y corteza del cíngulo) incluyendo: bifurcaciones dendríticas totales, longitud de la dendrita apical y longitud de dos dendritas basales, densidad de espinas dendríticas, proporción relativa de los distintos tipos de espinas y las características del soma; luego de isquemia cerebral global aguda, con o sin tratamiento neuroprotector con melatonina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicación NIH No. 80-23,1996) y la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-Z00-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social, México. Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

El estudio se realizó en ratas Sprague-Dawley con un peso de 320-400g al inicio de los procedimientos experimentales. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones ambientales controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

La melatonina (Sigma, St Louis, MO, USA) fue preparada para su administración mediante disolución en etanol absoluto y dilución con solución de NaCl al 0.9%, hasta una concentración final de 3.3 mg/ml, en una solución al 10% de etanol en solución salina. La ketamina, la xilacina y el pentobarbital sodico fueron obtenidos de preparaciones comerciales para uso veterinario.

Se utilizó el modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los 4 vasos (4VO) [167,168].

Las ratas se asignaron al azar a los siguientes grupos. Grupo 1: Control (n=5), Grupo 2: Isquemia + Melatonina (n=5), animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 min mediante 4VO y administración de melatonina 10 mg /kg/h en etanol al 10% en NaCl 0.9% iv, por un periodo de 6 h, a partir de los 30 minutos luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas, Grupo 3: Isquemia + Vehículo (n=5), animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 min mediante 4VO y administración del vehículo de melatonina (solución 10% etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo de 6 h, a partir de los 30 minutos luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas.

Al término de las evaluaciones de aprendizaje y memoria espacial (laberinto acuático de Morris, memoria de trabajo espacial en el laberinto radial de ocho brazos de Olton) y la recuperación del peso corporal (4 meses después del episodio de isquemia) las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35mg/kg) y perfundidas por vía intracardiaca con solución salina seguida por una solución de formol al 10% en

amortiguador de fosfatos. Se extrajeron los cerebros y se dejaron en inmersión en el mismo fijador por lo menos 2 días antes del procesamiento histológico.

Se hizo una evaluación poblacional neuronal de la capa III y V de la corteza prefrontal dorsomedial de cada animal por grupo, utilizando la técnica modificada de Golgi [169], la cual consistió en la fijación-induración de los bloques mediante la incubación de estos en una sal de cromo (dicromato de potasio 2% en 50ml), 10ml de formaldehído al 40% y 2.5ml de ácido acético glacial a 25°C/48 h en total oscuridad. Una vez fijado el tejido, se incubó en una sal de plata (nitrato de plata 0.75% en 50 ml de agua desionizada). El bloque de tejido fijado e impregnado se cortó, obteniéndose cortes coronales de 125 μ m de espesor en un micrótopo de deslizamiento. Se estudiaron 6 neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal dorsomedial por animal, dichas neuronas se evaluaron bajo las siguientes variables: bifurcaciones dendríticas totales, longitud de la dendrita apical, longitud de la dendrita basal, densidad de espinas dendríticas oblicuas de cada dendrita, proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas y caracterización del soma.

Para la evaluación del número total de bifurcaciones dendríticas de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial se contaron las bifurcaciones dendríticas totales a una amplificación de 630 aumentos en un microscopio óptico.

Para evaluar la longitud de la dendrita apical (μ m) y la longitud de dos dendritas basales (μ m) de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial se utilizó el método de Sholl, el cual consiste en la medición aproximada de la longitud de las dendritas de acuerdo con la ubicación de su extremo distal en un conjunto de 7 anillos concéntricos con una separación de 40 μ m entre anillos adyacentes. Para ello se utilizó un Sistema Analizador de Imágenes (Perception Analysis System by Human-Computer Interface, Cambridge, UK) con una amplificación de 100 aumentos (10X).

Para evaluar la densidad de espinas de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal; de la dendrita apical desde su última bifurcación se tomó una dendrita oblicua la cual se dividió en dos segmentos iguales, se delimitó en cualquiera de ellos una extensión de 50 μ m a partir del punto medio, se contaron las espinas dendríticas y se identificaron sus diferentes tipos (delgada, gorda, hongo, ancha, ramificada y doble). Así también, de la dendrita basal se tomó una dendrita oblicua la cual se dividió en dos segmentos iguales, se delimitó en cualquiera de ellos 50 μ m a partir del punto medio, se contaron las espinas dendríticas y se identificaron sus diferentes tipos. Lo anterior se realizó a una amplificación de 2000 aumentos en un

microscopio óptico, mediante la utilización de un contador granulométrico para el conteo de los diferentes tipos de espinas y el total de éstas.

Para la evaluación de las características del soma de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial se midieron: el área (μm^2), el perímetro (μm), la distancia mayor del centro del soma a la periferia (longest dimension μm), el factor forma, el diámetro esférico (μm) y el volumen esférico (μm^3) mediante un Sistema Analizador de Imágenes (Perception Analysis System by Human-Computer Interface, Cambridge, UK) con una amplificación de 100 aumentos (10X).

El análisis estadístico se realizó usando el análisis de varianza (ANOVA), la prueba *post hoc* de Tuckey, donde el valor aceptable de significancia fue menor o igual a 0.05; así también se utilizó la corrección de Bonferroni para la evaluación en la proporción de los diferentes tipos de espinas.

RESULTADOS

Resultados obtenidos recientemente en el laboratorio, [118] muestran que tanto los animales isquémicos tratados con melatonina como los tratados con vehículo, no presentan pérdida significativa del número de neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial (figura 6).

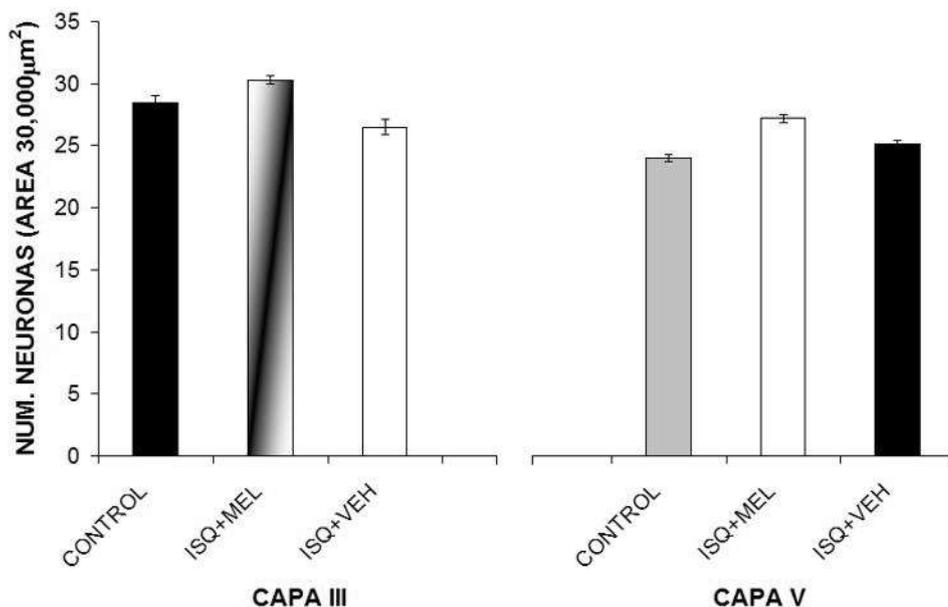


Figura 6. Población de neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial en un área de 30,000 μm^2 de los grupos Control, Isq+Mel e Isq+Veh. La población de neuronas piramidales no difirió en las diferentes condiciones experimentales [118].

En el presente estudio se observó que el número de bifurcaciones dendríticas totales de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal dorsomedial fueron significativamente menores en el grupo Isq+Veh (11.5 ± 1.13) que el grupo Control (14.6 ± 0.77) y en el grupo Isq+Mel (14.16 ± 0.12 Media \pm EE); en tanto que no se observaron diferencias significativas entre los grupos Control e Isq+Mel (figura 7 y 8).

Las bifurcaciones dendríticas totales de las neuronas piramidales de la capa III (figura 7 y 8) de la corteza prefrontal dorsomedial no mostraron diferencias significativas en las diferentes condiciones experimentales (grupo Control: 10.6 ± 0.61 ; grupo Isq+Mel: 10.6 ± 0.20 y grupo Isq +Veh: 9 ± 0.92 Media \pm EE).

