



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CARACTERISTICAS DEL RITMO THETA HIPOCAMPAL Y
SU RELACION CON EL APRENDIZAJE ESPACIAL EN
RATAS SOMETIDAS A ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL
AGUDA Y TRATAMIENTO NEUROPROTECTOR CON
MELATONINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:
Q.F.B. GUADALUPE ITZEL VELÁZQUEZ ESPINOZA**

**DIRECTOR DE TESIS:
D.C. GRACIELA MARÍA EUGENIA LETECHIPIA VALLEJO**

Morelia, Michoacán, Agosto 2012.

El presente trabajo se realizó

en el laboratorio de Neurociencia, de la División de Estudios de Posgrado,

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”.

UMSNH y el laboratorio de Neurofisiología Experimental del Centro de

Investigación Biomédica de Michoacán del IMSS,

bajo la dirección de la Doctora en Ciencias Graciela María Eugenia

Letchipia Vallejo y Codirección la Doctora en Ciencias

María Esther Olvera Cortés.

INDICE

RESUMEN -----	1
INTRODUCCIÓN -----	3
ISQUEMIA CEREBRAL -----	4
VULNERABILIDAD NEURONAL SELECTIVA -----	5
ALTERACIONES CELULARES Y MOLECULARES DURANTE LA ISQUEMIA CEREBRAL -----	6
Excitotoxicidad -----	8
Papel del Ca ²⁺ en el daño celular por isquemia -----	9
Radicales libres -----	10
Disfunción mitocondrial -----	11
Apoptosis -----	12
NEUROPROTECCION -----	13
ANTECEDENTES -----	15
MELATONINA: SÍNTESIS, MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO NEUROPROTECTOR -----	15
APRENDIZAJE Y MEMORIA E HIPOCAMPO -----	20
ACTIVIDAD THETA E HIPOCAMPO -----	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	32
JUSTIFICACION -----	33
HIPOTESIS -----	34
OBJETIVO GENERAL -----	35
OBJETIVOS PARTICULARES -----	35

MATERIAL Y METODOS	36
ANIMALES Y COMPUESTOS QUÍMICOS	36
MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA	37
GRUPOS Y TRATAMIENTO	38
CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	39
EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS	39
REGISTRO DEL ELECTROENCEFALOGRAMA HIPOCAMPAL	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
RESULTADOS	44
APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS	44
REGISTRO DEL EEG HIPOCAMPAL	54
CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD THETA HIPOCAMPAL Y EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL	64
DISCUSIÓN	66
BIBLIOGRAFIA	73

RESUMEN

La isquemia cerebral global aguda es una alteración cerebrovascular originada por la interrupción o la reducción transitoria del flujo sanguíneo cerebral (<10ml/100g/min), que da lugar a una secuencia de fenómenos fisiopatológicos que culminan con la muerte de neuronas vulnerables en estructuras cerebrales específicas y las consiguientes alteraciones funcionales que dependen de la integridad de dichas estructuras.

Diversos estudios en nuestro laboratorio han mostrado el efecto neuroprotector de la melatonina contra el daño cerebral provocado por la ICGA. Así, la preservación a largo plazo de al menos el 80% de la población de células piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal, junto con modificaciones de la citoarquitectura de las neuronas remanentes (incremento de arborizaciones dendríticas y cambios en el tamaño y proporciones de los diferentes tipos de espinas dendríticas) que podrían sustentar la reorganización del sustrato neural para el funcionamiento de dichas estructuras, se han relacionado con la preservación de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo (aprendizaje y memoria espacial). Asimismo, se conoce que el ritmo theta hipocampal (4-12 Hz) es un correlato electrofisiológico de la eficiencia de las funciones cognitivas dependientes del hipocampo. El objetivo del trabajo es evaluar las características del ritmo theta del hipocampo y su relación con el aprendizaje y la memoria espacial en animales de experimentación sometidos a isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina. La parte experimental consistió de dos fases. Primera fase. Las ratas se sometieron a un periodo de 15 minutos de isquemia cerebral global aguda mediante la oclusión de los cuatro vasos 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 o administración del vehículo de melatonina (solución 10% de etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas. Segunda fase. Tres meses posteriores a la isquemia cerebral global aguda, bajo anestesia general y mediante técnicas esterotáxicas, a cada animal, se le implantó a permanencia un electrodo bipolar concéntrico en la región CA1 del hipocampo, diez días después los animales fueron sometidos a pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, donde simultáneamente se registro la actividad theta hipocampal. La potencia absoluta y la potencia relativa de las bandas del ritmo theta de baja frecuencia (4-6.5 Hz), alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) y máxima frecuencia (9.5-12.0 Hz) se analizaron a manera

comparativa en diferentes etapas de ejecución de las tareas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (atento quieto, búsqueda de la plataforma y localización de la plataforma). Se hizo un análisis de correlación de los parámetros de evaluación de la actividad theta y la ejecución conductual de aprendizaje y memoria espacial. Los resultados muestran una diferencia en la ejecución de la prueba evaluada mediante la latencia de escape, distancia de nado y velocidad de nado, donde los animales del grupo INTACTO e ISQ-MEL fueron más eficientes a comparación de los animales del grupo ISQ-VEH. En tanto en la evaluación de la actividad theta el análisis cualitativo de la potencia absoluta, muestra una clara diferencia entre los grupos. El grupo ISQ-MEL mantiene la amplitud y frecuencia similar a los animales del grupo INTACTO, por el contrario en los animales del grupo ISQ-VEH se observa una reducción en la amplitud y frecuencia de la actividad theta en comparación con los otros dos grupos experimentales. Mientras en la potencia relativa cada grupo de animales muestra características diferentes en la etapa de búsqueda, en donde cabe destacar que los animales del grupo ISQ-MEL tuvieron una separación entre las bandas de baja y alta frecuencia desde el primer día de entrenamiento a comparación de los otros dos grupos experimentales y en donde en el grupo ISQ-VEH únicamente se observa en dos días.

Por todo ello el presente estudio permite diferenciar en grupos de animales sometidos a un episodio de isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina de manera inmediata de aquellos carentes del tratamiento, confirmado por la ejecución de la prueba y la presencia de actividad theta con las características propias del desarrollo de procesos de aprendizaje y memoria espacial.

INTRODUCCIÓN

Con el rápido cambio de las características de la pirámide poblacional a expensas principalmente del incremento del número de personas que superan los 65 años de edad, se han observado un mayor riesgo de ocurrencia de accidentes cerebrovasculares (ACV). De acuerdo con datos estadísticos los ACV son una de las principales causas de muerte y discapacidad severa a largo plazo [1]. A pesar de los avances en el conocimiento de la fisiopatología del ACV y de sus factores de riesgo, estadísticas provenientes de países desarrollados muestran que la incidencia se mantiene constante [2-4].

Los ACV en sus modalidades de infarto o hemorragia cerebral, han sido considerados como la primera causa de incapacidad permanente en adultos y la tercera causa de muerte en los países desarrollados [5]. Aproximadamente el 30% de los pacientes que sobreviven luego de haber sufrido un infarto cerebral quedan con secuelas usualmente graves y permanentes. En el año 2008 el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) registro 539 530 defunciones en México de las cuales el 5.6% se debieron a ACV. A nivel nacional, los ACV ocupa la cuarta causa de muerte en mujeres y la sexta en hombres [6].

ISQUEMIA CEREBRAL

El cerebro es extremadamente vulnerable a las alteraciones de flujo sanguíneo, en condiciones normales utiliza glucosa y oxígeno que deben ser suministrados de manera continua a través del flujo sanguíneo de las arterias carótidas y vertebrales (50 - 60ml/100g/min), como sustratos para la síntesis de ATP necesario para el funcionamiento celular. La isquemia cerebral es una alteración cerebrovascular que se origina por la reducción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) a valores inferiores de 10 ml/100g/min de tejido, con la consiguiente reducción del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro [7].

La supresión total o la reducción del flujo sanguíneo a todo el cerebro durante la isquemia cerebral global se asocia generalmente con eventos tales como paro cardiorrespiratorio o hipotensión severa, resultando en una hipoperfusión del órgano entero. El encéfalo es extremadamente sensible a esta condición. Solo bastan cinco a seis segundos de interrupción del flujo sanguíneo para que el sujeto pierda la conciencia. La mayoría de las muertes son consecuencia del daño neuronal. Por otro lado, de aquellos que sobreviven, 40 a 50% padecerán daños permanentes en funciones cognitivas tales como memoria, atención y funciones ejecutivas [8]. Por otra parte, la isquemia cerebral focal es aquella que ocurre por la oclusión de alguna arteria cerebral y como consecuencia la falla del aporte sanguíneo afecta solamente a la región del cerebro, que en condiciones normales sería irrigada por la arteria afectada [8-9].

VULNERABILIDAD NEURONAL SELECTIVA

Las características de daño neuronal provocado por un periodo de isquemia cerebral global aguda muestran diferencias, de acuerdo a las estructuras cerebrales afectadas y la duración del episodio de isquemia.

La vulnerabilidad neuronal selectiva se refiere a una sensibilidad heterogénea de las diferentes regiones cerebrales a breves episodios de isquemia (Figura 1). Este daño provocado por la isquemia da lugar a su vez a la alteración de aquellas funciones cerebrales cuya integración depende de las estructuras lesionadas [8-10].

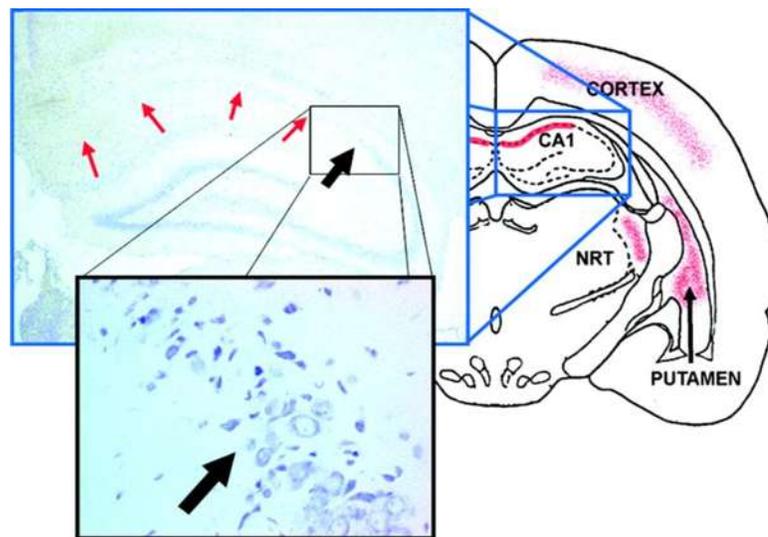


Figura 1. Zonas selectivamente vulnerables del cerebro de ratona. Degeneración neuronal tras un paro cardíaco se observa especialmente en la región de la CA1 del hipocampo, el núcleo talámico reticular (NRT), el putámen, y distintas capas de la corteza. Las neuronas del hipocampo son visualizadas por tinción de Nissl [8].

En modelos experimentales de isquemia cerebral global aguda (ICGA), se ha identificado una progresión de la magnitud de la lesión en las células del hipocampo varios días después de la normalización del FSC. Esto se conoce como fenómeno de “maduración” del daño cerebral y expresa la existencia de procesos lesivos inducidos por la isquemia que se mantienen activos no obstante que la reperfusión cerebral haya sido establecida e inclusive son favorecidos por la misma [11].

ALTERACIONES CELULARES Y MOLECULARES DURANTE LA ISQUEMIA CEREBRAL

El cerebro representa del 2-3 % del peso corporal total; sin embargo recibe 15% del gasto cardiaco, consume 20% de oxígeno y gasta 25% de la glucosa del organismo, para mantener su integridad morfológica y funcional. Esto se debe principalmente a la necesidad del suministro constante de oxígeno y glucosa, dos sustratos metabólicos para los que el cerebro tiene baja capacidad de reserva [12]. La interrupción repentina del suministro de ambos al cerebro da lugar a un electroencefalograma isoelectrico en el término de pocos segundos y a una disminución importante del contenido de ATP en los primeros minutos. La consecuencia de esta falla energética inicial conduce finalmente a alteraciones celulares complejas que pueden provocar la muerte neuronal [9].

El mantenimiento de la homeostasis iónica de la neurona requiere del aporte constante de energía por lo que el resultado de la isquemia es la alteración inmediata de los gradientes iónicos intra y extra celulares dado que la falla energética provoca la interrupción del funcionamiento de los procesos membranales de transporte activo que generan y mantienen los gradientes iónicos con el consiguiente desplazamiento masivo de Na^+ y Ca^{2+} hacia el citoplasma neuronal y la despolarización anóxica [12].

Estos cambios iónicos y eléctricos inducen a su vez, la activación de otros procesos celulares “perpetradores” del daño neuronal, capaces de producir alteraciones irreversibles en diversas macromoléculas. Los fenómenos “perpetradores” del daño, entre los que se incluyen a la activación de proteasas, fosfolipasas y endonucleasas dependientes de la concentración intracelular de Ca^{2+} anormalmente elevado así como la producción y acumulación excesivas de radicales libres, tienen gran importancia como determinantes de daño y muerte celular [7, 13].

Diversas alteraciones celulares secundarias a la isquemia ocurren después de que el flujo sanguíneo cerebral se ha restablecido y paradójicamente amplifican el daño de las estructuras nerviosas. Así, fenómenos tales como edema tisular, vasoespasmo, edema intracelular, diversas alteraciones adicionales a la homeostasis del calcio intracelular e intramitocondrial, alteraciones metabólicas y liberación de radicales libres, constituyen mecanismos celulares del “daño por

reperfusión” que contribuyen al resultado final del daño neurológico provocado por la isquemia [14-15].

La falla de energía también resulta en la pérdida del control de la homeostasis del ion hidrógeno. La regulación intracelular del pH es dependiente de energía y participa un transportador tipo “antiporte” que intercambia con iones Na^+ . La pérdida de la homeostasis del ion Na^+ serviría para promover la acidosis intracelular. Esta acidosis puede inhibir varias enzimas, aumentar el edema y promover la formación de radicales libres [9].

La isquemia cerebral da lugar a diversas alteraciones celulares que ocurren “en cascada” una vez iniciado el proceso de daño, progresan gradualmente con el transcurso del tiempo y culminan en forma de daño neuronal irreversible [9, 13, 16].

Excitotoxicidad

La despolarización anóxica de la membrana neuronal da lugar a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, al incremento adicional de la concentración intracelular de este ión y a la activación de mecanismos de liberación de glutamato. Además, se interfiere con la recaptura de glutamato lo que resulta en la acumulación anormal de este neurotransmisor en la sinapsis y la activación excesiva de sus receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) o Kainato. La

activación sostenida de estos receptores da lugar a un incremento de la concentración intraneuronal de Na^+ y Ca^{2+} , lo que conduce a la despolarización membranal y apertura de canales de Ca^{2+} operados por voltaje, así como a procesos fisiopatológicos de daño y muerte neuronal cuya activación depende del incremento anormal de la concentración intracelular de Ca^{2+} [7, 16-17].

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

La presencia intracelular del ion Ca^{2+} regula diversas funciones intracelulares. El gradiente de concentración del Ca^{2+} extracelular con respecto a su concentración intracelular en condiciones normales es de 10 000:1. Se requiere un considerable gasto de energía para mantener dicha homeostasis. El ingreso masivo de calcio da lugar a múltiples fenómenos celulares conducentes al daño neuronal. Este es el caso de la activación de varias enzimas y la alteración del funcionamiento mitocondrial [9].

Entre los fenómenos celulares de daño dependientes del incremento anormal de Ca^{2+} se consideran relevantes la activación de la fosfolipasa A_2 , y la fosfolipasa C- β , que producen la degradación de los fosfolípidos de membrana celular, liberación de ácidos grasos libres como el araquidónico y destrucción de los elementos estructurales de la célula, la activación de calpaínas, la activación de la proteína cinasa II calcio calmodulina (CaMKII), la activación de endonucleasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, activa oxidasas lo que degrada

purinas endógenas y produce H_2O_2 , promueve la síntesis de óxido nítrico y daña las mitocondrias por lo que se disminuye la síntesis de ATP [7].

Se ha propuesto que la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} , con el aumento de su concentración en el citoplasma celular, es el principal mecanismo de muerte celular [12].

Radicales libres

En condiciones normales, la reducción gradual del O_2 ocurre a través de varios metabolitos intermediarios: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical oxidrilo (OH^{\cdot}) denominados especies reactivas de oxígeno (ROS). 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 [18-19].

Los radicales libres forman parte importante de los mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral en condiciones de isquemia/reperfusión. 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. Tal es el caso de la enzima xantina deshidrogenasa que en ausencia de oxígeno se

estimula su forma de xantina oxidasa. La producción excesiva de radicales libres rebasa la capacidad de los mecanismos celulares antioxidantes y deja expuestos diversos constituyentes de la célula, (proteínas, lípidos, ácidos nucleídos) a las acciones citotóxicas de ROS [20-21].

La participación de los radicales libres, derivados tanto de oxígeno como de nitrógeno (RNS) en procesos de daño por isquemia en el sistema nervioso central ha sido extensamente estudiada [14].

Disfunción mitocondrial

La fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la mitocondria, es la principal vía de síntesis de ATP en eucariontes. En este proceso, los electrones liberados a partir de los sustratos son transferidos al O₂ 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 fosforilación oxidativa (síntesis de ATP) por el complejo V (ATP Sintasa) [18].

En condiciones normales el calcio citoplasmático entra a la mitocondria mediante un sistema de transporte unidireccional, favorecido por el potencial de membrana negativo de la mitocondria, sin embargo en condiciones de isquemia-reperfusión el incremento anormal de Ca²⁺ 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 [18].

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 a través de mecanismos dependientes de Ca^{2+} . Se ha considerado que la integridad estructural y funcional de la mitocondria como factores de 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 fisiológicas cerebrales [18, 20].

Apoptosis

Las causas de muerte celular posterior a isquemia pueden ser por mecanismos de 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

del factor de necrosis tumoral (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 última, activa enzimas que degradan el ADN (endonucleasas), llevando por último a muerte celular [7].

NEUROPROTECCION

Conforme se han acumulado las 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 las neuronas vulnerables, por necrosis y/o apoptosis, al daño irreversible de estructuras cerebrales y a las alteraciones funcionales correspondientes, se ha consolidado la propuesta de la existencia de una “ventana de oportunidad terapéutica” muy importante para las posibilidades de éxito de los procedimientos de neuroprotección [22-23].

En estos se incluyen procedimientos farmacológicos y no farmacológicos capaces de prevenir o reducir el daño resultante de la exposición de las células nerviosas que forman parte del SNC a condiciones tales como la isquemia, el traumatismo craneoencefálico o la hemorragia [24]; 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.

En efecto, en procesos fisiopatológicos agudos, como la isquemia cerebral global o focal, el trauma o las hemorragias cerebrales, la “ventana de oportunidad terapéutica”, es un periodo (usualmente de unas cuantas horas) comprendido desde el inicio de la exposición de las estructuras del SNC a estas condiciones y el establecimiento de daño neuronal irreversible que antecede de manera inmediata a la muerte neuronal; e incluye el tiempo durante el cual se desencadenan y permanecen activos diversos mecanismos celulares conducentes a la muerte neuronal [12, 25-26]. Cada uno de estos 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), mediano (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 [24, 27].

De ahí la sustentación de las propuestas para ensayos clínicos de neuroprotección basados en la administración de diferentes fármacos [28-29].

ANTECEDENTES

MELATONINA: SÍNTESIS, MECANISMO DE ACCIÓN Y EFECTO NEUROPROTECTOR

Diversas investigaciones han abordado el estudio de los efectos neuroprotectores de la melatonina contra el daño neuronal producido por isquemia cerebral global o focal en estructuras cerebrales vulnerables, principalmente a través de la evaluación de parámetros morfológicos y funcionales [30-31].

La melatonina se ha propuesto como un neuroprotector eficiente para reducir el daño neuronal en condiciones de isquemia reperusión. La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es sintetizada principalmente en la glándula pineal y tiene un patrón circádico de secreción estrechamente relacionado con los ciclos de luz/oscuridad (Figura 2). Esta hormona se secreta principalmente durante la noche favoreciendo el sueño. Una vez sintetizada la melatonina, no se almacena en la glándula pineal, se difunde hacia los capilares sanguíneos y líquido cefalorraquídeo. Está relacionada con la regulación de los ciclos diales y anuales de todos los tejidos por lo que es considerada el marcapaso cronológico. La síntesis de melatonina ocurre en otras áreas del organismo, incluyendo la retina, tracto gastrointestinal, piel, médula ósea y linfocitos. La secreción de melatonina esta sincronizada con el ciclo de luz/obscuridad, alcanzando una concentración plasmática máxima en la noche en sujetos jóvenes de 200 pg/ml y una concentración plasmática mínima en el día de 10 pg/ml [32].

Diversas acciones de la melatonina están mediadas por los receptores de membrana acoplados a proteína G, MT₁, MT₂ y MT₃ así como a receptores nucleares de la familia del ácido retinoico, ROR α , ROR α 2 y RZR β , la melatonina también presenta afinidad por calmodulina. Algunas actividades antioxidantes de la melatonina como la neutralización directa de radicales libres y reacciones de intercambio de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria, no están mediadas por receptor [33].

La melatonina, se destaca por su actividad antioxidante neutralizando principalmente radicales oxidrilo. Traspasa fácilmente las membranas celulares y la barrera hematoencefalica lo que favorece su efecto protector ante el daño ocasionado en el SNC por estrés oxidativo. La melatonina es un atrapador directo de radicales derivados de oxígeno y limita la formación del radical peroxinitrito por inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) en tejido nervioso [34-38]. La molécula de la melatonina posee un anillo indol aromático rico en electrones lo cual le facilita su función de donadora de electrones, reduciendo aquellas moléculas que actúan como radicales libres. La melatonina difiere de otros antioxidantes en dos aspectos importantes. La melatonina no pasa por un reciclado redox, es decir al oxidarse no se regenera en su forma reducida, debido a que forma intermediarios estables al reaccionar con los radicales libres, formando un antioxidante terminal. Por otro lado su acción antioxidante se debe a la donación de un par de electrones, evitando que se convierta en un radical libre en el proceso. La melatonina es un antioxidante más potente que otras moléculas.

En comparación con la vitamina E es doblemente capaz de proteger las membranas de la peroxidación de lípidos. Es cinco veces más potente que el GSH en atrapar radicales hidroxilo y sesenta veces mayor su capacidad antioxidante que la vitamina C y E respecto a la protección del DNA. Adicionalmente, varios metabolitos derivados de la interacción de la melatonina con radicales libres, incluyendo N1-acetil-N2 formil-5-methoxikinuramina (AFMK) y N1-acetil-5-methoxikinuramina (AMK), son eficientes atrapadores de radicales libres. La melatonina también estimula la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GSH), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa [35-36, 39]. Debido a la baja concentración de sistemas antioxidantes en el SNC en relación al resto del organismo la capacidad antioxidante de la melatonina es muy importante [38].



Figura 2. Estructura molecular de N-acetil-5-metoxi-triptamina (melatonina)

Diversos esquemas de tratamiento de isquemia cerebral han utilizado dosis únicas o múltiples de melatonina en modelos experimentales en las modalidades de isquemia focal o global. En estudios de isquemia cerebral global aguda (ICGA), los parámetros para la estimación del efecto neuroprotector de la melatonina se han enfocado hacia el estudio de las poblaciones neuronales más vulnerables, así como funciones neurológicas, conductuales y cognitivas directamente relacionadas con dichas poblaciones [39]. Así en un modelo de isquemia cerebral global aguda provocada mediante paro cardiorespiratorio en gato y tratado con melatonina 10 mg/Kg/ hora administrada por vía intravenosa por 6 horas se mostró una menor deficiencia neurológica así como una preservación de la población de las neuronas piramidales del cuerno de Ammón del hipocampo evaluados ambos parámetros a corto plazo (8 días) de ocasionar el paro cardiorespiratorio [40].

En un modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas mediante la oclusión de los 4 vasos, y la administración intravenosa de melatonina 30 minutos después de la isquemia y durante las siguientes 6 horas, el efecto del tratamiento se evaluó a largo plazo (más de 3 meses) de acuerdo a lo recomendado por STAIR [41]. Se evaluó el aprendizaje espacial mediante el laberinto acuático de Morris [42], así como la memoria de trabajo en el laberinto de ocho brazos de Olton [43], noventa días después de la isquemia, se examinaron las neuronas piramidales de cuerno de Ammón del hipocampo y de las capas III y V de la corteza prefrontal medial después de 120 días del daño por isquemia cerebral global aguda, una vez concluidas las pruebas conductuales. En los animales

tratados con vehículo, la isquemia cerebral global aguda causó un retraso significativo en la adquisición de la memoria de trabajo y en el aprendizaje espacial y una disminución en el número de neuronas piramidales en el Cuerno de Ammón del hipocampo. En el grupo de los animales tratados con melatonina, se previno la pérdida de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo y se conservó el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo [44]. Las neuronas piramidales remanentes de los animales tratados con melatonina mostraron una citoarquitectura diferente a los animales intactos, con dendritas menos ramificadas [45]. Por otro lado, la evaluación a largo plazo de las características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, mostró una menor densidad de espinas dendríticas, con el predominio de espinas en forma de hongo y delgadas en el grupo de animales tratados con melatonina respecto al grupo de animales control intactos [46]. En conjunto, los resultados evaluados a corto y largo plazo, en nuestro equipo de laboratorio sugieren que la melatonina puede contrarrestar el daño causado por la isquemia mediante la preservación de células piramidales del hipocampo y en cierto grado la citoarquitectura de las mismas. Asimismo se conservó el aprendizaje espacial y memoria de trabajo funciones dependientes de la integridad de estas estructuras cerebrales en los animales isquémicos tratados con melatonina.

APRENDIZAJE Y MEMORIA E HIPOCAMPO

El aprendizaje y la memoria son el medio principal de adaptación de los seres vivos a las modificaciones de su medio ambiente [47-48]. El Aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquieren nuevos conocimientos acerca del mundo que nos rodea. Es el medio más importante en que los sucesos ambientales modelan la conducta [49-52]; de esta manera las experiencias producen cambios en el sistema nervioso central (SNC), que pueden ser duraderos, y se manifiestan en el comportamiento de los organismos [47]. La memoria, es el proceso a través del cual, la información aprendida es almacenada y posteriormente recuperada [50, 52], es la capacidad de retener y de evocar eventos del pasado, mediante procesos de almacenamiento y recuperación de información, que ocurren en el SNC [53]. La memoria tiene tres fases temporales: una memoria inmediata, relacionada con los registros sensoriales; en respuesta a estímulos internos (sensaciones, emociones, pensamientos) y externos (visuales, espaciales, motores); una memoria a corto plazo o mediata, es decir, la información almacenada inicialmente de forma lábil y transitoria y que puede convertirse en una memoria de larga duración, también llamada memoria diferida [53]. La memoria a corto plazo o retención consciente de una información durante un tiempo breve se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares, en las redes neuronales implicadas; en tanto que la memoria a largo plazo está basada en cambios estructurales persistentes, como por ejemplo, la formación de nuevas

espinas dendríticas [52]. Si no se consolida la memoria, la información se pierde [48].

El establecimiento de la memoria está integrado por tres procesos básicos: (1) codificación de la información; (2) almacenamiento de la información, y (3) evocación o recuperación de la información. La memoria se ha clasificado también con respecto a si su adquisición y recuerdo involucran la conciencia del individuo en: memoria implícita (MI) y memoria explícita (ME). La MI, también llamada memoria de procedimiento, es la información que nos permite ejercer hábitos cognoscitivos y motores. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica. Se manifiesta en forma inconsciente y es difícil de explicar con palabras o mediante la escritura [47, 53]. La ME, es el almacenamiento de conceptos referidos a objetos (memoria semántica) y a eventos (memoria episódica), se adquiere en uno o en pocos ensayos, y puede expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, se manifiesta conscientemente y es fácil de declarar verbalmente o por escrito. Este tipo de memoria, resulta del aprendizaje de relación, que consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información [47, 53]. El procesamiento de éste tipo de información está relacionado con el hipocampo [54-55].

Todas las alteraciones cerebrovasculares, cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales, provocadas a las neuronas debido a la cascada isquémica dan como resultado un daño a diversas estructuras cerebrales en particular se destaca el hipocampo, una de las estructuras más afectadas por dicho daño [56].

La formación hipocampal es una estructura cerebral bilateral, subcortical presente en todos los mamíferos, compuesta de seis regiones citoarquitectónicas distintas que incluyen el giro dentado, el hipocampo, subículo, presubículo, parasubículo y corteza entorrinal [50].

El hipocampo también es conocido como *Cornu Ammonis* (CA) de acuerdo a la nomenclatura anatómica antigua. La terminología del cuerno de Ammón origina la denominación de las tres regiones en que se divide el hipocampo: CA1, CA2, CA3, distinguibles por el tamaño y apariencia de sus neuronas. El 90% de las neuronas presentes en las regiones del cuerno de Ammón son de tipo piramidal, de carácter glutamatergico y a su vez se dividen en diferentes estratos empezando por la zona cerca de la superficie (alveus, estrato oriens, estrato piramidal, estrato radiado y estrato lacunoso molecular) [50], el giro dentado consiste en tres capas: la capa de células granulares, capa molecular y la capa de células polimórficas (llamada región hilar o hillus), todas estas células son de naturaleza (Figura 3). Toda la información que llega al hipocampo lo hace vía las cortezas perirrinal y entorrinal (cortezas de asociación); áreas corticales anatómicamente inmediatas al hipocampo en el lóbulo temporal.

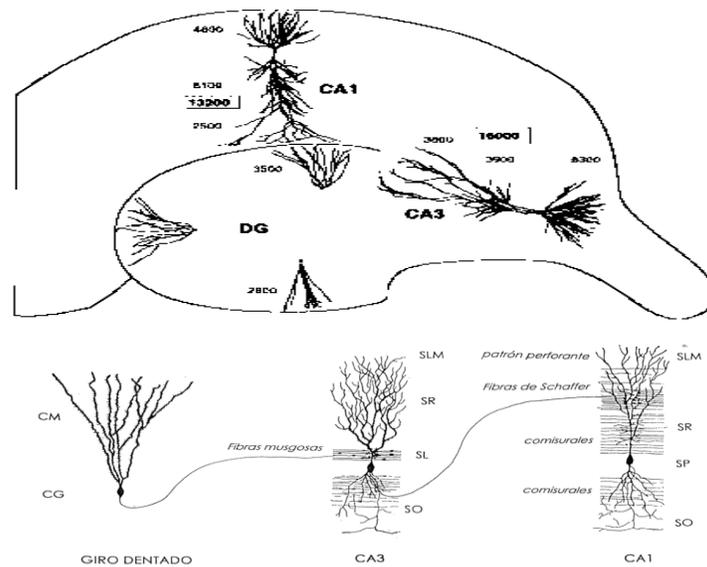


Figura 3. Organización básica del hipocampo. Se muestran esquemáticamente los tipos celulares del giro dentado y el hipocampo [57].

Esta estructura cerebral recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de la vía perforante originada en la corteza entorrinal, que utiliza glutamato como principal neurotransmisor. La vía perforante proveniente de la corteza entorrinal hace sinapsis con las células granulares del giro dentado (GD). Las células granulares, a su vez proyectan un haz de fibras llamadas musgosas hacia las células piramidales de la región CA3. La base del soma de las células piramidales de CA3 da origen al axón el cual se bifurca en una rama colateral de Schaeffer que hace sinapsis con las células piramidales de la región CA1 del hipocampo y otra rama que, después de cursar por el estrato oriens pasa al fornix que constituye la principal vía eferente del hipocampo [58].

El hipocampo es una estructura esencial para los procesos de aprendizaje y memoria en aves y mamíferos. La lesión del hipocampo, así como cualquiera de sus aferentes principales produce deficiencia cognoscitiva [59].

Los resultados de diversos estudios en animales de experimentación y en pacientes han mostrado la participación del hipocampo en los procesos de memoria y aprendizaje. En conjunto con la neocorteza el hipocampo es una estructura clave en la fijación de los trazos de memoria y la selección de información. Las diferentes regiones del hipocampo se involucran en el desarrollo de procesos de adquisición y consolidación de memoria, con la participación de diferentes sistemas de neurotransmisión [50].

Los trastornos cognitivos son fenómenos complejos que alteran muchas estructuras cerebrales asociadas entre ellas con funciones mentales. En condiciones experimentales en varias especies de animales, una isquemia cerebral crónica moderada da como resultado una alteración en la memoria de trabajo y aprendizaje espacial que pueden ser evaluadas mediante pruebas conductuales. Por ejemplo para la evaluación de la memoria espacial en roedores en el laboratorio se emplea el laberinto acuático de Morris. Las alteraciones conductuales están invariablemente acompañadas por cambios neurodegenerativos en las regiones de CA1-hilus y el giro dentado del hipocampo [50].