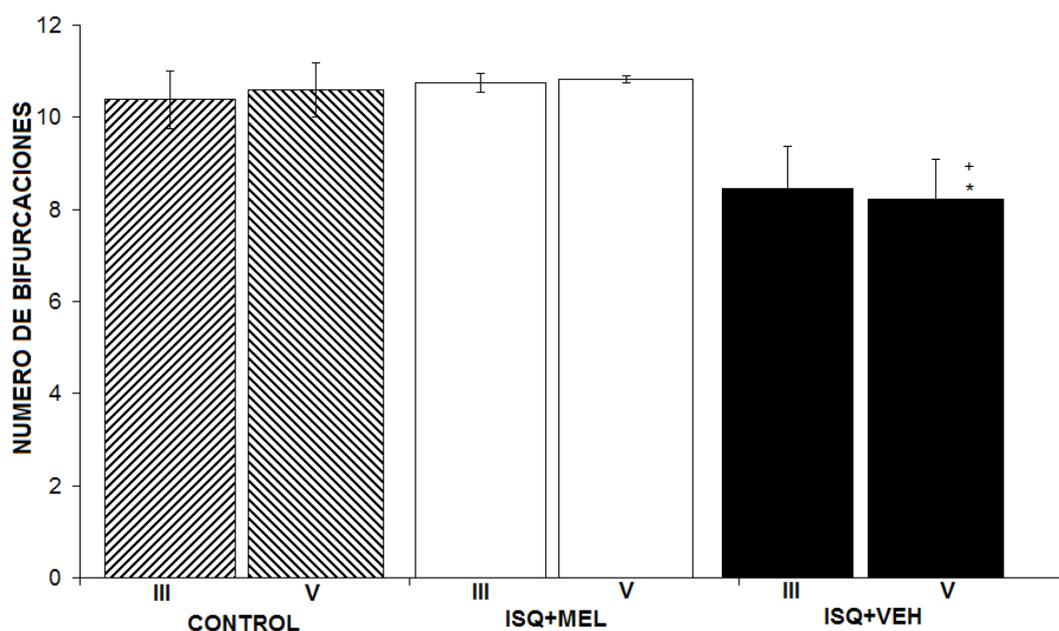


Figura 7. Número total de bifurcaciones dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal dorsomedial. Puede observarse la reducción significativa del número de bifurcaciones dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V en el grupo Isq+Veh en comparación con los grupos Control e Isq+Mel, mientras que el número de bifurcaciones dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III no difirió en las diferentes condiciones experimentales. * $p < 0.05$: Isq+Veh Vs. grupo Control, + $p < 0.05$: Isq+Mel Vs. Isq+Veh.

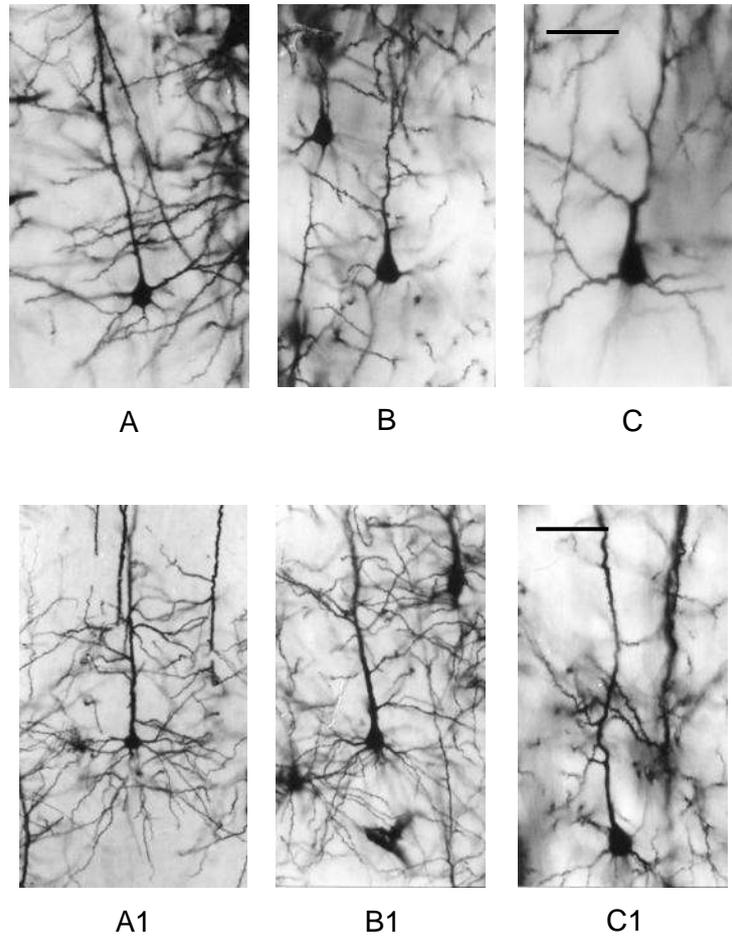


Figura 8. Microfotografías de neuronas piramidales de la corteza prefrontal dorsomedial de las capas III y V de los grupos Control (A, A1), isquémico tratado con melatonina (Isq+ Mel; B, B1), isquémico tratado con vehículo (Isq+Veh; C, C1), las cuales muestran los diferentes formas de sus arborizaciones dendríticas. Escala = 50 μm

La tabla 1 muestra los resultados de la longitud aproximada de la dendrita apical y la longitud aproximada de dos dendritas basales de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal, en donde no se observaron diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales.

Tabla 1. Longitud aproximada de la dendritica apical y longitud aproximada de dos dendritas basales de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal (Media \pm EE).

		Control	Isq+Mel	Isq+Veh
Longitud dendrita apical (μm)	III	202.66 \pm 5.51	205.66 \pm 21.60	188 \pm 27.74
	V	300.66 \pm 9.45	272.33 \pm 16.31	257.66 \pm 23.29
Longitud dendrita basal 1(μm)	III	118 \pm 4.75	106.33 \pm 7.75	91.33 \pm 13.41
	V	142.66 \pm 9.49	128.33 \pm 4.40	114.33 \pm 16.64
Longitud dendrita basal 2(μm)	III	106.33 \pm 4.12	98 \pm 6.01	90.66 \pm 13.18
	V	135.66 \pm 6.78	120.33 \pm 5.28	107.33 \pm 17.17

La densidad de espinas de los segmentos mediales (50 μm) de una rama oblicua proveniente de la dendrita apical y de una rama oblicua proveniente de la dendrita basal de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal dorsomedial fue significativamente menor en el grupo Isq+Veh (segmento dendrítico apical 45.5 \pm 7.36; segmento dendrítico basal: 41.16 \pm 6.79) que en el grupo Isq+Mel (segmento dendrítico apical 53.33 \pm 2.68; segmento dendrítico basal: 51.66 \pm 1.94); en tanto que los valores correspondientes a la densidad de espinas dendríticas en los grupos Control (segmento dendrítico apical: 48; 03 \pm 3.08; segmento dendrítico basal: 46.69 \pm 4.01), Isq+Mel no mostraron entre sí diferencias significativas (figuras 9,10 y 11). La densidad de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la capa III de la corteza prefrontal se ilustran en las figuras 9 y 10, sin diferencias significativas entre los grupos experimentales (grupo Control: segmento dendrítico apical: 44.16 \pm 4.16; segmento dendrítico basal: 41.43 \pm 3.29; grupo Isq+Mel: segmento dendrítico apical: 37.09 \pm 2.59; segmento dendrítico basal: 37.96 \pm 3.07; grupo Isq+Veh: segmento dendrítico apical: 30.63 \pm 7.34; segmento dendrítico basal: 30.06 \pm 6.99, Media \pm EE).