La muerte de las células del hipocampo es consecuencia de una serie de procesos fisiopatológicos iniciados a partir de la supresión temporal del flujo

sanguíneo cerebral. Aunque se alteran diferentes estructuras cerebrales, la elevada vulnerabilidad del hipocampo se correlaciona directamente con la severidad de las alteraciones cognitivas [60].

Los pacientes que sobreviven a un infarto cardiaco se mantienen inconscientes inmediatamente después de la resucitación y por algunas horas. El pronóstico de recuperación es menor si el paciente prolonga su estado comatoso por más tiempo [61].

En un estudio en pacientes sobrevivientes a un paro cardiorespiratorio se mostró la presencia de secuelas neuropsicológicas severas. Las deficiencias cognitivas que se presentaron de forma moderada o severa consistieron en dispraxias, amnesia, desordenes de atención y depresión severa y en algunos casos derivaron en demencia [62-63].

Cuando existe un daño cerebral, la alteración de las funciones nerviosas superiores cubren un espectro muy amplio donde el paciente puede verse afectado en cuatro grandes funciones: cognitivas o neuropsicológicas, de la comunicación y expresión, físicas y actividades de la vida diaria [64-65].

ACTIVIDAD THETA E HIPOCAMPO

La actividad electroencefalografía es generada por la actividad conjunta de millones de neuronas corticales influenciadas por la interrelación de la actividad entre regiones corticales y subcorticales. Se puede definir la actividad electroencefalográfica como las oscilaciones de voltaje originadas por las corrientes iónicas intra y extraneuronales en una gran población de células dispuestas en forma radial a la superficie, que se activan sincrónicamente. Las corrientes iónicas están dadas principalmente por los potenciales postsinápticos, tanto excitatorios como inhibitorios. El registro y análisis de la actividad electroencefalografía han sido usados durante muchos años como una herramienta que permite examinar la funcionalidad cerebral en relación con diferentes estados fisiológicos, manipulaciones hormonales y farmacológicas o ante la resolución de diferentes tipos de tareas [66].

Estudios electrofisiológicos y de electroencefalograma (EEG) han mostrado que predomina cierto tipo de actividad eléctrica según el tipo de conducta que esté realizando el individuo y el sustrato anatómico que lo sustenta. En el hipocampo se origina y predomina la actividad theta, con una amplitud de 1-2 mV y un patrón sinusoidal de actividad rítmica lenta que oscila entre 4 y 12 Hz, y es uno de los ritmos cerebrales más ampliamente estudiados. La actividad rítmica theta ha sido asociada con el desempeño cognitivo en las personas, la navegación espacial y tareas de aprendizaje y memoria en ratas [67-68].

La actividad theta muestra una clara relación con la conducta de los individuos y la descarga neuronal entre y a través de varias regiones del hipocampo donde la probabilidad de descarga tanto de las células piramidales como de las interneuronas esta modulada por la fase del ritmo theta [69].

En los roedores, la memoria espacial es particularmente sensible a las lesiones de la formación hipocampal [70]. Además la actividad theta se presenta durante conductas asociadas con la adquisición de información ambiental [55], es por ello que se ha propuesto que la actividad theta podría estar reflejando el procesamiento de información por parte del hipocampo, y estar relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria organizados por esta estructura cerebral [71].

La actividad theta es producida por corrientes inducidas sinápticamente tanto en las células piramidales como en las granulares dentadas, originadas por las descargas rítmicas de sus aferentes [72].

La actividad theta además de originarse en el hipocampo se origina en varias estructuras subcorticales, como lo es el núcleo supramamilar (SuM) y la banda diagonal de Broca (MS/DBB) que actúan como marcapasos para la generación de la actividad theta en el hipocampo, ya que contienen neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatergicas que envían proyecciones a la formación hipocampal [73-74]. Estas estructuras actúan de manera coordinada con la formación reticular (FR) del tallo cerebral, el núcleo reticular pontis oralis (RPO), para la correcta codificación y generación de la actividad theta en el

hipocampo (Figura 4). Otras investigaciones hacen referencia a la participación del núcleo del rafé medial (RM), por las proyecciones serotoninérgicas que envía al SUM y al hipocampo; cuya actividad produce la desaparición o desincronización de la actividad theta hipocámpal [75-76].

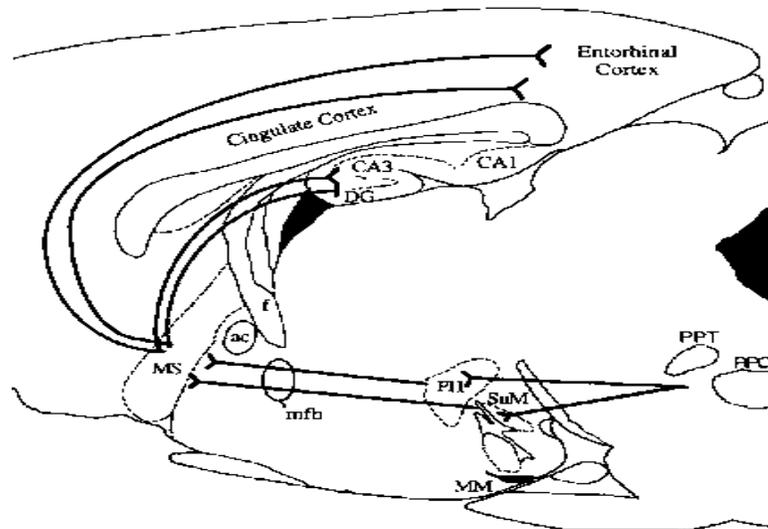


Figura 4. Vías de sincronización ascendente. RPO, núcleo reticular pontis oralis; PPT, núcleo tegmental pedunculopontino; PH, núcleo hipotalámico posterior; SUM, núcleo supramamilar; MS, septo medial; CA1, CA3, DG, regiones del hipocampo [77].

Por otro lado, se sabe que la actividad theta hipocámpal está involucrada en funciones de procesamiento de la información espacial y en la formación de memoria dependiente del hipocampo [67, 78-79]. Pan y McNaughton reportaron que la inyección de un ansiolítico (clordiazepóxido) dentro del nSUM medial en la prueba de laberinto acuático de Morris en un único día de entrenamiento causa un modesto pero significativo deterioro del aprendizaje espacial, y un modesto decremento en la frecuencia theta, en comparación con una aplicación intraperitoneal [80]. Posteriormente en otro trabajo, reportaron que la lesión

neuroquímica en el mismo núcleo no produce efectos significativos sobre el aprendizaje espacial pero disminuye la frecuencia hipocampal [81]. Por lo que se ha reportado que al reducirse la frecuencia de la actividad theta del hipocampo, se altera el desempeño en el laberinto acuático de Morris [82], lo anterior indica que una frecuencia precisa en la ritmicidad de la actividad theta puede ser importante para la función hipocampal. Es decir, un pequeño cambio en una frecuencia específica podría alterar la eficiencia en el aprendizaje y memoria.

Dado que en el sistema serotoninérgico puede influir en la actividad theta del hipocampo y que puede funcionar como un modulador de aprendizaje espacial, se ha investigado el posible papel de la serotonina del hipocampo en la regulación de la actividad theta durante la adquisición de un mapa basado en la información espacial. Diversos estudios han mostrado que la disminución parcial (50%) de serotonina hipocampal no da lugar a modificaciones de la actividad theta pero cuando se incrementa la actividad serotoninérgica ocurre una disminución de la actividad theta principalmente de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) [83]. Por otro lado la disminución (90%) de serotonina hipocampal contribuye a la facilitación del aprendizaje de lugar en el laberinto acuático de Morris, asociado con un incremento en la expresión de actividad theta de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) [84]. Mientras tanto en un estudio realizado con ratas jóvenes y viejas evaluando el aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris, las ratas jóvenes mostraron un aumento en la potencia relativa de alta frecuencia y una disminución de la potencia de baja frecuencia de la actividad theta durante la fase de

búsqueda, mientras en las ratas viejas no se observo cambios en la actividad theta. Estos datos electrofisiológicos sugieren que las ratas viejas procesan la información relevante para las funciones cognitivas de una manera diferente, posiblemente conduciendo a la utilización de estrategias de aprendizaje diferentes, que las ratas jóvenes [79].

Monmaur, P. y colaboradores, diseñaron un estudio para examinar los cambios temporales (días 1, 2, 3, 8, 15, 22 y 29 post-isquemia) en los registros de actividad theta en el hipocampo dorsal (durante el sueño paradójico y vigilia) después de 20 minutos de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos, los resultados mostraron una drástica reducción de la amplitud de la actividad theta superficial y profunda (días 1 y 4 post-isquemia). Esta alteración del EEG se asoció con una pérdida excesiva de las células piramidales en la zona de CA1 del hipocampo [85]. Por otro lado el mismo Monmaur P. y colaboradores describieron los efectos a largo plazo (4-5 meses post-isquemia) de 20 minutos de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos, la presunta relación colinérgica y la actividad theta del hipocampo dorsal durante anestesia con éter y la inyección de arecolina (agonista muscarínico). Los resultados mostraron que la isquemia redujo significativamente la amplitud de la actividad theta superficial y profunda, registrada en el área CA1 del hipocampo y el giro dentado, respectivamente. El complejo formado por el núcleo septal medial y la diagonal de Broca, involucrado en la generación de la actividad theta no sufrió daño anatómico visible después de la isquemia. Por otra parte, no se observó

ninguna alteración significativa en la distribución espacial y la densidad de las neuronas del giro dentado del hipocampo en los animales isquémicos [86]. Estas fueron las primeras investigaciones para demostrar que la interrupción transitoria del flujo sanguíneo cerebral resulta en una alteración duradera de la actividad theta, ritmo que probablemente sea el aspecto principal de la actividad básica de la formación hipocampal y la integración de la memoria y el aprendizaje. Por otro lado, Buzsaki G. y colaboradores refieren que las consecuencias de la ICGA por 4VO durante 15-20 minutos provoca una pérdida neuronal en la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo y por lo tanto se observa una alteración electrofisiológica [87].

Todo lo anterior indica que el daño causado por la ICGA, podría estar asociado con las deficiencias en el aprendizaje y memoria espacial y con las alteraciones en la actividad electrofisiológica en ratas. Por otro lado, en el laboratorio hemos mostrado que un tratamiento neuroprotector con melatonina contrarresta la pérdida neuronal y las deficiencias de aprendizaje y memoria espacial en ratas [44], sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado cual es el efecto neuroprotector de la melatonina a nivel electrofisiológico y si este efecto neuroprotector preserva la capacidad funcional del hipocampo para generar la actividad theta e integrar de manera correcta las funciones cognitivas, lo cual es el objetivo del presente trabajo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos de daño de las células nerviosas que forman parte de las estructuras cerebrales requieren de un tiempo de evolución para su culminación en la forma de daño cerebral irreversible [23, 88]. Esta situación admite la posibilidad de llevar a cabo maniobras de neuroprotección orientadas a prevenir, reducir o suprimir los fenómenos fisiopatológicos provocados por la isquemia antes de que el proceso del daño sea irreversible [45, 89]. En diversos estudios, se han identificado experimentalmente los efectos neuroprotectores de la melatonina y su potencialidad para el uso clínico [44, 90].

Se conoce que el tratamiento neuroprotector con melatonina reduce de manera importante la muerte neuronal en estructuras muy vulnerables a la isquemia, como es el caso del hipocampo, y preserva las características funcionales de esta estructura en lo que se refiere al aprendizaje y memoria espacial [88, 90-91]. Sin embargo, el efecto neuroprotector de la melatonina en el hipocampo se asocia con cambios de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del cuerno de Ammón de hipocampo [44]. Por otra parte, se conoce que la generación hipocampal del ritmo theta y su influencia sobre la actividad de la corteza cerebral son correlatos importantes para la mayor eficiencia de la integración de las funciones cognoscitivas [67, 79].

¿El efecto neuroprotector de la melatonina preserva la capacidad funcional del hipocampo para generar el ritmo theta e integrar las funciones cognitivas?

JUSTIFICACION

Dentro la de investigación orientada a la identificación de los efectos neuroprotectores de compuestos originalmente endógenos, es importante evaluar el efecto neuroprotector de la melatonina con base en parámetros de los aspectos funcionales del cerebro que dependen de la integridad de estructuras cerebrales específicas muy vulnerables a la isquemia. En este caso en particular, el hipocampo y dos de sus aspectos funcionales relevantes: la generación del ritmo theta y el aprendizaje y memoria espacial.

HIPOTESIS

La presencia y magnitud del ritmo theta hipocampal se relaciona con las diferentes características del aprendizaje y la memoria espacial en animales de experimentación sometidos a isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia y magnitud del ritmo theta hipocampal y su relación con el aprendizaje y la memoria espacial en animales de experimentación sometidos a isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la eficiencia del aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris a largo plazo luego de la isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.
2. Efectuar el registro y análisis de la actividad theta del hipocampo durante las diferentes etapas de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.
3. Relacionar las características del ritmo theta hipocampal con las del aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris a largo plazo luego de la isquemia cerebral global aguda y tratamiento neuroprotector con melatonina.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES Y COMPUESTOS QUÍMICOS

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Ciencias Médica y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la guía de los institutos de Salud de Norteamérica (NIH) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (publicación NIH No. 80-23, 1996). Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

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

La melatonina (sigma, St Louis. MO, USA) se preparó para su administración mediante disolución en etanol absoluto y dilución con solución de NaCl al 0.9%, hasta una concentración final de 3.3 mg/ml, en una solución al 10% de etanol en solución salina. Como anestésicos se emplearan ketamina, xilacina y pentobarbital sódico que fueron obtenidos de preparaciones comerciales de uso veterinario, así como éter etílico.

MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA

Se utilizó el modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos [92]. Bajo anestesia con clorhidrato de xilacina (10 mg/kg, i.m.) y ketamina (90 mg/kg, i.m.), las arterias vertebrales se ocluyeron permanentemente mediante electrocauterización a través del foramen alar de la primera vértebra cervical. Las arterias carótidas comunes se aislaron y se dejaron referidas con sutura quirúrgico de seda de calibre tres ceros (000). Un catéter de 10 cm de longitud (Clay Adams, PE-50) con solución de heparina en solución salina (NaCl 0.9%, 100 U/ml), se inserto en la vena yugular interna izquierda, el extremo libre se extrajo por la nuca. Inmediatamente después de la cirugía, a cada rata se le suministró solución salina fisiológica (2ml/100g de peso corporal, s.c.) para producir hidratación post-quirúrgica y se colocaron en jaulas individuales para su recuperación. Cuarenta y ocho horas después, bajo anestesia con éter etílico, se expusieron ambas arterias carótidas. Se interrumpió la anestesia y las arterias carótidas comunes se ocluyeron por un periodo de 15 minutos mediante clips quirúrgicos microvasculares. La interrupción del flujo sanguíneo de las arterias carótidas se verificó bajo un microscopio de cirugía. La temperatura corporal se registró y mantuvo a 37 ± 0.5 °C por medio de un cojín eléctrico. A continuación los clips quirúrgicos fueron retirados de las arterias carótidas las cuales fueron revisadas baja el microscopio estereoscópico para verificar la restauración del flujo sanguíneo. El estado de conciencia de las ratas fue evaluado mediante la presencia del reflejo de enderezamiento. Solo aquellas ratas que se mantuvieron

inconscientes durante la oclusión de las carótidas y por lo menos 20 minutos posteriores a la remoción de los clips quirúrgicos microvasculares de las carótidas se incluyeron en el estudio.

GRUPOS Y TRATAMIENTO

Las ratas se asignaron al azar en diferentes grupos. Grupo 1 (n=8): intacto, Grupo 2 (n=5): Isquemia + vehículo, animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 minutos mediante oclusión de los cuatro vasos mas 20 minutos de inconciencia post-isquemia y administración del vehículo de melatonina (solución 10% de etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo de 6 h, a partir de los 30 min luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas; Grupo 3 (n=8): Isquemia + Melatonina, animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 minutos mediante oclusión de los cuatro vasos mas 20 minutos de inconciencia post-isquemia 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 min luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas.

CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Una vez recuperadas las ratas, 90 días después de la se ICGA bajo anestesia con clorhidrato de xilacina (10 mg/kg, i.m.) y ketamina (90 mg/kg, i.m.) fue implantado a permanencia un electrodo bipolar concéntrico para el registro del ritmo theta hipocampal con coordenadas 4.5 mm posterior a Bregma, 2.0 mm lateral (derecho) a la línea media y 2.5 mm ventral a la superficie del cráneo según el atlas de Paxinos y Watson [93]. Los electrodos bipolares se construyeron con alambre de nicromo de 65 μm de diámetro, fijado dentro de una cánula de acero inoxidable calibre 25 cubierta con resina epóxica, dejando expuesta una punta con una pequeña superficie de registro. Fue colocado un tornillo de acero inoxidable en el hueso frontal, que sirvió como electrodo de tierra. Posteriormente se les dejó a los animales en recuperación 15 días para realizar las evaluaciones conductuales de memoria y aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris, durante las cuales se hizo el registro del EEG.

EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

El aprendizaje y memoria espacial fueron evaluados mediante el laberinto acuático de Morris [42], que consistió en una tina circular de 140 cm de diámetro llena con agua conservada a una temperatura de 26 °C y teñida en color azul oscuro hasta una profundidad de 25 cm. La tina se colocó en un espacio donde

podieran identificarse una variedad de señales externas alrededor del laberinto, útiles para la orientación de espacial del animal. El laberinto se dividió conceptualmente en cuatro cuadrantes del mismo tamaño referidos a los puntos cardinales y en tres círculos concéntricos equidistantes. Una plataforma de escape transparente de 12X12 cm sumergida 2 cm por bajo la superficie del agua en una posición fija en el centro de uno de los cuatro cuadrantes, a 28 cm de distancia de la pared del laberinto. La plataforma se mantuvo en el mismo cuadrante a lo largo del experimento. En el laberinto, se permitió a las ratas la búsqueda de la plataforma de escape usando solamente referencias espaciales del ambiente, las cuales se conservaron constantes a través de los días de prueba. Cada rata ejecuto 2 ensayos diarios con intervalo inter-ensayo de 20 minutos, durante siete días consecutivos. Para cada ensayo la rata se introdujo al agua de cara a la pared de la tina, en uno de los cuatro cuadrantes alrededor del perímetro de la tina, el cual vario cada día de manera semialeatoria, pero fue el mismo en cada día del ensayo para todas las ratas. El ensayo finalizó cuando la rata encontró la plataforma antes de los 60 segundos (latencia de escape) de lo contrario la rata era conducida hasta la plataforma por el experimentador donde se coloco durante 15 segundos. Los valores de latencia de escape (s), la distancia de nado (m) recorrida durante la búsqueda de la plataforma, la velocidad de nado (m/s), así como el predominio de nado en las zonas delimitadas fueron promediados y analizados y finalmente al termino de los siete días de ensayos, cada rata se sometió a una prueba de transferencia durante 30 segundos para la evaluación de la memoria espacial, en la que se permitió a cada rata la búsqueda de la

plataforma, previamente retirada del laberinto. El tiempo transcurrido y el número de cruces en el cuadrante donde originalmente estuvo la plataforma fueron registrados y analizados. El desempeño de cada rata se registro mediante una cámara de video y posteriormente se trazaron las rutas para ser digitalizadas y analizadas con la ayuda de un analizador de imágenes digital. Se promediaron los resultados de los 2 ensayos diarios de cada rata por grupo y se analizaron y compararon estadísticamente.

REGISTRO DEL ELECTROENCEFALOGRAMA HIPOCAMPAL

El registro de la actividad eléctrica hipocampal se realizó durante la ejecución de las pruebas conductuales de memoria y aprendizaje en el laberinto acuático de Morris. Antes del inicio del primer ensayo de cada día de los siete días de entrenamiento se realizó el registro del EEG hipocampal en condición basal con la rata mojada en estado "*Atento quieto*" durante 15 segundos en su caja de reposo; durante la etapa de "*búsqueda*" se registró desde la colocación de la rata en el agua frente a la tina hasta que el animal subió a la plataforma de escape en un tiempo no mayor a 60 segundos, momento a partir del cual se registraron 15 segundos sobre la plataforma, lo que correspondió a la etapa llamada "*meta*". Al séptimo día en el ensayo de prueba de transferencia, además del registro basal, también se registro un periodo de 30 segundos de nado en el laberinto sin plataforma correspondiente al ensayo de prueba de transferencia. Los filtros de

alta y baja frecuencia fueron colocados a 1 y 50 Hz respectivamente, los registros se capturaron a una frecuencia de muestreo de 512 Hz, y se almacenaron para su análisis posterior mediante la Transformada Rápida de Fourier (FFT), que genera el espectro de potencia absoluta y con base a ese se determinó la potencia relativa.

Para la captura de la actividad EEG se utilizó el programa GAMA (marca GRASS), posterior a ello se revisó la señal con el objetivo de eliminar aquellos segmentos con ruido y artefactos que pudieran estar presentes, la señal de cada uno de los sitios de registro fue procesada mediante la FFT a través del programa MATLAB R2010b y se realizó el análisis estadístico de los datos de potencia resultantes a través del programa Systat 10.2 y SPSS 16.0.

La banda theta (4-12 Hz) fue dividida en tres sub-bandas componentes de theta, de baja (4-6.5 Hz), alta (7-9.5 Hz) y máxima (10-12.5 Hz) frecuencia para su análisis, ya que se ha reportado que dependiendo del estado conductual y farmacológico en el que se encuentra el individuo ocurre el predominio de una u otra sub-banda [94]. Es decir hay estados conductuales en los que las bandas se agrupan en un rango discreto, y solo en ese rango se pueden presentar cambios asociados al estado conductual.

De cada sub-banda se obtuvo el promedio de los dos ensayos diarios por cada día de prueba, de la potencia relativa de cada una de las etapas conductuales: "*atento quieto*", "*búsqueda*" y "*meta*"; con el propósito de evaluar la

adquisición de información. La potencia relativa se obtuvo a partir de la potencia absoluta de la banda de 4-12 Hz.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluaron los parámetros convencionales de eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial: latencia de escape y trayectoria recorrida para localizar la plataforma sumergida. La actividad eléctrica cerebral se analizó mediante el análisis espectral de potencia para identificar y evaluar la magnitud de la potencia de las bandas de la frecuencia theta. Se realizaron las comparaciones intragrupal de la mediana de las latencias de escape por día, mediante análisis de varianza no paramétrica de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon. Las comparaciones intergrupales de latencia de escape fueron realizadas mediante la prueba de Kruskal-Wallis y por la prueba de "U" de Mann-Whitney. Los datos de la distancia total recorrida y velocidad de nado durante la etapa de "búsqueda" fueron comparados mediante análisis de varianza de medias repetidas y la prueba de Tukey. La actividad eléctrica hipocámpal, una vez dividida en las tres bandas sub componentes de theta (de baja frecuencia: 4-6.5 Hz; alta frecuencia: 6.5-9.5 Hz; máxima frecuencia: 9.5-12 Hz) fueron comparada en fases en un mismo día de prueba y por día de prueba en la misma fase. Las comparaciones de la potencia relativa, se realizaron mediante análisis de varianza y la prueba Tukey como prueba a posteriori. Se realizó el análisis de correlación de los valores de distancia recorrida con la potencia theta para los diferentes grupos de animales, mediante la prueba de correlación de Spearman.

RESULTADOS

APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN EL LABERINTO ACUÁTICO DE MORRIS

La ejecución en la prueba de aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris por parte de los animales de los diferentes grupos experimentales dio lugar a los siguientes resultados.

Las latencias de escape registradas en el grupo INTACTO durante el periodo de prueba mostraron una reducción progresiva en los días sucesivos ($X^2 = 32.112$, $p \leq 0.001$), de tal manera que los valores de estos parámetros fueron significativamente menores a partir del segundo día de prueba y en los días restantes en comparación con aquellos observados el primer día (día 2 $p=0.018$, día 3 $p=0.018$, día 4 $p=0.012$, día 5 $p=0.012$, día 6 $p=0.012$ y día 7 $p=0.012$) (Figura 5A).

A diferencia de lo observado en el grupo INTACTO, las ratas del grupo ISQ-VEH no mostraron reducción de las latencias de escape para alcanzar la plataforma en el laberinto acuático de Morris a lo largo de los días de prueba ($X^2=9.788$, $p=0.134$), excepto el último día en que el valor de este parámetro fue significativamente menor en comparación con el primer día de prueba (día 7 $p=0.043$) (Figura 5B).

Por otra parte, los animales del grupo ISQ-MEL mostraron una disminución de la latencia de escape similar a la mostrada en los animales del grupo INTACTO

($X^2=20.096$, $p=0.003$), en función de la búsqueda y localización de la plataforma sumergida, observándose una reducción significativa de este parámetro a partir del segundo día de prueba en comparación con el primer día y en los días restantes (día 2 $p=0.028$, día 3 $p=0.028$, día 4 $p=0.018$, día 5 $p=0.018$, día 6 $p=0.028$ y día 7 $p=0.018$) (Figura 5C).

Cabe destacar que los valores de latencias de escape de los animales de los grupos INTACTO e ISQ-MEL mostraron una reducción progresiva a lo largo de la prueba, como puede observarse en las figura 5A, C y D con valores similares en ambos grupos.

Por otro lado, en el análisis intergrupar, los valores de latencia de escape del grupo ISQ-VEH fueron mayores a los mostrados en los grupos INTACTO e ISQ-MEL a lo largo de la prueba (día 1 $X^2=2.875$, $p=0.238$, día 2 $X^2=2.768$, $p=0.251$, día 3 $X^2=2.141$, $p=0.343$, día 4 $X^2=8.22$, $p=0.016$, día 5 $X^2=9.928$, $p=0.007$, día 6 $X^2=9.578$, $p=0.008$ y día 7 $X^2=4.969$, $p=0.083$). Al analizar los valores de latencia de escape de los grupos INTACTO e ISQ-VEH, mostraron una diferencia significativa a partir del cuarto día hasta finalizar la prueba (día 4 $p=0.019$, día 5 $p=0.040$, día 6 $p=0.005$, día 7 $p=0.028$), mientras que los valores de latencia de escape de los grupos ISQ-VEH e ISQ-MEL mostraron una diferencia significativa exclusivamente los días 4, 5 y 6 de la prueba (día 4 $p=0.007$, día 5 $p=0.007$, día 6 $p=0.011$). Ahora bien los valores de latencia de escape de los grupos INTACTO e ISQ-MEL mostraron una diferencia significativa, únicamente el día 5 de la prueba ($p=0.049$) (Figura 5D).

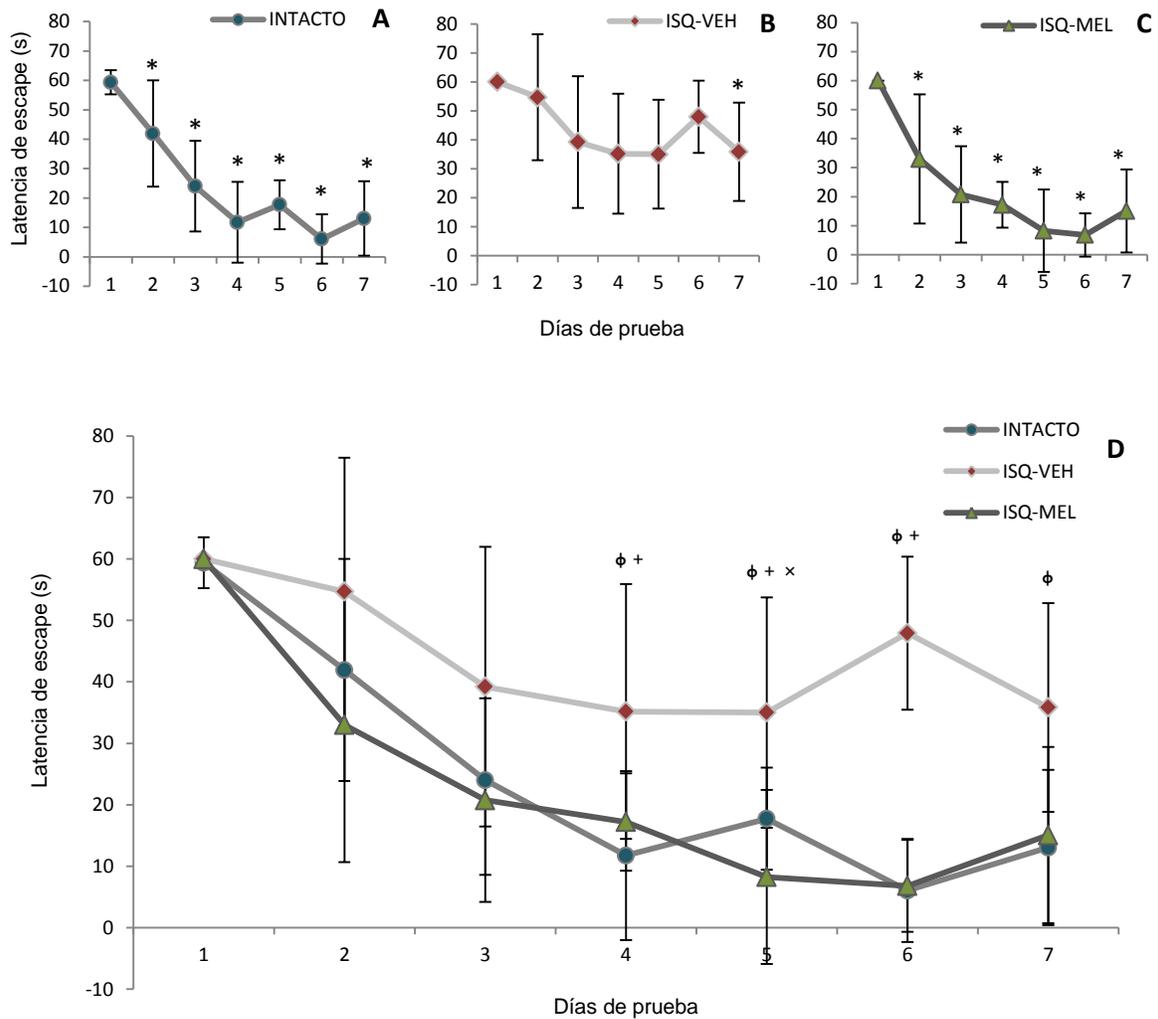
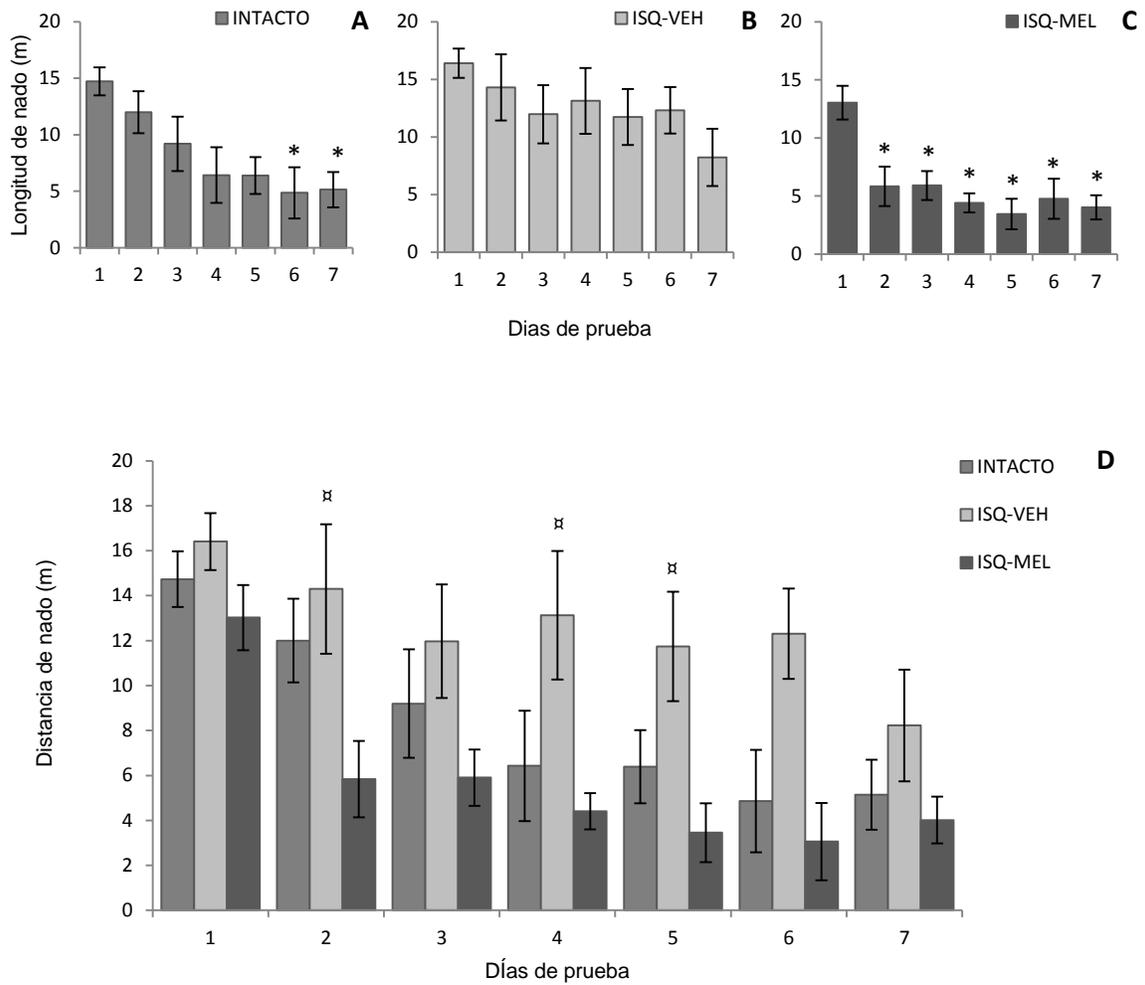


Figura 5. Aprendizaje espacial (latencias de escape (s)) en el laberinto acuático de Morris durante los 7 días de prueba aplicada 90 días después del episodio de isquemia cerebral global aguda (mediana \pm EE de la mediana). **A.** Grupo INTACTO *día 1 vs. siguientes $p < 0.05$. **B.** Grupo ISQ-VEH *día 1 vs. siguientes $p < 0.05$. **C.** Grupo ISQ-MEL *día 1 vs. siguientes $p < 0.05$. **D.** ϕ INTACTO vs. ISQ-VEH; +ISQ-VEH vs. ISQ-MEL; \times INTACTO vs. ISQ-MEL $p < 0.05$.