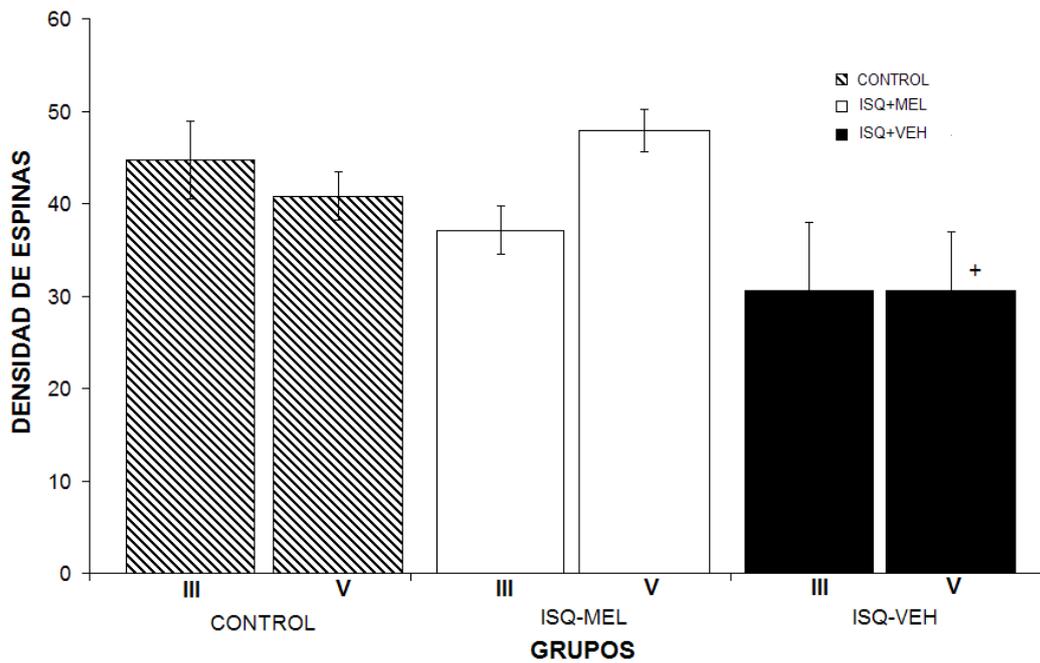


Figura 9. Densidad de espinas de los segmentos mediales ($50\mu\text{m}$) de una rama oblicua proveniente de la dendrita apical de neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal dorsomedial. Puede observarse la reducción significativa de la densidad de espinas dendríticas en el grupo Isq+Veh en comparación con el grupo Isq+Mel. + $p < 0.05$: Isq+Veh Vs Isq+Mel. Mientras que la densidad de espinas de las neuronas piramidales de la capa III no difirió en las diferentes condiciones experimentales.

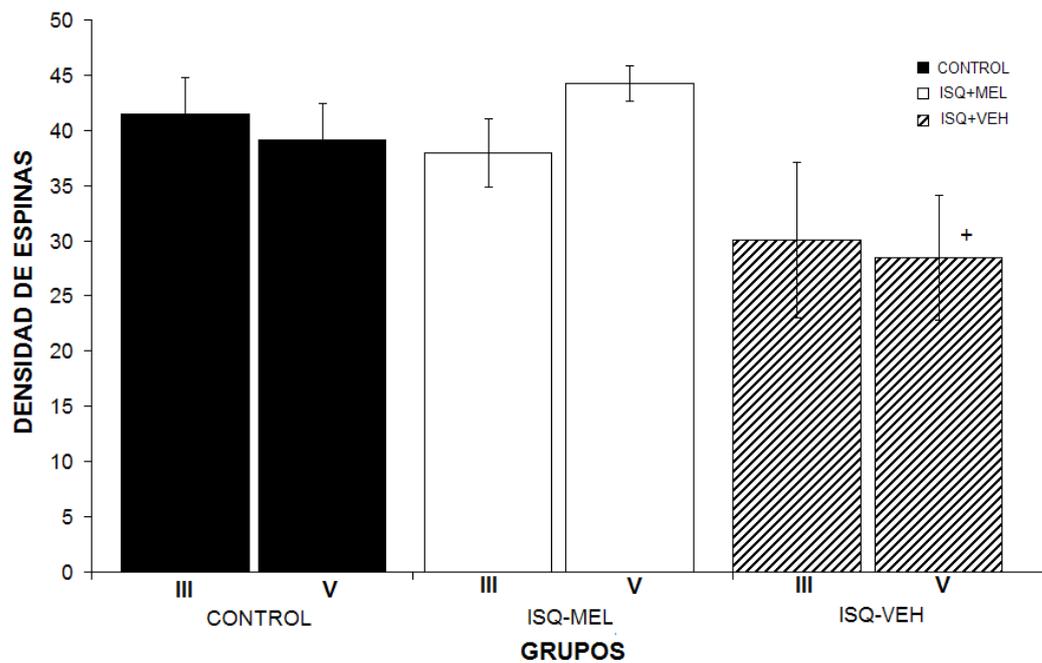


Figura 10. Densidad de espinas de los segmentos mediales (50 μm) de una rama oblicua proveniente de la dendrita basal de neuronas piramidales de la capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial. Puede observarse la reducción significativa de la densidad de espinas dendríticas en el grupo Isq+Veh en comparación con el grupo Isq+Mel. + $p < 0.05$: Isq+Veh Vs Isq+Mel. Mientras que la densidad de espinas de las neuronas piramidales de la capa III no difirió en las diferentes condiciones experimentales.

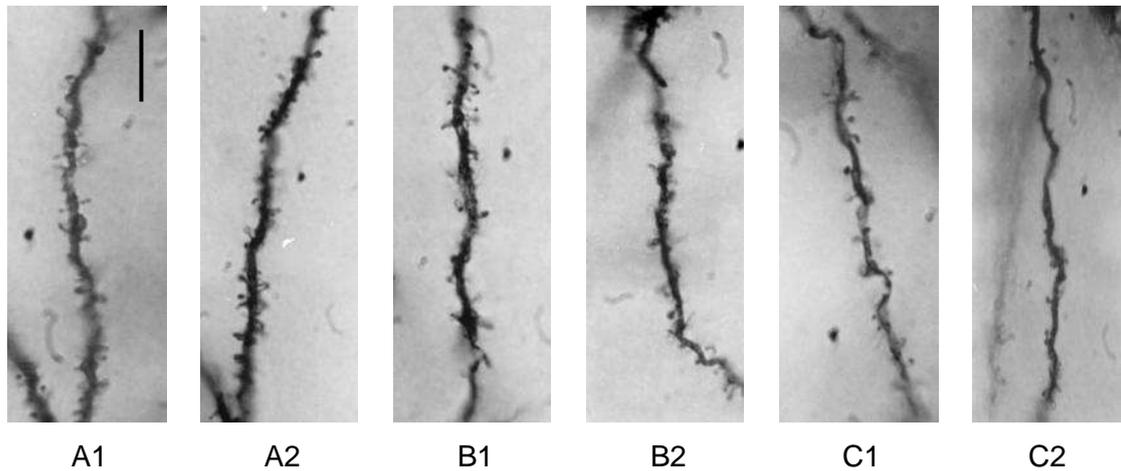


Figura 11. Microfotografías representativas de segmentos oblicuos provenientes de la dendrita basal (1) y de la dendrita apical (2) de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal dorsomedial correspondientes a los grupos Control (A), Isq+Mel (B) e Isq+Veh (C). Escala = 10 μ m.

La proporción de los diferentes tipos de espinas (figuras 4 y 5) de segmentos mediales (50 μ m) de una rama oblicua proveniente de la dendrita apical (figura 12) y de una rama oblicua proveniente de la dendrita basal (figura 13) de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial no difirieron significativamente entre los grupos.