La distancia de nado para encontrar la plataforma registradas en los grupos INTACTO ($F_{6,54}=3.425$, $P=0.007$) e ISQ-MEL ($F_{6,48}=5.708$, $p=0.000$) durante el periodo de siete días de prueba mostraron una reducción progresiva, de tal manera que los valores de este parámetro en el grupo INTACTO fueron significativamente menores los últimos dos días de la prueba (día 6 $p=0.016$ y día 7 $p=0.042$) (Figura 6A), mientras que el grupo ISQ-MEL mostró longitudes significativamente menores a partir del segundo día y por el resto de la prueba (día 2 $p=0.010$, día 3 $p=0.011$, día 4 $p=0.001$, día 5 $p=0.000$, día 6 $p=0.002$ y día 7 $p=0.001$) (Figura 6C). En contraste con lo anterior, en el grupo ISQ-VEH los valores obtenidos disminuyeron a lo largo de la prueba sin diferir significativamente con los observados el primer día ($F_{6,34}=1.013$, $p=0.437$) (Figura 6B).

En relación con el análisis intergrupar, los valores de la distancia de nado de los animales del grupo ISQ-VEH fue mayor a la observada en los grupos INTACTO e ISQ-MEL (día 1 $F_2=1.388$, $p=0.277$, día 2 $F_2=4.255$, $p=0.032$, día 3 $F_2=1.796$, $p=0.196$, día 4 $F_2=3.749$, $p=0.045$, día 5 $F_2=5.026$, $p=0.019$, día 6 $F_2=3.614$, $p=0.049$, día 7 $F_2=1.407$, $p=0.274$). Respecto a la distancia de nado del grupo ISQ-VEH e ISQ-MEL se observó una diferencia significativa los días de prueba 2, 4 y 5 (día 2 $p=0.038$, día 4 $p=0.041$ y día 5 $p=0.015$) (figura 6D).



La velocidad de nado de cada uno de los grupos en las diferentes condiciones experimentales no mostro cambios significativos a lo largo de los días de prueba (INTACTO $F_6=0.922$, $p=0.0488$, ISQ-VEH $F_6=0.122$, $p=0.992$, ISQ-MEL $F_6=0.885$, $p=0.514$) (Figura 7A-C). Al comparar los valores de velocidad de nado de manera intergrupar (día 1 $F_2=1.384$, $p=0.277$, día 2 $F_2=6.111$, $p=0.010$, día 3 $F_2=1.976$, $p=0.169$, día 4 $F_2=1.631$, $p=0.225$, día 5 $F_2=0.240$, $p=0.789$, día 6 $F_2=0.537$, $p=0.594$ y día 7 $F_2=0.996$, $p=0.390$) del grupo INTACTO con el grupo ISQ-MEL, solo se observo una diferencia significativa el segundo día de prueba ($p=0.017$) (Figura 7D).

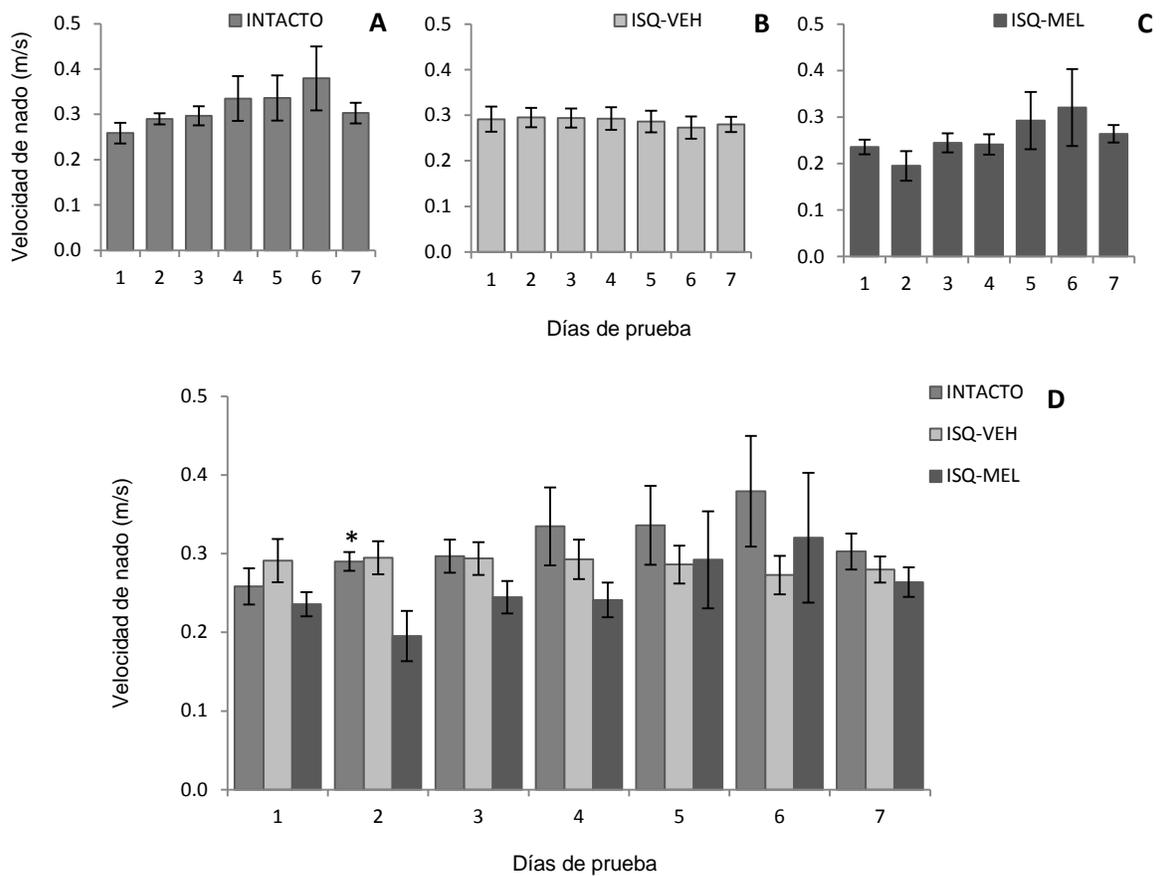


Figura 7. Velocidad de nado (m/s) en el laberinto acuático de Morris durante los 7 días de prueba aplicada 90 días después del episodio de isquemia cerebral global aguda (media \pm EE). **A.** Grupo INTACTO. **B.** Grupo ISQ-VEH. **C.** Grupo ISQ-MEL. **D.** *INTACTO vs. ISQ-MEL $p < 0.05$.

En el análisis cualitativo de las trayectorias de nado en la resolución del laberinto acuático de Morris en los diferentes grupos experimentales se observó que el primer día de prueba los animales de los tres grupos mostraron un patrón de nado circular con trayectorias cercanas a la pared de la tina (tigmotaxis). En relación a los grupos INTACTO e ISQ-MEL el patrón de nado cambio a otro con trayectoria orientada hacia la zona central de la tina, preferentemente hacia el sitio

de ubicación de la plataforma, conforme las latencias de escape y la longitud de las trayectorias de nado se redujeron al mínimo en los días sucesivos de la prueba. De hecho los animales de estos grupos se desplazaron en la zona interior del laberinto, en el cuadrante donde estuvo ubicada la plataforma durante la prueba de transferencia. Por otro lado, los animales del grupo ISQ-VEH mostraron en general un patrón de nado asociado con tigmotaxis persistente, y durante la prueba de transferencia su estancia fue menor en el cuadrante donde estuvo colocada la plataforma (Figura 8).

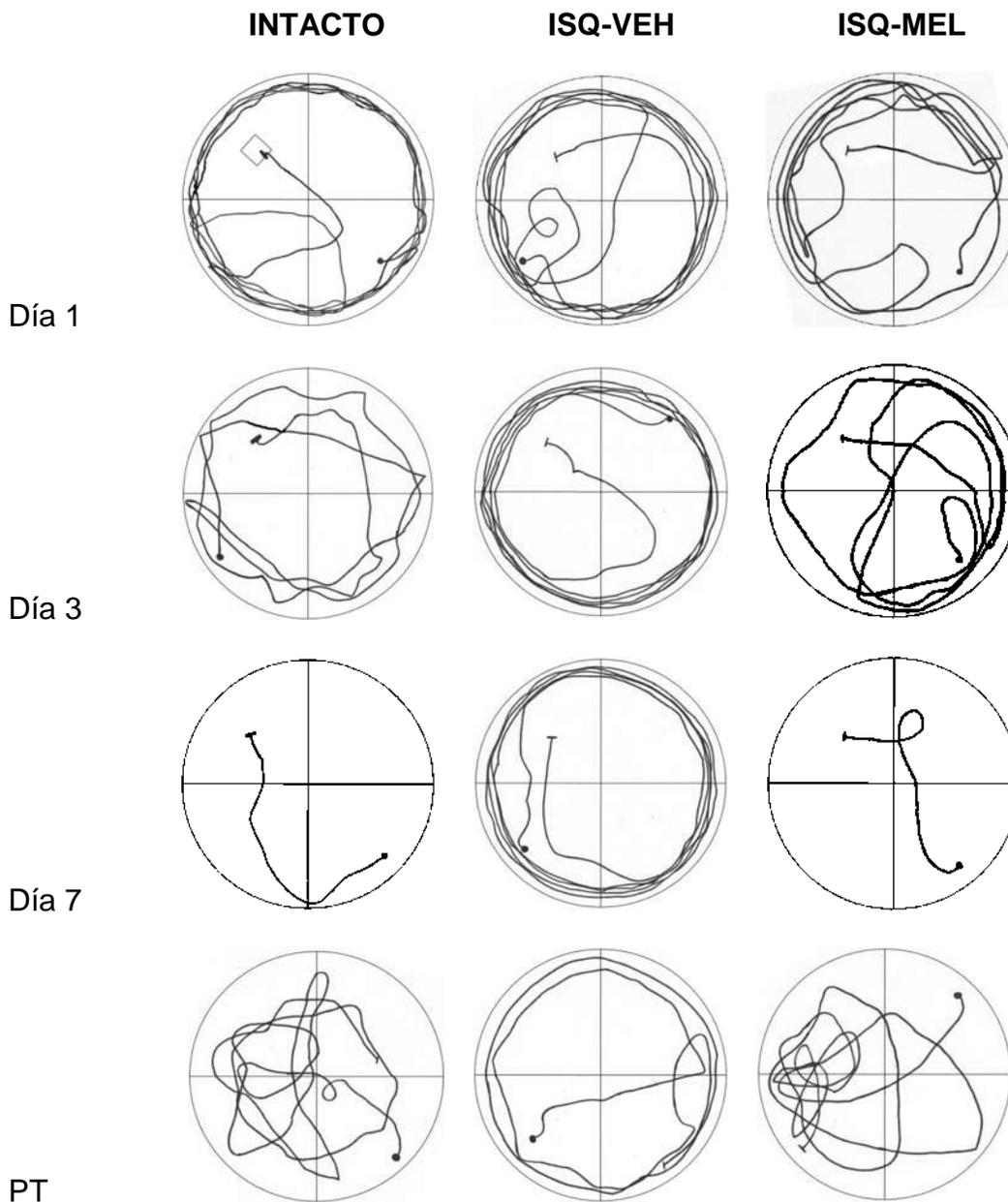


Figura 8. Trayectorias representativas del nado de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris en los días de prueba 1, 3, 7 y prueba de transferencia. Las trayectorias de nado circular cerca de la pared de la tina (tigmotaxis) se observa en todos los grupos el primer día, cambia a trayectorias orientadas hacia la parte interna del laberinto con ruta dirigida hacia el sitio de ubicación de la plataforma sumergida en los grupos INTACTO e ISQ-MEL, en tanto que en el grupo ISQ-VEH se observa tigmotaxis persistente hasta el final de la prueba y prueba de transferencia.

En el análisis de la prueba de transferencia se muestra el número de cruces en el cuadrante donde originalmente estuvo ubicada la plataforma. Como se observa en la figura 9 los valores del número de cruces fueron similares y mayores para el grupo INTACTO e ISQ-MEL respecto al grupo ISQ-VEH sin mostrar diferencias significativas ($F_2=0.836$, $p=0.50$).

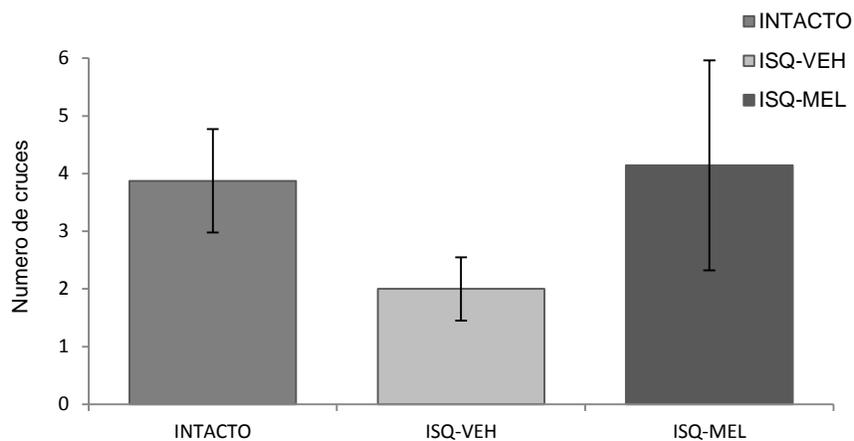


Figura 9. Numero de cruces (media±EEM) en la prueba de transferencia, a través del área donde originalmente estuvo colocada la plataforma.

REGISTRO DEL EEG HIPOCAMPAL

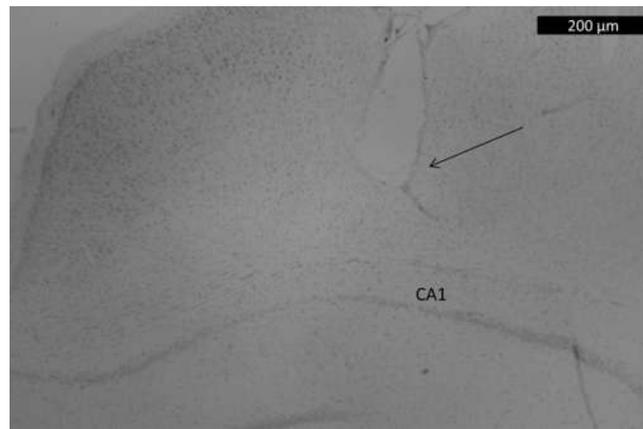


Figura 10. Fotomicrografía de un corte coronal del hipocampo de la rata, en el que se muestra la posición del electrodo de registro (flecha). Amplificación 10X.

Los registros del EEG (potencia absoluta) en el área CA1 del hipocampo de los animales en las diferentes condiciones experimentales, durante los siete días de entrenamiento mostraron actividad theta en las tres etapas conductuales consideradas en el presente estudio: basal, búsqueda y meta. Se registró actividad theta durante las tres etapas conductuales. En la figura 10 se muestra un ejemplo de un trazo electroencefalográfico en las tres condiciones experimentales INTACTO, ISQ-VEH e ISQ-MEL del estudio. Es importante destacar que los animales de los grupos INTACTO e ISQ-MEL muestran una frecuencia y una amplitud de la actividad theta similares en la etapa de búsqueda, que corresponde en magnitud y características a la actividad theta hipocampal relacionada con el aprendizaje espacial. En contraste con el grupo del grupo ISQ-VEH se observó una disminución en la frecuencia y una amplitud muy pequeña.

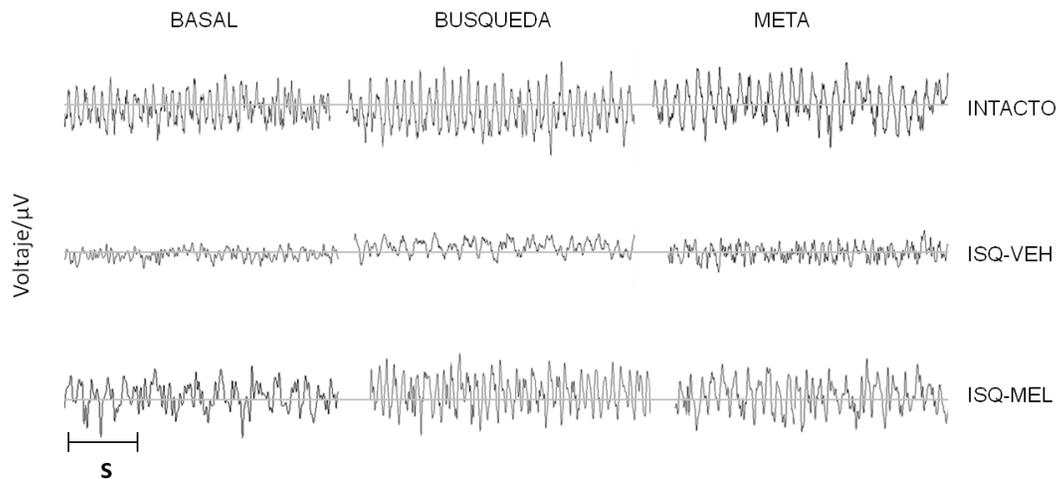


Figura 11. Trazos electroencefalográficos de potencia absoluta representativos de la actividad theta obtenidos de un animal de cada grupo experimental. De izquierda a derecha: etapa basal, etapa de búsqueda y etapa de meta.

Se realizaron comparaciones intragrupal de potencia relativa (PR) para los factores día (1-7), etapa (basal, búsqueda y meta) y sub-banda de frecuencia (baja: 4-6.5Hz, alta: 6.5-9.5 Hz y máxima: 9.5-12 Hz), para cada grupo.

Como se observa en la figura 12 (intragrupal INTACTO) las comparaciones considerando los factores etapa-banda mostraron un efecto significativo ($F_{4,446}=44.349$, $p \leq 0.001$), las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre las bandas de baja y alta frecuencia en las etapas de basal ($p \leq 0.001$) y búsqueda ($p \leq 0.001$) (Figura 12A). Por otro lado en la comparación considerando la interacción de los factores día-banda, se observó un efecto significativo ($F_{12,446}=2.138$, $p=0.014$), las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre la banda de baja y alta frecuencia el día dos ($p=0.041$) (Figura 12B). Mientras tanto en la comparación considerando los

factores día-banda de la etapa búsqueda, mostraron diferencias significativas ($F_{24,446}=3.046$, $p\leq 0.001$) entre la banda de baja y alta frecuencia a lo largo de la prueba los días 2, 4, 5, 6 y 7 (día 2 $p=0.003$, día 4 $p=0.001$, día 5 $p=\leq 0.001$, día 6 $p=0.046$ y día 7 $p=0.001$) (Figura 12C).

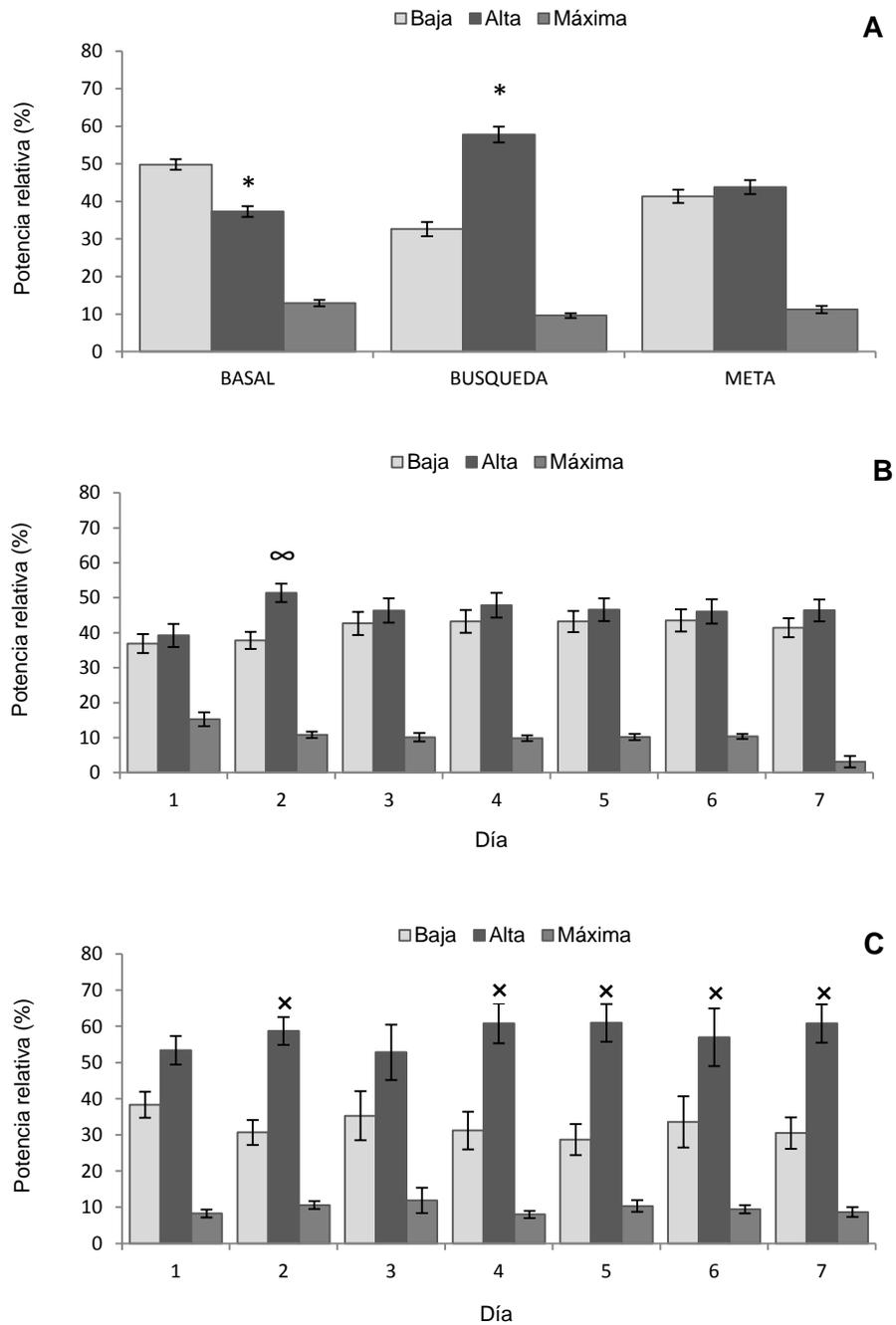


Figura 12. Potencia relativa (media \pm EE) de las tres sub-bandas de actividad theta, registradas durante el laberinto acuático de Morris en el grupo INTACTO. **A.** Comparación por etapa-banda, bandas de frecuencia baja vs. alta $*p < 0.005$. **B.** Comparación por día-banda, bandas de frecuencia baja vs. alta $^{\infty}p < 0.05$. **C.** Comparación por día y banda de la etapa búsqueda, bandas de frecuencia baja vs. alta $^x p < 0.05$.

En la figura 13 (intragrupal ISQ-VEH) las comparaciones considerando los factores etapa-banda mostraron un efecto significativo ($F_{4,254}=18.515$, $p\leq 0.001$), las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre las bandas de baja y alta frecuencia en las tres etapas durante el laberinto acuático de Morris (basal $p=0.041$, búsqueda $p\leq 0.001$ y meta $p\leq 0.001$) (Figura 13A). Por otra parte en la comparación considerando la interacción de los factores día-banda, se observó un efecto significativo ($F_{12,254}=2.101$, $p=0.017$) y las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre la banda de baja y alta frecuencia de los días tres y seis (día 3 $p=0.048$ y día 6 $p=0.001$) (Figura 13B). Con respecto a la comparación considerando los factores día-banda de la etapa búsqueda, mostraron diferencias con tendencia a significativas ($F_{22,80}=1.740$, $p=0.074$) y en las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre la banda de baja y alta frecuencia los días 3 y 6 (día 3 $p=0.001$ y día 6 $p=0.004$) (Figura 13C).

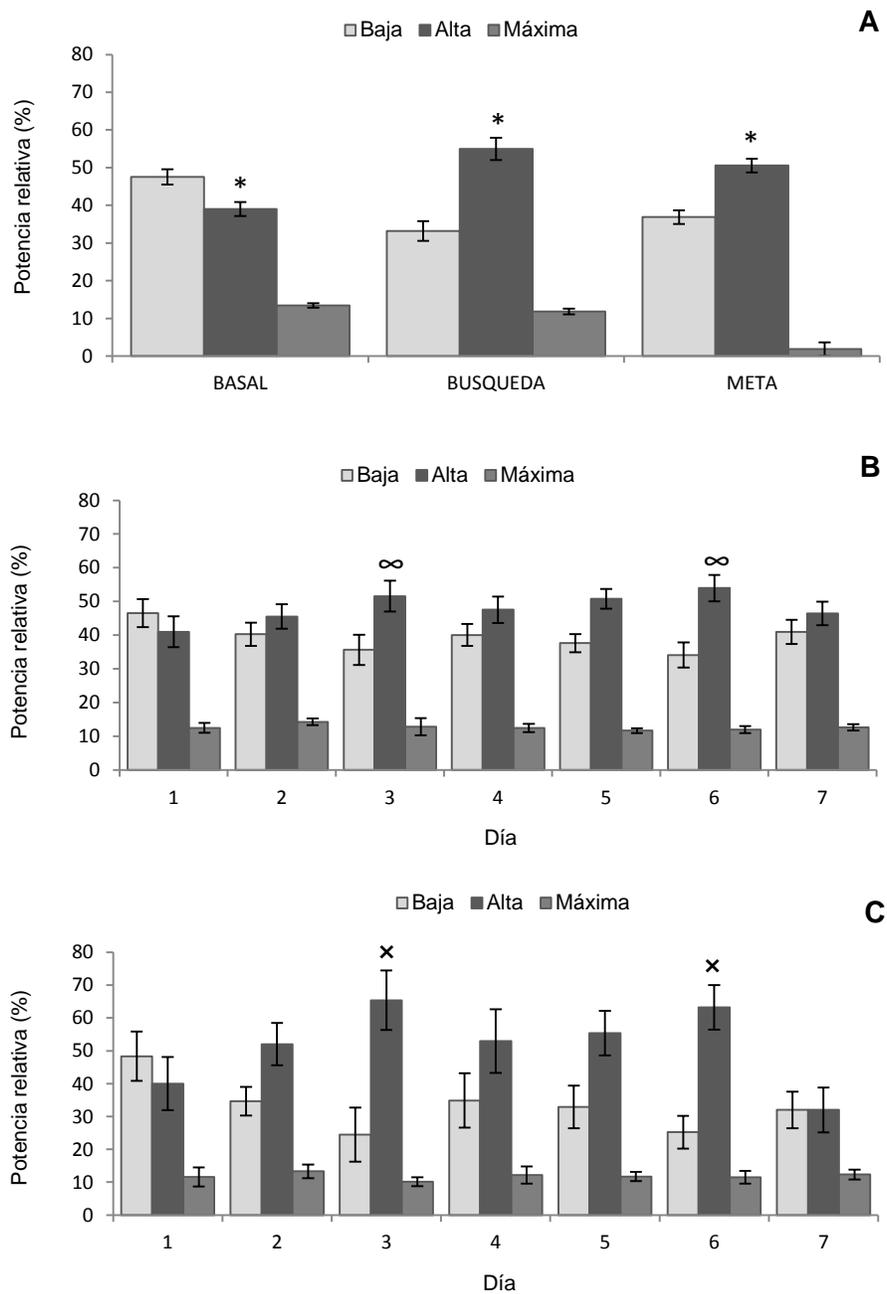


Figura 13. Potencia relativa (media ± EE) de las tres sub-bandas de actividad theta, registradas durante el laberinto acuático de Morris en el grupo ISQ-VEH. **A.** Comparación por etapa-banda, bandas de frecuencia baja vs. alta * $p < 0.005$. **B.** Comparación por día-banda, bandas de frecuencia baja vs. alta $^{\infty}p < 0.05$. **C.** Comparación por día y banda de la etapa búsqueda, bandas de frecuencia baja vs. alta $^x p < 0.05$.

En la figura 14 (intragrupal ISQ-MEL) las comparaciones realizadas, considerando los factores etapa-banda mostraron un efecto significativo ($F_{4,372}=34.612$, $p\leq 0.001$), de tal manera las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre las bandas de baja y alta frecuencia en las etapas de búsqueda ($p\leq 0.001$) y meta ($p\leq 0.001$) (Figura 14A). Con respecto a la comparación considerando la interacción de los factores día-banda, se observó un efecto significativo ($F_{12,372}=2.827$, $p=0.001$) por tal motivo las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre la banda de baja y alta frecuencia de los días 1, 2, 3, 4 y 6 (día 1 $p\leq 0.001$, día 2 $p=0.004$, día 3 $p=0.046$, día 4 $p\leq 0.001$ y día 6 $p=0.018$) (Figura 14B). Respecto a la comparación considerando los factores día-banda de la etapa búsqueda, mostraron diferencias con tendencia a significativas ($F_{12,120}=1.749$, $p=0.065$), sin embargo en las comparaciones pareadas mostraron diferencias significativas entre la banda de baja y alta frecuencia a lo largo de la prueba, los días 1, 2, 3, 4 y 6 (día 1 $p\leq 0.001$, día 2 $p=0.006$, día 3 $p\leq 0.001$, día 4 $p\leq 0.001$ y día 6 $p=0.001$) (Figura 14C).