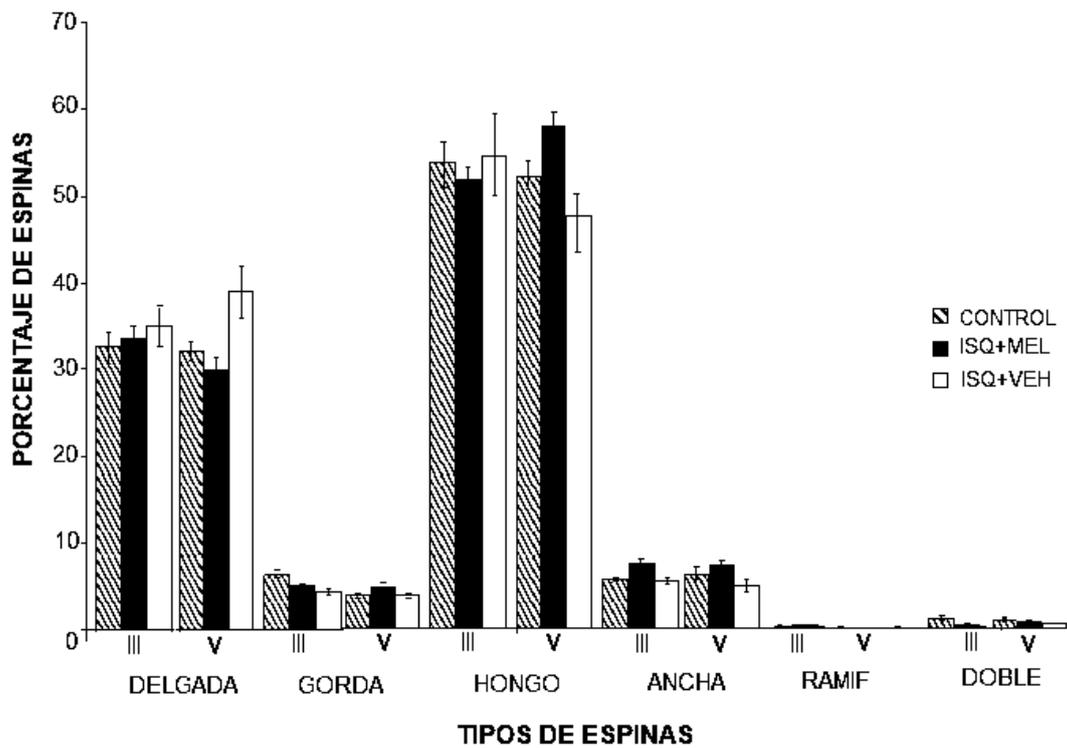


Figura 12. Proporción de los diferentes tipos de espinas de los segmentos mediales (50 μ m) oblicuos provenientes de las dendritas apical de las neuronas piramidales de la capa III y V de la corteza prefrontal dorsomedial. La proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas no difirió significativamente en las diferentes condiciones experimentales.

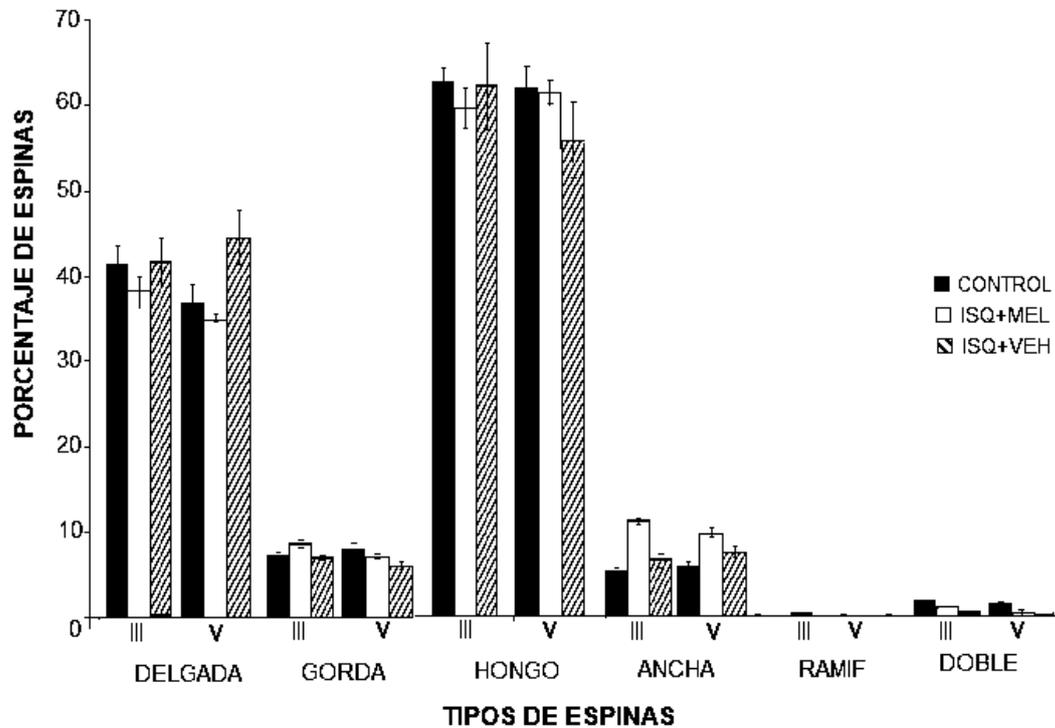


Figura 13. Proporción de los diferentes tipos de espinas de los segmentos mediales (50 μ m) oblicuos provenientes de las dendritas basal de las neuronas piramidales de la capa III Yy V de la corteza prefrontal dorsomedial. La proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas no difirió significativamente en las diferentes condiciones experimentales.

La tabla 2 muestran los resultados obtenidos en las características morfológicas del soma de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal dorsomedial, puede observarse que los parámetros del tamaño del cuerpo neuronal de las células piramidales de la capa V de la corteza prefrontal disminuyeron significativamente en el grupo Isq+Veh en comparación con los del grupo Control y el grupo Isq+Mel.

Tabla 2. Características morfológicas del soma de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de las capas III y V (Media \pm EE).

		Control	Isq+Mel	Isq+Veh
Area (μm^2)	III	6.26 \pm 0.01	5.76 \pm 0.49	5.05 \pm 0.29
	V	12.45 \pm 1.13	11.98 \pm 0.66	8.18 \pm 0.24 ^{*,+}
Perimetro (μm)	III	11.52 \pm 0.20	11.39 \pm 0.47	10.42 \pm 0.54
	V	17.41 \pm 0.91	17.03 \pm 0.63	13.57 \pm 0.35 ^{*,+}
Longest Dimension (μm)	III	4.03 \pm 0.06	3.83 \pm 0.27	0.57 \pm 0.03
	V	6.14 \pm 0.25	6.11 \pm 0.15	5.11 \pm 0.25 ^{*,+}
Factor Forma	III	0.59 \pm 0.02	0.57 \pm 0.01	0.57 \pm 0.03
	V	0.52 \pm 0.02	0.52 \pm 0.02	0.55 \pm 0.02
Diámetro esférico (μm)	III	2.83 \pm 0.04	2.68 \pm 0.11	2.50 \pm 0.07 [*]
	V	3.95 \pm 0.18	3.89 \pm 0.11	3.21 \pm 0.05 ^{*,+}
Volumen esférico (μm^3)	III	11.88 \pm 0.37	10.65 \pm 1.35	8.91 \pm 0.76
	V	33.75 \pm 4.64	31.48 \pm 2.55	17.94 \pm 0.75 ^{*,+}

*p < 0.05, Isch+Veh Vs. Control

+p < 0.05, Isch+Veh Vs. Isch+Mel.

Aún que los valores correspondientes a las arborizaciones dendríticas, la densidad de espinas dendríticas y la longitud de las dendrita apical y la longitud de la dendrita basal de las neuronas piramidales de la capa III del grupo Isq+Veh no alcanzaron un criterio de significancia estadística, mostraron una tendencia a ser menores que los de los grupos Control e Isq+Mel.

DISCUSIÓN

La evaluación a largo plazo del aprendizaje y la memoria espacial, luego de isquemia cerebral global aguda, en animales de experimentación, muestra que esas funciones no pueden ser realizadas cuando existe una pérdida importante de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo [118]. En efecto la pérdida de aproximadamente el 80% de las neuronas piramidales de dicha estructura como consecuencia de la isquemia cerebral global aguda da lugar al impedimento del aprendizaje y la memoria espacial en ratas [118]. Por el contrario el aprendizaje y la memoria espacial con características prácticamente normales, se ha correlacionado con la preservación de por lo menos el 80% de las neuronas piramidales en los distintos segmentos del cuerno de Ammon en animales isquémicos bajo tratamiento neuroprotector con melatonina durante las horas siguientes al episodio de isquemia [118]. Así mismo, en estas condiciones se ha reportado que las neuronas piramidales remanentes del cuerno de Ammon presentan ciertos ajustes de su citoarquitectura que posiblemente favorecen la integración del funcionamiento hipocampal [119].

Sin embargo, la pérdida de neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal no podría ser utilizada en el presente estudio como una explicación válida de la deficiente ejecución de las tareas de memoria de trabajo espacial observadas en los animales sometidos a isquemia cerebral global aguda. En efecto la población neuronal de las neuronas piramidales ubicadas en esas estructuras no fue diferente entre los animales control, isquémicos e isquémicos bajo tratamiento neuroprotector con melatonina. En cambio el número de errores de trabajo espacial en el laberinto radial de 8 brazos de Olton fue significativamente mayor en el grupo de animales isquémicos tratados con vehículo en comparación con el grupo de animales isquémicos tratados con melatonina y de los animales control; así mismo el número total de errores de trabajo fue significativamente mayor en el grupo isquémico tratado con melatonina que en los animales control [118].

A este respecto, se ha descrito que no solo la lesión de la corteza prefrontal con pérdida de neuronas y fibras nerviosas [143, 154, 156] sino también la alteración de los circuitos neuronales que resulta de la reducción de las aferencias que arriban a las neuronas piramidales de las capas III y V, provenientes de otras estructuras cerebrales, o la interferencia farmacológica con su funcionamiento afectan el desempeño de animales de experimentación en pruebas de memoria de trabajo espacial [148,170,171].

Es bien conocido que la memoria de trabajo espacial requiere de la integración de información proveniente del circuito trisináptico del hipocampo que establece conexiones a través del subículum con las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal las cuales relevan dicha información hacia las neuronas piramidales de la capa III como parte importante del proceso de integración que tiene lugar en los circuitos neuronales en la corteza prefrontal en función de la memoria de trabajo espacial [153,155, 156].

Siendo las arborizaciones dendríticas y las espinas dendríticas parte importante del sustrato neural a través del cual se establecen las conexiones entre las células nerviosas es posible que la disminución de las arborizaciones dendríticas y de la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V que fueron observadas en el presente estudio como consecuencia de la isquemia cerebral puedan ser parte de la alteración del sustrato neural que acarrea deterioro de la memoria de trabajo espacial. En contraste estas alteraciones de la citoarquitectura no fueron observadas en los animales intactos, en los que la ejecución de la tarea de memoria de trabajo espacial fue normal; como tampoco en los animales isquémicos bajo tratamiento neuroprotector con melatonina; en los que la memoria de trabajo fue poco alterada por la isquemia.

Por lo tanto, la disminución de las arborizaciones dendríticas y la densidad de las espinas dendríticas en las neuronas piramidales que forman la capa V de la corteza prefrontal que se muestran en el presente trabajo como una consecuencia a largo plazo de la isquemia cerebral, puede contribuir a la alteración del sustrato neural requerido para la integración normal de la memoria de trabajo y la alteración de ésta en los sujetos isquémicos tratados con vehiculo, como fue descrito previamente. En cambio, ni esas alteraciones de la citoarquitectura, como tampoco el impedimento de la ejecución de la memoria de trabajo espacial [118] fueron observadas en el grupo Control y el grupo Isch+Mel.

Se han descrito reducciones del número de arborizaciones dendríticas y de la densidad de espinas dendríticas como secuelas remanentes de diversos ajustes de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la corteza sensitivo motora, luego de isquemia cerebral global [139-141]. Estas características citoarquitectónicas pueden ser modificadas por la magnitud y la extensión de conexiones nerviosas neuronales; por ello la reducción o el incremento de las conexiones aferentes a esas neuronas piramidales puede dar lugar a cambios a la arborización dendrítica y a la densidad de espinas [163, 172].

De esta manera los cambios de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la capa V en el presente estudio podrían posiblemente ser atribuidos a la reducción de las conexiones aferentes provenientes del hipocampo y que terminan en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal; dado que en ausencia del tratamiento neuroprotector con melatonina la isquemia cerebral global aguda indujo una reducción de la población neuronal del segmento CA1 del hipocampo del orden del 80%, en contraste con la preservación de más del 80% de las neuronas piramidales de los animales isquémicos tratados con melatonina [118]; en los cuales las arborizaciones dendríticas y la densidad de espinas permanecieron similares que en los Controles.

En el mismo sentido podrían ser consideradas los resultados de otros autores que muestran que la pérdida de la aferencia da lugar a la reducción del tamaño de los cuerpos neuronales [173].

En vista de lo anterior parecería que la isquemia cerebral global aguda efectuada mediante oclusión de los cuatro vasos en las condiciones del presente estudio no es suficiente para producir la muerte de las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal, consideradas como vulnerables a la isquemia [13,14, 120-126], como ocurre con las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo. Sin embargo la lesión de esta estructura y la pérdida consecuente de una cantidad importante de conexiones nerviosas entre el hipocampo y la corteza prefrontal da lugar a cambios de la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la capa V que no son compatibles con la integración normal de la memoria de trabajo espacial.

Por otra parte la deficiencia moderada de la memoria de trabajo espacial en los animales isquémicos bajo tratamiento neuroprotector con melatonina, en los cuales no se observaron modificaciones del tamaño del soma, las arborizaciones dendríticas y la densidad de espinas dendríticas podría deberse a la reducción de las conexiones nerviosas entre el hipocampo y la corteza prefrontal correspondiente a la pérdida de aproximadamente el 20% de las neuronas piramidales del segmento CA1, descrito previamente.

CONCLUSIONES

El principal resultado del presente estudio es que las neuronas piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal que sobreviven a un episodio de isquemia cerebral global aguda tienen características citoarquitectónicas semejantes a las de los animales controles si los animales fueron sometidos al tratamiento neuroprotector con melatonina. Sin embargo en ausencia de este tratamiento neuroprotector, la isquemia cerebral global provoca la reducción significativa del número total de arborizaciones dendríticas así como la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal que se pueden relacionar con las alteraciones observadas en la ejecución de las tareas de memoria de trabajo espacial. Los resultados sugieren que la preservación de las características citoarquitectónicas de los animales sometidos a isquemia y tratamiento neuroprotector con melatonina, así como las alteraciones citoarquitectónicas descritas en los animales sometidos a isquemia sin tratamiento neuroprotector dependen principalmente de que se mantenga en el primer caso o de que se pierdan en el segundo caso las conexiones aferentes que provienen de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo hacia las neuronas piramidales de la capa V de la corteza prefrontal.

Estos resultados permiten destacar la eficacia del tratamiento neuroprotector con melatonina para contrarrestar los mecanismos fisiopatológicos inducidos por la isquemia que de otra manera darían lugar a largo plazo al deterioro de la estructura y la función de regiones cerebrales vulnerables a la isquemia; permitiendo así mismo la preservación de características citoarquitectónicas compatibles con la integración de la memoria de trabajo espacial en la corteza prefrontal.

REFERENCIAS

1. HOSSMANN KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol.*1994; 39: 557-565.
2. AMERICAN HEART ASSOCIATION. Dallas, Texas: American Heart Association; 2005. Heart Disease Statistics-2005 update. 2005.
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World health report. Geneva: the World Health Organization Report. 2004.
4. LACY CR, SUH DC, BUENO M, KOSTIS J. Delay in presentation and evaluation for acute stroke. *Stroke.* 2001; 32: 63-69.
5. BRODERICK J, WILLIAM M. Feinberg Lecture: Stroke therapy in the year 2025. *Burden, Breakthroughs and Barriers to Progress. Stroke.* 2004; 35: 205-211.
6. PAYNE KA, HUYBRECHTS KF, CARO JJ, CRAIG TJ, KLITTICH WS. Long term cost-of-illness international review. *Pharmacoeconomics.* 2002; 20:813-825.
7. BOGOUSLAVSKY J, CASTILLO CRUZ V. Clasificación de la enfermedad vascular cerebral. En: Banagarrementeria F, Cantu C (Eds). *Enfermedad Vascular Cerebral.* McGraw-Hill Interamericana.1998 pp1-10.
8. CASTILLO J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Rev Neurol.* 2000; 30: 459-464.
9. DÍEZ-TEJEDOR E, ALONSO DE LECIÑANA M. Fisiopatología de la isquemia cerebral: el daño de isquemia-reperfusion En: Banagarrementeria F, Cantu C (Eds). *Enfermedad Vascular Cerebral.* McGraw-Hill Interamericana. 1998 pp 13-25.
10. ROBERT O, MESSING MD. Trastornos del sistema nervioso. En: McPhee JS, Ganong WF, Lingappa VR, Lange JD. (Eds). *Fisiopatología médica: Una introducción a la medicina clínica.*Manual Moderno. 2001.pp 183-89.
11. SARRAF-YAZDI S, LASKOWITZ D, WARNER DS. Pathophysiology of ischemic brain damage en: Shuaib A, Goldstein IB (Eds). *Management of Acute Stroke.* Marcel Deker Inc New York. 1999 págs. 243–277.
12. SIESJO BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I, Pathophysiology *J. Neurosurg.* 1992 págs. 77: 169–184.
13. PULSINELLI W. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Progr Brain Res.* 1985; 63: 29–37.