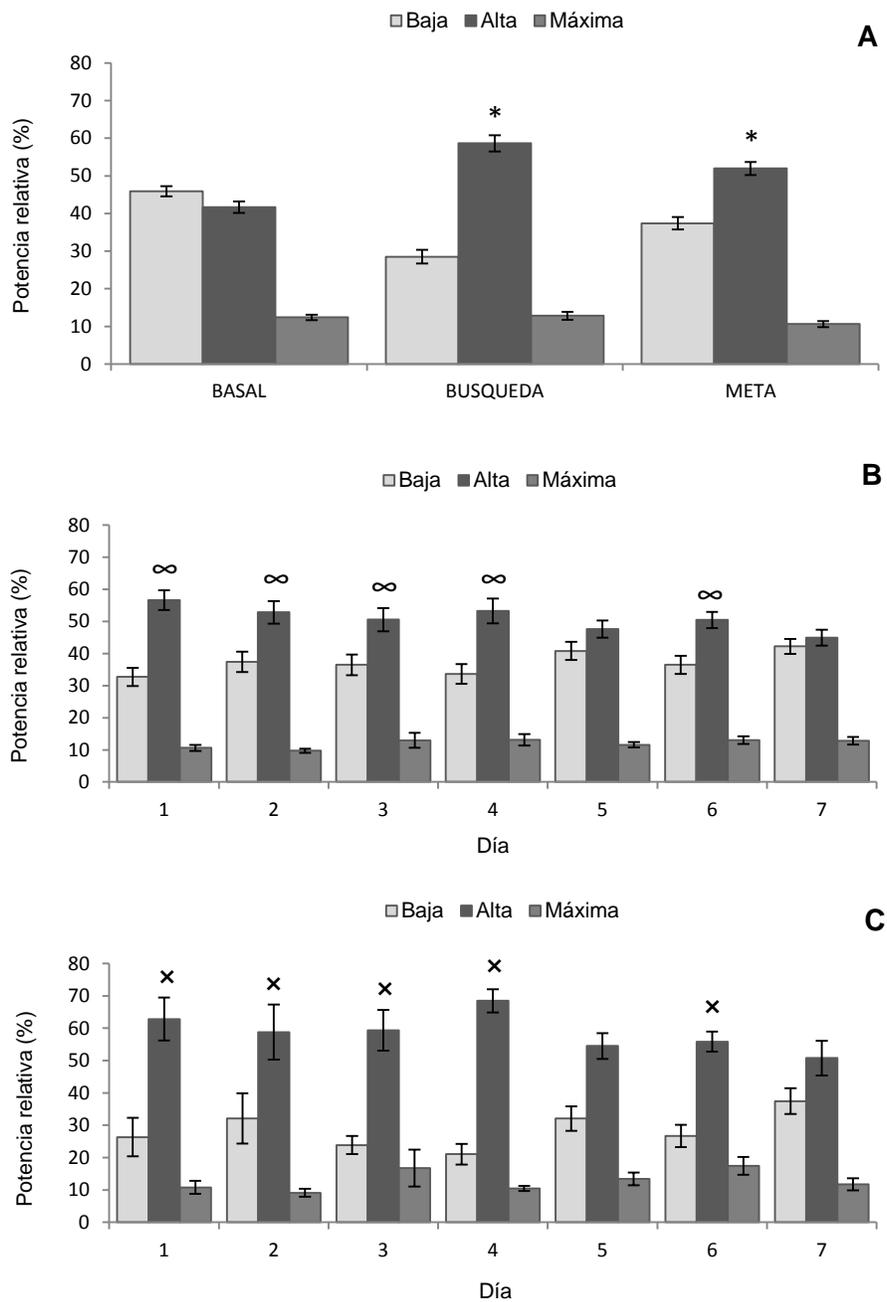


Figura 14. Potencia relativa (media \pm EE) de las tres sub-bandas de actividad theta, registradas durante las tres etapas en el laberinto acuático de Morris en el grupo ISQ-MEL. **A.** Comparación por etapa-banda, bandas de frecuencia baja vs. alta $*p < 0.005$. **B.** comparación por día-banda, bandas de frecuencia alta vs. baja $^{\infty}p < 0.05$. **C.** comparación por día-banda etapa de búsqueda, bandas de frecuencia alta vs. baja $^x p < 0.05$.

Los resultados obtenidos de la prueba de transferencia de los diferentes grupos en las condiciones basal y búsqueda. En la comparación intragrupal en el grupo INTACTO se observó una diferencia significativa en las sub-bandas baja ($p=0.000$) y alta ($p=0.000$) en las condiciones basal y búsqueda. Para el grupo ISQ-VEH, en la comparación intragrupal no se observaron diferencias en las tres sub-bandas en las condiciones basal y búsqueda. Por otro lado el grupo ISQ-MEL, en la comparación intragrupal se observó una diferencia significativa únicamente en la sub-banda de alta frecuencia en las condiciones basal y búsqueda ($p=0.043$). En la comparación intragrupal para los tres grupos en la condición de búsqueda se mostró una diferencia significativa en los valores de las sub-bandas de frecuencia baja y alta (INTACTO $p=0.000$, ISQ-VEH $p=0.000$ e ISQ-MEL $p=0.000$) (Figura 15).

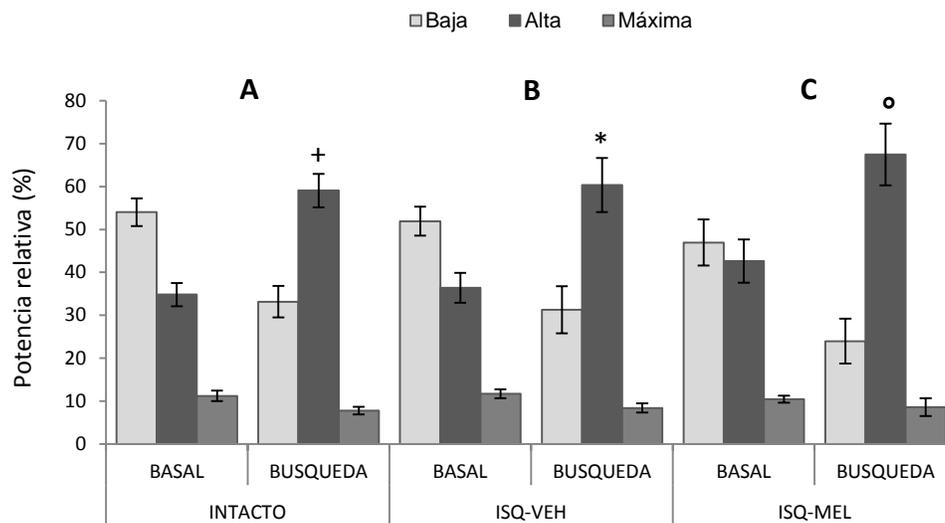
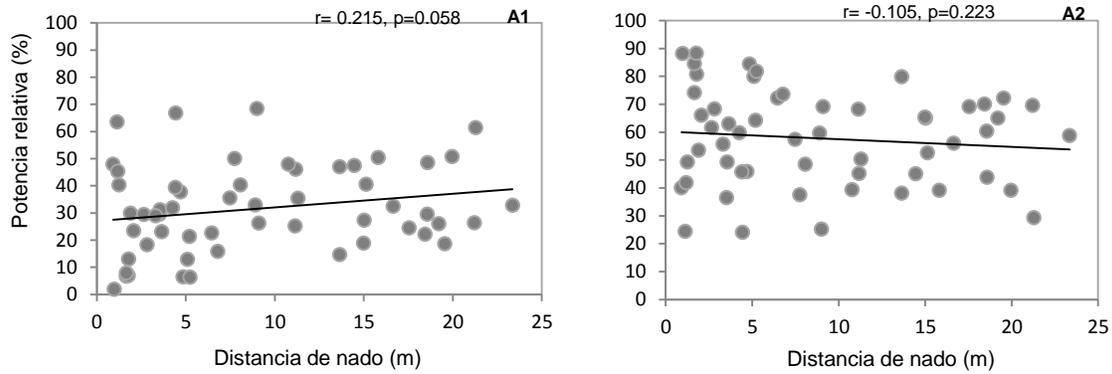


Figura 15. Potencia relativa (media \pm EE) de las tres sub-bandas de actividad theta, registradas en la prueba de transferencia en el laberinto acuático de Morris en los tres grupos experimentales. **A.** Comparación intragrupal del grupo INTACTO en las sub-bandas de baja y alta frecuencia en la etapa de búsqueda $+p < 0.05$. **B.** Comparación intragrupal del grupo ISQ-VEH en las sub-bandas de baja y alta frecuencia en la etapa de búsqueda $*p < 0.05$. **C.** Comparación intragrupal del grupo ISQ-MEL en las sub-bandas de baja y alta frecuencia en la etapa de búsqueda $^{\circ}p < 0.05$.

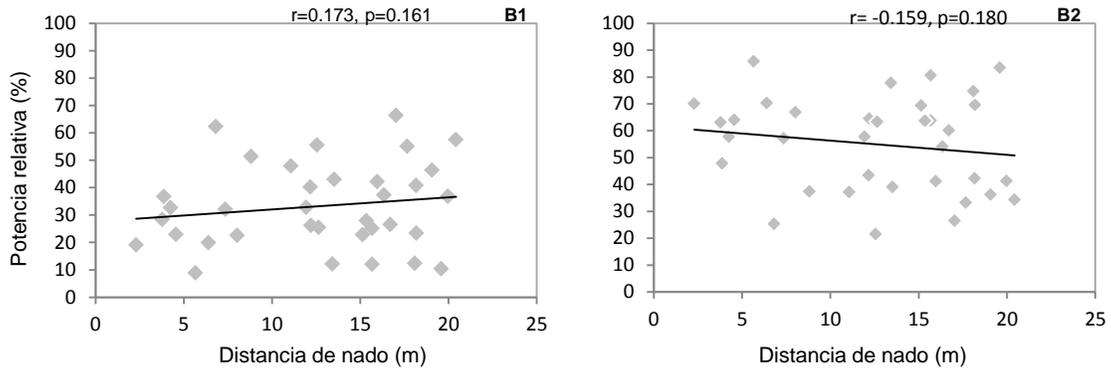
CORRELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD THETA HIPOCAMPAL Y EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL

El análisis de correlación entre la longitud de nado y las sub-bandas de baja y alta frecuencia de la actividad theta en la etapa de búsqueda, para los tres grupos experimentales, muestra los siguientes resultados; en el grupo INTACTO se observó una correlación positiva entre la distancia de nado y la potencia relativa de baja frecuencia ($r= 0.215$, $p=0.058$) (Figura 16A1), y una correlación negativa entre la alta frecuencia de actividad theta ($r= -0.105$, $p=0.223$) y la distancia de nado (Figura 16A2). Por otro lado en el grupo ISQ-VEH, se observó una correlación positiva entre la distancia de nado y la potencia relativa de baja frecuencia ($r=0.173$, $p=0.161$) (Figura 16B1), y una correlación negativa entre la alta frecuencia de actividad theta ($r= -0.159$, $p=0.180$) y la distancia de nado (Figura 16B2). Lo contrario sucedió con la correlación del grupo ISQ-MEL, se observa una correlación negativa entre la distancia de nado y la actividad theta de baja frecuencia ($r= -0.170$, $p=0.122$) (Figura 16C1) y una correlación positiva significativa entre la distancia de nado y la actividad theta de alta frecuencia ($r=0.268$, $p=0.031$) (Figura 16C2).

INTACTO



ISQ-VEH



ISQ-MEL

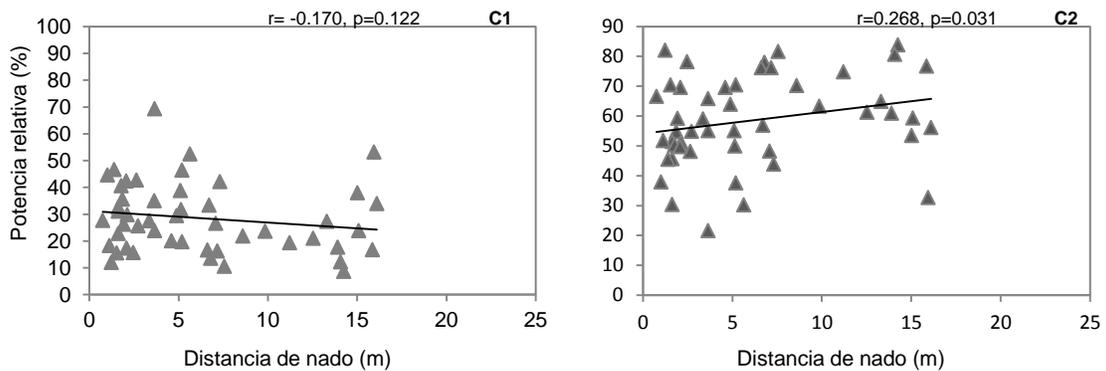


Figura 16. Correlación de Spearman entre la potencia relativa de baja y alta frecuencia y la longitud de nado, en los tres grupos experimentales. **A.** grupo INTACTO en la etapa de búsqueda, **1** potencia relativa baja y **2** potencia relativa alta. **B.** grupo ISQ-VEH en la etapa de búsqueda, **1** potencia relativa baja y **2** potencia relativa alta. **C.** grupo ISQ-MEL en la etapa de búsqueda, **1** potencia relativa baja y **2** potencia relativa alta.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con melatonina durante las 6 horas siguientes a un periodo de 15 minutos de isquemia cerebral global aguda da lugar, a una ejecución similar al grupo de animales intacto de las tareas de aprendizaje y memoria espacial evaluadas en el laberinto acuático de Morris. La evaluación se llevo a cabo tres meses después del periodo de isquemia mediante los parámetros de latencia de escape (s), distancia de nado (m) y velocidad de nado (m/s). En contraste el grupo de animales sometidos al mismo procedimiento pero tratados con vehículo ante la prueba de aprendizaje y memoria espacial mostraron un desempeño deficiente. Esta evidencia confirma lo previamente reportado [44] del efecto neuroprotector de la melatonina neutralizando los mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral que se presentan de manera inmediata en el daño por isquemia cerebral global transitoria y reperfusión.

La gran vulnerabilidad de las neuronas piramidales del cuerno de Ammón del hipocampo hace de ésta un parámetro muy sensible tanto de daño como de evaluación de propuestas de neuroprotección en modelos experimentales de isquemia cerebral global aguda [56] en estudios anteriores se mostro que la melatonina lograba preservar en el hipocampo de animales experimentales sometidos a isquemia cerebral global aguda, un 80% la población de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo además de que al evaluarse la capacidad

de memoria espacial vinculada con estas células, su respuesta fue similar a los animales intactos[44].

Por otro lado, la memoria espacial es un proceso dependiente del hipocampo, estructura cerebral subcortical que codifica el espacio en forma de mapas formados a partir de señales espaciales [95]. El laberinto acuático diseñado por Morris es un modelo para evaluar el desempeño cognitivo en animales de experimentación [42], de manera que gradualmente van estableciendo vías de nado directas hacia la plataforma sin importar el cuadrante de inicio del ensayo. La capacidad de un animal para localizar eficientemente una plataforma (memoria espacial) parte de la formación de mapas espaciales a partir de las señales que rodean la piscina. Su eficiencia se dará a lo largo de varios días de ensayo (fase de adquisición o aprendizaje) y se confirmara al final mediante la prueba de transferencia [96].

Una de las teorías más importantes de la función hipocampal ha sido la teoría del mapa cognitivo que establece que la sincronía de disparo de las neuronas hipocampales [97-98] (células de lugar) está relacionada con la localización del animal en el desempeño de una prueba [78, 99] Múltiples evidencia muestran que la actividad de las neuronas del hipocampo tanto en ratas como primates se asocia con el desempeño cognitivo, la navegación espacial y tareas de aprendizaje y memoria. Un aumento en la actividad theta hipocampal de alta frecuencia (6.5-9.5 Hz) durante pruebas de navegación utilizando el laberinto acuático de Morris se relacionan con la utilización de mapas cognitivos [67, 78].

La actividad theta se presenta durante conductas asociadas con la adquisición de información ambiental es por ello que se ha propuesto que la actividad theta podría estar reflejando el procesamiento de información por parte del hipocampo, y está relacionada con los procesos de aprendizaje y memoria organizados por esta estructura cerebral [55, 71].

El análisis cualitativo de los registros electroencefalográficos obtenidos durante la resolución del laberinto acuático de Morris, en los animales del grupo INTACTO e ISQ-MEL muestran una actividad theta con una amplitud y sincronización similar durante la etapa de búsqueda. Este dato confirma que la actividad theta hipocampal está involucrada en funciones de procesamiento de la información espacial y en la formación de memoria dependiente del hipocampo [67, 78-79].

Por otro lado el registro electroencefalográfico de la actividad theta durante la etapa de búsqueda en los animales del grupo ISQ-VEH mostro una disminución en la amplitud y desincronización de la señal. Lo anterior confirma los hallazgos por Monmaur P. en un modelo de isquemia cerebral global aguda en ratas, sus resultados mostraron una drástica reducción de la amplitud de la actividad theta superficial y profunda. Esta alteración del EEG se asoció con una pérdida excesiva de las células piramidales en la región CA1 del hipocampo [85] por lo cual concluyeron que las alteraciones en la actividad theta hipocampal están relacionadas directamente con la muerte de las células piramidales de la región CA1.

En el presente estudio los animales del grupo INTACTO, a semejanza de lo ya reportado presento actividad theta significativa de alta frecuencia a lo largo del entrenamiento en la etapa de búsqueda, conducta asociada al proceso de adquisición de información [79]. Por otro lado, el grupo de animales ISQ-MEL mostraron un desempeño en el laberinto acuático de Morris similar al reportado previamente [44]. Respecto a los registros de actividad theta hipocampal simultáneos a la ejecución del laberinto acuático de Morris, se observó una separación entre las sub-bandas de baja y alta frecuencia durante la etapa de búsqueda. Los animales del grupo ISQ-MEL se diferenciaron del grupo INTACTO por presentar potencia relativa de alta frecuencia a partir del primer día de prueba en la etapa de búsqueda. Suponemos que la reorganización del sistema nervioso central como respuesta al periodo de isquemia y la presencia de melatonina en la etapa inmediata favorecieron la preservación del hipocampo y de sus funciones confirmadas a través de la evaluación del aprendizaje espacial y la presencia de actividad theta de alta frecuencia correspondiente.