14. MYHRER T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev.* 2003; 41: 268–287.
15. ALONSO DE LECINANA M, DIEZ-TEJEDOR E, CARCELLER F. Cerebral ischemia: from animal studies to clinical practice. Should the methods be reviewed? *Cerebrovas Dis.* 2001; 11(suppl 1): 20-30.
16. PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. Temporal profile of neural damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982; 11: 491-498.
17. PULSINELLI WA, LEVY DE, DUFFY TE. Regional cerebral blood flow and glucosa metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol.* 1982; 11: 499-509.
18. WON SJ, KIM DY, GWAN BJ. Cellular and Molecular Pathways of Ischemic Neuronal Death. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35:67-86.
19. SIESJO BK. Mechanisms of ischemic brain damage. *Crit Care Med.* 1988; 16: 954-963.
20. ASTRUP J, SYMON L, BRANSTON NM, LASSEN NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 1977; 8: 51-57.
21. 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; 19: 19–26.
22. VALENCIA I., MISHRA O.P, ZUBROW A., FRITZ K., KATSETOS C.D, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M., LEGIDO A. Función del calcio en la lesión neuronal tras hipoxia o convulsiones neonatales. *Rev Neurol.* 2006; 42: 11-15.
23. CHOI DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988; 1: 623-634.
24. DEMEMIUK P. Arachidonic acid metabolites and membrane lipid changes in central nervous system injury. En: *Pharmacological approaches to the treatment of brain and spinal cord injury.* Stein DG BS, (editor). New York: Plenum Press. 1988. pp. 23-41.
25. CHAN PH, FISHMAN RA, LONGAR S. Cellular and molecular effects of polyunsaturated fatty acids in brain ischemia and injury. *Progr Brain Res.* 1985; 63: 227-235.
26. SCHALAEPFER WW, ZIMMERMAN UP. Mechanisms underlying the neuronal response to ischemic injury. Calcium - activated proteolysis of neurofilaments. *Progr Brain Res.* 1985; 63:185-196.

27. CHIN JH, BUCKHOLZ TM, DE LORENZO RJ. Calmodulin and protein phosphorylation: implication in brain ischemia. *Prog Brain Res.* 1985; 63:169-184.
28. TAPIA R. Muerte por estrés oxidativo: radicales libres y óxido nítrico(NO) En: Pasantés H, Arias C, Massieu L, Zentella A, Tapia R. (Eds). *Enfermedades Neurodegenerativas "Mecanismos celulares y moleculares"*. Fondo de Cultura Económica. 1999. pp 7-63.
29. TRAYSTMAN RJ, KIRSCH JR, KOEHLER RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1991; 71: 1185-1195.
30. CHAN PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke.* 1996; 27: 1124-1129.
31. BROOKES PS, YOON Y, ROBOTHAM JL, ANDERS MW, SHEU SS. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love- hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 287: C817-C833.
32. REITER RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 1995; 9: 526-533.
33. SHOHAMI E, BEIT-YANNAI E, HOROWITZ M, KOHEN R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17: 1007-1019.
34. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 1998; 56: 359-384.
35. MARGAILL I, PLOTKINE M, LEROUET D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Rad Biol Med.* 2005; 39: 429-443.
36. REITER RJ, TAN DX, LEON J, KILIC U, KILIC E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Biol Med.* 2005; 230: 104-117.
37. IADECOLA C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *TINS.* 1997; 20: 132-139.
38. MONCADA S, BOLANOS JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem.* 2006; 97: 1676-1689.
39. CHEN J, GRAHAM SH, NAKAYAMA M, ZHU RL, JIN K, STETLER A. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17: 2-10.
40. HARA A, IWAI T, NIWA M, UEMATSU T, YOSHIMI N, TANAKA T. Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil

- hippocampus following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 1996; 711: 249-253.
41. MARTINOU JC, DUBOIS MD, STAPLE JK, RODRIGUEZ I, FRANKOWSKI H. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron.* 1994; 13: 1017-1030.
 42. NICOTERA P, LEIST M, L M. Neuronal cell death: A demise with different shapes. *TIPS.* 1999; 20: 46-51.
 43. MURPHY AN, FISKUM G, FLINT BM. Mitochondria in neurodegeneration: Bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 231-245.
 44. WALLACE DC. Mitochondrial diseases in men and mouse. *Science.* 1999; 283: 1482 – 1488.
 45. KITAGAWA K, MATSUMOTO M, ODA T. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience.* 1990; 35: 551-558.
 46. FISKUM G, MURPHY A, BM F. Mitochondria in Neurodegeneration: Acute ischemia and Chronic Neurodegenerative Diseases. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 351-369.
 47. ZHAN RZ, WU C, FUJIHARA H, TAGA K, QI S. Both caspase -dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21:529-540.
 48. SHEU SS, NAUDURI D, ANDERS MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochem Biophys Acta.* 2006; 1762: 256-265.
 49. LEKER RR, E S. Cerebral ischemia and trauma - different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev.* 2002; 39: 55-73.
 50. PULSINELLI WA, JACEWICZ M, LEVY DE, PETITO CK, PLUM F. Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 835:187-193.
 51. OVBIAGELE B, KIDWELL CS, STARKMAN S, SAVER JL. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2003; 3: 9-20.
 52. CHENG YD, AL-KHOURY, ZIVIN JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *Neuro Rx.* 2004; 1: 36-45.

53. BARONE FC, GZ F. Inflammatory mediators and stroke: New opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 819-834.
54. TREMBLY B. Clinical potential for the use of neuroprotective agents. *Ann N Y Acad Sci.* 1995; 765: 1-20.
55. REITER RJ, TAN DX, PAPPOLLA MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1035: 179-196.
56. MUIR KW, RL K. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke.* 1995; 26: 503 - 513.
57. DANYSZ W, PARSONS CG. Neuroprotective potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurotox Res.* 2002; 4: 119-126.
58. HORN J, LIMBURG M. Calcium antagonists for ischemic stroke. *Stroke.* 2001; 32: 570-576.
59. TIRILAZAD INTERNATIONAL STEERING COMMITTEE. Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2000; 32: 2257-2265.
60. MARSHALL JWB, CUMMINGS RM, BOWES LJ, RIDLEY RM, GREEN AR. Functional and histological protective effect of NXY-059 in a primate model of stroke when given 4 hours after occlusion. *Stroke.* 2003; 34: 2228-2233.
61. ENDRES M, NAMURA S, SHIMIZU-SASAMATA M, WAEBER C, ZHANG L, GOMEZ-ISLA T. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18: 238-247.
62. MORALI G, LETECHIPIA-VALLEJO G, LOPEZ-LOEZA E, MONTES DEL CARMEN P, HERNANDEZ-MORALES L, CERVANTES M. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci Lett.* 2005; 382: 286-290.
63. WOJTAL K, TROJNAR MK, CZUCZWAR SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep.* 2006; 58: 335-340.
64. REITER RJ, ACUNA-CASTROVIEJO D, TAN DX, BURKHARDT S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 939: 200-215.
65. SANTINA A, ZANELLI NJ, SOLENSKI R, ROSENTHAL E, FISKUM G. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-l-carnitine. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1053:153-161.

66. GLADSTONE DJ, BLACK SE, HAKIM AM. Toward wisdom from failure. Lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke*. 2002; 33:2123 -2136.
67. DAVIS S, LEES K, DONNAN G. Treating the acute stroke patient as an emergency: current practices and future opportunities. *Int J Clin Pract*. 2006; 60:399 - 407.
68. WU D. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *Neuro Rx*. 2005; 2:120-128.
69. CHENG YD, AL-KHOURY, ZIVIN JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *Neuro Rx*. 2004; 1: 36-45.
70. DE KEYSER J, SULTER G, LUITEN PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemic stroke: are we doing the right thing? *TINS*. 1999; 22: 535 -540.
71. YAKOVLEV AG, FADEN AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. *Neuro Rx*. 2004; 1:5-16.
72. HUETHER G, POEGGELER B, ADLER L, RUTHER E. Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. *Eur J Pharmacol*. 1993; 238: 249 -254.
73. PANDI-PERUMAL SR, SRINIVASEN V, MAESTRONI GJM, CARDINALI DP, POEGGLER B, HARDELAND R. Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006; 273: 2813-2838.
74. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*. 1993; 1: 57-60.
75. TAN DX, REITER RJ, MANCHESTER LC, YAN MT, EL-SAWI M. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem*. 2002; 2: 181-197.
76. TAN DX, MANCHESTER LC, HARDELAND R, LOPEZ-BURILLO S, MAYO JC. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res*. 2003; 34: 75-78.
77. REITER RJ, TAN DX, OSUNA C, GITTO E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci*. 2000; 7: 444-458.
78. MENENDEZ -PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ, BARLOW -WALDEN L, PABLOS MI. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*. 1993; 53: 353-382.

79. TRICOIRE H, LOCATELLI A, CHEMINEAU P. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinol.* 2002; 143: 84-90.
80. REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC. Antioxidative capacity of melatonin. En: *Handbook of antioxidants* Cadenas E, (editor). New York: Dekker. 2002. pp. 556-613.
81. CUZZOCREA S, COSTANTINO G, GITTO E, MAZZON E, FULIA F. Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. *J Pineal Res.* 2000; 29: 217-227.
82. LETECHEPIA-VALLEJO G, GONZALEZ-BURGOS I, CERVANTES M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res.* 2001; 32: 186-192.
83. CHEUNG RTF. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res.* 2003; 34: 153-160.
84. JOO JY, UZ T. Opposite effects of pinealectomy and melatonin administration on brain damage following cerebral focal ischemia in rat. *Rest Neurol Neurosci.* 1998; 13: 185-191.
85. MANEV H, UZ T, KHARLAMOV A, JY J. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J.* 1996; 10: 1546-1551.
86. KILIC E, OZDEMIR YG, BOLAY H, KELESTIMUR H, T D. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 511-516.
87. REITER RJ, SAINZ RM, LOPEZ-BURILLO S, MAYO JC, MANCHESTER LC, TAN DX. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 993:35-47.
88. MACLEOD MR, O'COLLINS T, HORMY LI. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *J Pineal Res.* 2005; 38: 35-41.
89. CUZZOCREA S, COSTANTINO G, GITTO E, MAZZON E, FULIA F. Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. *J Pineal Res.* 2000; 29: 217-227.
90. BARLOW-WALDEN LR, REITER RJ, ABE M, PABLOS M, MENENDEZ-PELAEZ A. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 1995; 26:497-502.
91. EL-ABHAR HS, SHAALAN M, BARAKAT M, EL-DENSHARY ES. Effect of melatonin and nifedipine on some antioxidant enzymes and different energy

- fuels in the blood and brain of global ischemic rats. *J Pineal Res.* 2002; 33: 87-94.
92. RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004; 36: 1-9.
93. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G, REITER RJ, AGAPITO MT. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000; 28: 242-248.
94. JOU MJ, PENG TI, REITER RJ, JOU SB, WU HY, ST W. Visualization of the effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res.* 2004; 37: 55-70.
95. LEON J, ACUÑA- CASTROVIEJO D, ESCAMES G, TAN DX, RJ R. Melatonin mitigates mitochondrial malfunctions. *J Pineal Res.* 2005; 38: 1-9.
96. ALLEGRA M, REITER RJ, TAN DX, GENTILE C, TESORIERE L, LIVREA MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 2003; 34:1-10.
97. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP, FLORES LJ, REITER RJ. One molecule, many derivatives. A never- ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007; 42: 28-42.
98. TAN DX, MANCHESTER LC, BURKHARDT S. N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 2001; 15: 2294-2296.
99. RESSMEYER AR, MAYO JC, ZELOSKO V. Antioxidant properties of the melatonin N¹-actyl-5-methoxykynuramine (AMK). Scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep.* 2003; 8: 205-213.
100. ENTRENA A, CAMACHO ME, CARRION MD. Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem.* 2005; 48: 8174-8181.
101. HARDELAND R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine.* 2005; 27: 119-130.
102. LEON J, ESCAMES G, RODRIGUEZ MI. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N¹-actyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem.* 2006; 98: 2023-2033.
103. ACUÑA-CASTROVIEJO D, ESCAMES G, LEON J. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med.* 2003; 527: 549-557.

104. CHEN TY, LEE MY, CHEN HY. Melatonin attenuates the postischemic increase in blood-barrier permeability and decrease hemorrhagic transformation of tissue-plasminogen activator therapy following ischemic stroke in mice. *J Pineal Res.* 2006; 3: 242-250.
105. BENITEZ-KING G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006; 40:1-9.
106. BENITEZ-KING G, ORTIZ -LOPEZ L, JIMENEZ-RUBIO G. Melatonin precludes cytoskeletal collapse caused by hydrogen peroxide: participation of protein kinase C. *Therapy.* 2005; 2: 767-778.
107. CUZZOCREA S, REITER RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2001; 426: 1-10.
108. PEI Z, HO HT. Pre-treatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model in the rat. *Neurosci Lett.* 2002; 318:1-4.
109. PEI Z, PANG SF. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res.* 2002; 32:168-172.
110. SINHA K, DEGAONKAR MN, JAGANNATHAN NR, YK G. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002; 428:185-192.
111. KONDOH T, UNEYAMA H, NISHINO H. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. *Life Sci.* 2002; 72:583-590.
112. TORII K, UNEYAMA H, NISHINO H. Melatonin suppresses cerebral edema caused by middle cerebral artery occlusion/reperfusion in rats assessed by magnetic resonance imaging. *J Pineal Res.* 2004; 36:18-24.
113. CHO S, JOH TH, BAIK JJ, DIBINIS C. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res.* 1997; 755:335-338.
114. KILIC E, KILIC U, YULUG B. Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add on treatment to tissue plasminogen activator. *J Pineal Res.* 2004; 36:171-176.
115. LI XJ, ZHANG IM, GU J. Melatonin decreases production of hydroxyl radical during ischemia reperfusion. *Acta Pharmacol Sin.* 1997; 18:394-396.

116. PEI Z FP. Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res.* 2003; 34:110-118.
117. LING X, ZHANG IM, LU SD. Protective effect of melatonin on injured cerebral neurons is associated with bcl-2 over expression. *Acta Pharmacol Sinica.* 1999; 20:409-414.
118. LETECHEPIA-VALLEJO G, LOPEZ-LOEZA E, ESPINOZA-GONZALEZ V, GONZALEZ-BURGOS I, OLVERA-CORTEZ ME, MORALI G, CERVANTES M. Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats, *J. Pineal Res.* 2007;42: 139-146.
119. GONZALEZ-BURGOS I, LETECHEPIA-VALLEJO G, LOPEZ-LOEZA E, MORALI G, CERVANTES M. Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, alter neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Nerosci Lett.* 2007; 423: 162-166.
120. BLOCK F. Global ischemia and behavioral deficits. *Progr Neurobiol.* 1999; 58:279-295.
121. OLSEN G, SCHEEL - KRUGER J, MOLLER A. 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; 4:681-690.
122. ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR, AMARAL DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 1986; 6:2950-2967.
123. LIM C, ALEXANDER MP, LAFLECHE G. The neurological and cognitive sequel of cardiac arrest. *Neurology.* 2004; 63:1774 -1778.
124. DAVIS HP, TRIBUNA J, PULSINELLI WA, VOLPE BT. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol Behav.* 1986; 37:387-392.
125. GALANI R, OBIS S, COUTUREAU E, JARRARD L. 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. *Neurobiol Learn Mem.* 2002; 77:1-16.
126. HARTMAN RE, LEE JM, ZIPFEL GJ, WOZNIA DF. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2005; 1043: 48-56.

127. HURTADO O, PRADILLO J.M, ALONSO-ESCALANO D, LORENZO P, SOBRINO T, CASTILLO J, LIZASOAIN I, MORO M.A. Neurorepair versus neuroprotection in stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006; 21 (supply 2): 54-63.
128. KOVALENKO T, OSADCHENKO I, NOKOLENKO A. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus.* 2006; 16:814-825.
129. ARVIDSSON A, KOKAIA Z, AIRAKSINEN M, SAARMA M, LINDVALL O. Stroke induces widespread changes of gene expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. *Neuroscience.* 2001; 106:27-41.
130. SCHMIDT-KASTNER R, TRUETTNER J, LIN B, ZHAO W, SAUL J. Transient changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in the rat. *Mol Brain Res.* 2001; 92:157-166.
131. JOURAIN P, NIKONELKO I, ALBERTI S, MULLER D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-ischemia. *J Neurosci.* 2002; 22:3108-3116.
132. CREPEL V, EPSTEIN J, BEN-ARI Y. Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus. *J Cel Mol Med.* 2003; 7:401-407.
133. BRIONES TE, SUH E, JOZSA L, ROGOZINSKA M, WOODS J, WADOWSKA M. Changes in the number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. *Brain Res.* 2005; 1033:51-57.
134. NEIGH GN, GLASPER ER, KOFLER J, TRAYSTMAN RJ, MERVIS RF. Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory. *Eur J Neurosci.* 2004:1865-1872.
135. RUAN YW, SOU B, FAN Y, LI Y, LIN N. Dendritic plasticity of CA1 neurons after transient global ischemia. *Neuroscience.* 2006; 140:191-201.
136. BENDEL O, BUETERS T, EULER M, OGREN SO, SANDIN J, EULER G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005; 25:1586-1595.
137. PAPADOUPOLOUS CM, TSAI SY, CHEATWOOD JL, BOLLNOW MR, KOLB BE, SCHWAB ME, KARTJE GL. Dendritic plasticity in adult rat following

- middle cerebral artery occlusion and Nogo-A neutralization. *Cereb Cortex*. 2006; 16: 529-536.
138. UMEO I, KUROIWA T, NAGASAO J, KAWAKAMI E, OYANAGI K. Temporal profiles of axon terminals synapses and spines in the ischemic penumbra of the cerebral cortex .*Ultrastructure of neuronal remodeling. Stroke*. 2006; 37: 2134-2139.
 139. AKULININ VA, SEMCHENKO VV, BELINCHENKO PV. Plasticity of pyramidal dendrites in layer V of rat brain sensorimotor cortex during the postischemic period. *Bull Exp Biol Med*. 1993; 116: 883-885.
 140. AKULININ VA, STEPANOV SS, SEMCHENKO VV, BELINCHENKO PV. Dendritic changes of the pyramidal neurons in layer V of sensory-motor cortex of the rat brain during the postresuscitation period. *Resuscitation*.1997; 35: 157-164.
 141. AKULININ VA, SEMCHENKO VV, STEPANOV SS, BELINCHENKO PV. Structural changes in the dendritic spines of pyramidal neurons in layer III of the sensorimotor cortex of the rat cerebral cortex in the late post-ischemic period. *Neurosci Behav Physiol*. 2004; 34: 221-227.
 142. THIERRY AM, GIOANNI Y, DEGENETAIS E. Hippocampo-prefrontal cortex: anatomical and electrophysiological characteristics. *Hippocampus*. 2000; 10: 411-419.
 143. FRITTS ME, ASBURY ET, HORTON JE, ISSAC WL. Medial prefrontal lesion deficits involving or sparing the prelimbic area in the rat. *Physiol Behav*. 1998; 64: 373-380.
 144. FUSTER JM. The prefrontal cortex-an update: Time is of the essence. *Neuron*. 2001; 30: 319-333.
 145. PEREZ-VEGA MI, MORALES VILLAGRAN A, VELASCO A, GONZALEZ-BURGOS I. Participación de la transmisión serotoninérgica prefrontocortical en la regulación de la memoria de corto plazo en la rata. En: Guevara-Pérez MA, Hernández González M, Duran Hernández P (Eds). *Aproximaciones al Estudio de la Corteza Prefrontal*. Universidad de Guadalajara. 2004. pp 25-36.
 146. LOPEZ-VAZQUEZ MI, GUEVARA-PEREZ MA, GONZALEZ-BURGOS I. Memoria de trabajo y la actividad neuronal de la corteza prefrontal. En Guevara-Perez MA, Hernández-Gonzalez M, Arteaga-Silva M, Olvera-Cortez ME (Eds) *En: Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento*. Universidad de Guadalajara. 2007. pp 157-184.

147. PUIG-VELASCO MV. Control recíproco entre la corteza prefrontal y los núcleos del rafe. Papel de los receptores de serotonina. Tesis doctoral. Barcelona, abril 2004.
148. LAMBE EK, GOLDAMAN-RAKIC PS, AGHJANIAN GK. Serotonin induces EPSCs preferentially in layer V pyramidal neurons of the frontal cortex in the rat. *Cereb Cortex*. 2000; 10: 974-980.
149. DEGENETAIS E, THIERRY AM, GLOWINSKI J, GIOANNI Y. Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: An in vivo intracellular recording study. *Cereb Cortex*. 2003; 13: 782-792.
150. ETCHEPAREBORDA MC, ABAD-MAS L. Memoria de trabajo en los procesos básicos del aprendizaje. *Rev Neurol*. 2005; 40 (supply 1): S79-S83.
151. FUNAHASHI S. Prefrontal Cortex and Working Memory Processes. *Neuroscience*. 2006; 39: 251-261.
152. DUCHENKO PA. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004; 28: 699-709.
153. LAROCHE S, DAVIS S, JAY TM. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: Dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus*. 2000; 10: 438-446.
154. TAYLOR CL, LATIMER MP, WINN P. Impaired delayed spatial win-shift behavior on the eight arm radial maze following excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. *Behav Brain Res*. 2003; 147: 107-114.
155. JUNG MW, QIN Y, McNAUGHTON BL, BARNES CA. Firing characteristics of deep layers in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks. *Cereb Cortex*. 1998; 8: 437-450.
156. LEE I, KESNER RP. Time-dependent relationship between hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci*. 2003; 23(4): 1517-1523.
157. SHIBATA M, YAMASAKI N, MIYAKAWA T, KALARIA R.J, FUJITA Y, OHTANI R, IHARA M, TAKAHASHI R, TOMIMOTO H. Selective impairment of working memory in a Mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 2007; 38: 2826-2832.
158. VOLPE BT, PULSINELLI WA, TRIBUNA J, DAVIS HP. Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia. *Stroke*. 1984; 15: 558-562.
159. VERWER R. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus*. 1997; 7:397-402.

160. OLVERA ME. El papel de la corteza prefrontal en la orientacion espacial. En: Aproximaciones al estudio de la corteza prefrontal. Guevara Pérez MA, Hernandez González M, Durán Hernández P. (editor). Universidad de Guadalajara, Jal 2004. pp. 179-196.
161. PORTERA-CAILLIAU C, YUSTE R. Sobre la función de los filopodios dendríticos. *Rev Neurol.* 2001; 33: 1158-1166.
162. HARRIS KM, KATER SB. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Ann Rev Neurosci.*1994; 17:341-71.
163. FIALA JC, SPACEK J, HARRIS KM. Dendritic spine pathology: Cause or consecece of neurological disorders? *Brain Res Rev.* 2002; 39: 29-54.
164. KOCH C, ZADOR A, BROWN TH. Dendritic spines: convergente of theory and experiment. *Science.* 1992; 256: 973-974.
165. WODLEY CS, GOULD E, FRANKFURT M, McEWEN BS. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal piramidal neurons.*J Neurosci.* 1990; 10: 4035-4039.
166. GONZALEZ-BURGOS I, ALEJANDRE-GOMEZ M, CERVANTES M. Spynetype densities of hippocampal CA1 neurons vary in proestrus and estrus rats. *Neurosci Lett.* 2005; 379: 52-54.
167. PULSINELLI WA, BRIERLEY JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10:267-272.
168. PULSINELLI WA, BUCHAN AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 1988; 19:913-914.
169. GONZALEZ-BURGOS I, TAPIA-ARIZMENDI G, FERIA-VELASCO A. Golgi Method without Osmium Tetroxide for the study of the Central Nervous System. *Biotechnic Histochem.* 1992; 288-296.
170. GUTIERREZ-GUZMAN BE, GONZALEZ-BURGOS I, GUEVARA PEREZ MA, OLVERA-CORTEZ E. Modulación serotonérgica de la actividad theta hipocampal. En: Aproximaciones al estudio de la funcionalidad cerebral y el comportamiento. Guevara Perez MA, Hernandez González M, Arteaga Silva M, Olvera Córtez E. (editores). Universidad de Guadalajara, Jal. 2007. pp. 77-107.
171. OLVERA-CORTEZ E, BARAJAS-PEREZ M, MORALES-VILLAGRAN A, GONZALEZ-BURGOS I. Cerebral serotonin depletion induces egocentric learning improvement in developing rats. *Neurosci Lett.* 2001; 313: 29-32.

172. JOHANSSON BB, BELINCHENKO PV. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002; 22: 89-96.
173. WELLMAN CL, SENGELAUB DR. Cortical Neuroanatomical correlates of behavioral deficits produced by lesion of the basal forebrain in rats. *Behav Neurobiol.* 1991; 56: 1-24.