El grupo ISQ-VEH conservo algunas similitudes en potencia relativa con el grupo INTACTO. Se expreso el aumento de actividad theta de alta frecuencia asociado al aprendizaje característico del desplazamiento que hace la rata en la etapa de búsqueda de la plataforma, sin embargo su presencia fue esporádica (figura 13C), siguiendo un patrón diferente al grupo INTACTO (figura 12C). En relación al patrón de nado a lo largo de la prueba, el grupo ISQ-VEH mostro tigmotaxis persistente (figura 8) una de las características de daño por isquemia

cerebral global aguda descrita es la elevada vulnerabilidad del hipocampo que desencadena en la muerte de células piramidales [85-88, 100], por lo que aquellos animales que constituyeron el grupo ISQ-VEH presentan una pérdida considerable de neuronas piramidales [8, 87] y de ahí su disminución en la amplitud y frecuencia del ritmo theta hipocampal.

Es de suponer que la melatonina administrada mediante infusión continúa en una dosis de 10 mg/kg/h en un periodo de 6 horas siguientes al episodio de isquemia cerebral global aguda, coincidió con la ventana de oportunidad terapéutica para ejercer su efecto neuroprotector al alcanzar altas concentraciones plasmáticas y seguramente en líquido cefalorraquídeo que le permitieron neutralizar diversos mecanismos fisiopatológicos propios de la isquemia. Lo anterior nos permite asumir que el efecto de la melatonina previno la muerte de las neuronas piramidales del hipocampo en el grupo ISQ-MEL, comprobado tres meses después en los animales que recibieron el tratamiento su capacidad de desarrollo de memoria espacial así como la presencia de actividad theta hipocampal (figura 14C) durante el desarrollo de esta.

La melatonina es reconocida como una molécula con propiedades antioxidantes por su capacidad de atrapar radicales libres y de esta manera neutralizar el efecto nocivo contra estructuras sub-celulares como la mitocondria y diversas biomoléculas [101-106]. En procesos patológicos tales como enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas ocurre una desorganización del citoesqueleto que comprende la pérdida de axones y dendritas, provocando

interrupción de la conectividad sináptica [107-109]. El estrés oxidativo es una característica crítica asociada a procesos como el envejecimiento y enfermedades como cáncer, enfermedades cardíacas y neurodegenerativas. La mayoría de las patologías relacionadas con radicales libres tienen orígenes diferentes, sin embargo la vía común una vez iniciado el proceso es el daño oxidativo [101, 106]. Adicionalmente el daño por estrés oxidativo sigue una dinámica particular ya que se perpetua indefinidamente una vez iniciado, por lo que las alteraciones por radicales libres pueden llegar a ser muy severas. La melatonina es una molécula con muy baja toxicidad, sus propiedades fisicoquímicas favorecen su distribución en todos los tejidos incluyendo el Sistema Nervioso Central [106, 109-110]. Por lo anterior se ha propuesto su uso clínico para tratar condiciones asociadas con daño por radicales libres.

En conjunto los resultados del presente estudio permiten diferenciar en grupos de animales sometidos a un episodio de isquemia cerebral global aguda y tratamiento con melatonina de manera inmediata de aquellos ausentes del mismo tratamiento confirmación de manera adicional por la presencia de actividad theta con las características propias del desarrollo de procesos de aprendizaje y memoria espacial en los animales que recibieron el tratamiento neuroprotector con melatonina a diferencia de una actividad theta deficiente y alterada en los animales ausentes de tratamiento.

Cabe destacar que de acuerdo a las recomendaciones, el efecto neuroprotector se evaluó a largo plazo es decir tres meses después del episodio

de isquemia y tratamiento neuroprotector de melatonina de tal manera que el estudio se hace en un SNC que ha pasado por una patología y reorganización de estructuras y circuitos neuronales con el propósito de la recuperación de la función y por lo tanto, este restablecimiento de la función se puede atribuir a la melatonina.

Por otro lado de acuerdo a trabajos previos, como respuesta a mecanismos de reorganización de los circuitos neuronales dañados, la preservación de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, la citoarquitectura de las neuronas piramidales remanentes de la región CA1 del hipocampo mostraron características diferentes y en el presente estudio observamos la presencia de actividad theta simultánea a procesos de aprendizaje espacial sin embargo con características diferentes al grupo INTACTO.

Las neuronas piramidales remanentes de los animales tratados con melatonina mostraron una citoarquitectura diferente a los animales intactos, con dendritas menos ramificadas y una menor densidad de espinas, pero mayor proporción de espinas en forma de hongo [45].

BIBLIOGRAFIA

1. Velázquez Monroy O, Barinagarrementería Aldatz F, Rubio Guerra FA, Verdejo J, Mendez Bello MA, Violante R, et al. Morbilidad y mortalidad de la enfermedad isquémica del corazón y cerebrovascular en México. 2005. Arch Cardiol (Mex) 2007;77:31-9.
2. Sánchez Almazán N. Enfermedad cerebro vascular en México. Epidemiología y pronóstico. Rev Min Sal. 2008:1-5.
3. Cabrera Rayo A, Martínez Olazo M, Laguna Hernández G, Juárez Ocaña R, Rosas Barrientos V, Loria Castellanos J, et al. Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio Multicentrico. Med Int Mex. 2008;24:98-103.
4. Geocadin RG, Koenig MA, Jia X, Stevens RD, MA P. Management of brain injury after resuscitation from cardiac arrest. Neurol Clin. 2008;26:487-502.
5. Díez Tejedor E. Guías para el diagnóstico y tratamiento del ictus. In: Díez Tejedor E, editor. Guías oficiales de la Sociedad Española de Neurociencias N° 3. España 2006. p. 1-24.
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Estadísticas demográficas 2008. Mexico 2008; <http://www.inegi.org.mx/Sistemas/temasV2/Default.aspx?s=est&c=17484>.
7. Mehta SI, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. Brain Res Rev. 2007;54:34-66.

8. Schneider A, Bottiger BW, Popp E. Cerebral resuscitation after cardiocirculatory arrest. *Anesth Analg*. 2009;108:971-9.
9. Sarraf-Yazdi S, Laskoswitz D, Warner D. Pathophysiology of Ischemic Brain Damage. In: *Management Of Acute Stroke*. Marcel Dekker Inc 1999:243-77.
10. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*. 1985;63:29-37.
11. Díez-Tejedor E, Alonso de Leciñana M. Fisiopatología de la isquemia cerebral: el daño a la isquemia reperusión. In: Barinagarrementeria F CC, editor. *Enfermedad vascular cerebral*. México D.F. : McGraw-Hill Interamericana 1998. p. 13-27.
12. Micheli F, Nogués MA, Asconapé JJ, Fernández Pardal MM, Biller J. Vascularización Encefálica y Fisiopatología de la Isquemia Cerebral. In: Pebet M, editor. *Tratado de Neurología Clínica*. Argentina: Panamericana; 2002 p. 397-408.
13. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*. 1999;79:1431-568.
14. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*. 1991;71:1185-95.
15. Kogure K, Arai H, Abe K, Nakano M. Free radical damage of the brain following ischemia. *Prog Brain Res*. 1985;63:237-59.
16. Hossmann KA. Post-ischemic resuscitation of the brain: selective vulnerability versus global resistance. *Prog Brain Res*. 1985;63:3-17.

17. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol.* 2002;35:67-86.
18. 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:C817-33.
19. Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signaling.* 2010;14:2013-54.
20. Margail I, Plotkine M, Lerouet D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005;39:429-43.
21. Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem.* 2009;109:133-8.
22. Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke.* 2009;40:S111-4.
23. Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Petito CK, Plum F. Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann N Y Acad Sci.* 1997;835:187-93.
24. Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA. Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx.* 2004;1:36-45.
25. Muir KW, Lees KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke.* 1995;26:503-13.
26. Pulsinelli WA. The therapeutic window in ischemic brain injury. *Curr Opin Neurol.* 1995;8:3-5.

27. Wahlgren NG, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischemia: facts and fancies--the need for new approaches. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17 Suppl 1:153-66.
28. Glasstone D, Black S, Hakim A. Toward wisdom from failure. Lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. *Stroke.* 2002;33:2123-36.
29. 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.
30. 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; discussion 8-53.
31. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* 2001;426:1-10.
32. Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol.* 2006;5:19-39.
33. Omar SH, Saba N. Melatonin, receptors, mechanism, and uses. *Systematic Reviews in Pharmacy.* 2010;1:158-71.
34. Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Tan DX SB. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;2:200-15.

35. Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutrition & Metabolism*. 2005;2:22-36.
36. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler BRH. Melatonin Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*. 2006;273:2813-1838.
37. Reiter RJ, Tan DX TM, Flores LJ. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochimica Polonica*. 2007;54:1-9.
38. Tan DX, Manchester LC, Sanchez-Barcelo E, Mediavilla MD. Significance of high levels of endogenous melatonin in mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Curr Neurophar*. 2010;8:162-7.
39. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC. Melatonin defeats neutrally-derived free radicals and reduces the associated neuromorphological and neurobehavioral damage. *J Physiol Pharmacol*. 2007;58:S5-S22.
40. Letechipia-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;32:186-92.
41. Finkelstein SP, Fisher EM, AJ F. Recommendation for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*. 1999;30:2752-8.
42. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47-60.

43. Olton DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiol Behav.* 1987;40:793-7.
44. Letechipia-Vallejo G, Lopez-Loeza E, Espinoza-Gonzalez V, Gonzalez-Burgos I, Olvera-Cortes ME, Morali G, et al. Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res.* 2007;42:138-46.
45. Gonzalez-Burgos I, Letechipia-Vallejo G, Lopez-Loeza E, Morali G, Cervantes M. Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2007;423:162-6.
46. Garcia-Chavez D, Gonzalez-Burgos I, Letechipia-Vallejo G, Lopez-Loeza E, Morali G, Cervantes M. Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Lett.* 2008;448:148-52.
47. Morgado I. The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. *Rev Neurol.* 2005;40:289-97.
48. Almaguer-Melian W, Bergado-Rosado JA. Interactions between the hippocampus and the amygdala in synaptic plasticity processes. A key to understanding the relations between motivation and memory. *Rev Neurol.* 2002;35:586-93.

49. Sweatt JD. The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. Mechanisms of Memory. Huston, Texas: Elsevier, Academic Press; 2003. p. 3-27.
50. Sweatt JD. The Hippocampus Serves a Role in Multimodal Information Processing, and Memory Consolidation. Mechanisms of memory. Huston, Texas: Elsevier, Academic Press; 2003. p. 61-90.
51. Sweatt JD. Rodent Behavioral Learning and Memory Models. Mechanisms of Memory. Huston, Texas: Elsevier, Academic Press; 2003. p. 61-90.
52. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Aprendizaje y Memoria. Principios de Neurociencia. España: McGraw-Hill; 2001. p. 1227-46.
53. Etchepareborda MC, Abad-Mas L. Working memory in basic learning processes. Rev Neurol. 2005;40 Suppl 1:S79-83.
54. McDonald RJ, White NM. Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. Behav Neurosci. 1995;109:579-93.
55. O'Keefe J, L N. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press; 1978.
56. De Souza-Pagnussat A, Faccione-Heuser MC, Netto CA, M. A. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. J Anat. 2008;38:751-8.
57. Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Neurons, numbers and the hippocampal network. Prog Brain Res. 1990;83:1-11.

58. Balderas I, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. Memory-linked morphological changes. *Rev Neurol*. 2004;38:944-8.
59. Shapiro ML, Eichenbaum H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus*. 1999;9:365-84.
60. Arushanyan EB, Beier EV. The hippocampus and cognitive impairments. *Neurosci Behav Physiol*. 2008;38:751-8.
61. Rodríguez F, Urzúa A. Superior Functions in patients with Cerebrovascular accidents. *Revista Chilena de Neuropsicología*. 2009;4:20-7.
62. Staekenborg SS, Koedam EL, Henneman WJ, Stokman P, Barkhof F, Scheltens P, et al. Progression of mild cognitive impairment to dementia: contribution of cerebrovascular disease compared with medial temporal lobe atrophy. *Stroke*. 2009;40:1269-74.
63. Roine RO. Global Cerebral Ischemia. In: M. F, Bogousslavsky J, editors. *Current Review of Cerebrovascular Disease*. Michigan 1996. p. 159-74.
64. 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;37:387-92.
65. Galani R, Obis S, Coutureau E, Jarrard L, Cassel JC. 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.

66. Guevara M, Hernandez M, Sanz A. Señales electroencefalográficas (EEG). Programas computacionales para el análisis de señales bioeléctricas y evaluación cognoscitiva Zapopan, Jalisco, Mexico 2010. p. 21-8.
67. Olvera-Cortes E, Guevara MA, Gonzalez-Burgos I. Increase of the hippocampal theta activity in the Morris water maze reflects learning rather than motor activity. *Brain Res Bull.* 2004;62:379-84.
68. Voss JL, Paller KA. Brain substrates of implicit and explicit memory: the importance of concurrently acquired neural signals of both memory types. *Neuropsychologia.* 2008;46:3021-9.
69. Salas R, Hernández F. Estudio Electrofisiológico de la relación temporal entre la onda Theta y la actividad neuronal unitaria en el hipocampo de ratas. *Academ Bio Dig.* 2007;30:1-12.
70. Almaguer-Melian W, Martinez-Marti L, Frey JU, JA B. The amygdala is part of the behavioural reinforcement system modulating long-term potentiation in rat hippocampus. *Neuroscience.* 2003;119:319-22.
71. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;29.
72. Vanderwolf CH. Cerebral activity and behavior: control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int Rev Neurobiol.* 1988;30:225-340.
73. Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 1985;240:37-59.

74. Wainer BH, Levey AI, Rye DB, Mesulam MM, Mufson EJ. Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett.* 1985;54:45-52.
75. Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron.* 2002;33:325-40.
76. Vertes RP, Hoover WB, Viana Di Prisco G. Theta rhythm of the hippocampus: subcortical control and functional significance. *Behav Cogn Neurosci Rev.* 2004;3:173-200.
77. Bland BH, Oddie SD. Anatomical, electrophysiological and pharmacological studies of ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;22:259-73.
78. Olvera-Cortes E, Cervantes M, Gonzalez-Burgos I. Place-learning, but not cue-learning training, modifies the hippocampal theta rhythm in rats. *Brain Res Bull.* 2002;58:261-70.
79. Olvera-Cortes ME, Garcia-Alcantar I, Gutierrez-Guzman B, Hernandez-Perez JJ, Lopez-Vazquez MA, Cervantes M. Differential learning-related changes in theta activity during place learning in young and old rats. *Behav Brain Res.* 2012;226:555-62.
80. Pan WX, McNaughton N. The medial supramammillary nucleus, spatial learning and the frequency of hippocampal theta activity. *Brain Res.* 1997;764:101-8.
81. Pan WX, McNaughton N. The role of the medial supramammillary nucleus in the control of hippocampal theta activity and behaviour in rats. *Eur J Neurosci.* 2002;16:1797-809.

82. McNaughton N, Ruan M, Woodnorth MA. Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze. *Hippocampus*. 2006;16:1102-10.
83. Olvera-Cortes M. Estudio experimental sobre la modulación serotoninérgica del ritmo theta hipocámpal durante el curso temporal del aprendizaje espacial Guadalajara Jalisco: Universidad de Guadalajara; 2003.
84. Gutierrez-Guzman BE, Hernandez-Perez JJ, Gonzalez-Burgos I, Feria-Velasco A, Medina R, Guevara MA, et al. Hippocampal serotonin depletion facilitates place learning concurrent with an increase in CA1 high frequency theta activity expression in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2011;652:73-81.
85. Monmaur P, Thomson MA, M'Harzi M. Temporal changes in hippocampal theta activity following twenty minutes of forebrain ischemia in the chronic rat. *Brain Res*. 1986;378:262-73.
86. Monmaur P, Allix M, Schoevaert-Brossault D, Houcine O, Plotkine M, Willig F. Effects of transient cerebral ischemia on the hippocampal dentate theta (theta) profile in the acute rat: a study 4-5 months following recirculation. *Brain Res*. 1990;508:124-34.
87. Buzsaki G, Freund TF, Bayardo F, Somogyi P. Ischemia-induced changes in the electrical activity of the hippocampus. *Exp Brain Res*. 1989;78:268-78.
88. Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*. 1999;58:279-95.

89. 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.
90. Cervantes M, Morali G, Letechipia-Vallejo G. Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res.* 2008;45:1-7.
91. Macleod MR, O'Collins T, Horky LL, Howells DW, Donnan GA. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *J Pineal Res.* 2005;38:35-41.
92. Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke.* 1988;19:913-4.
93. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates China*: Elsevier, Academic Press; 2009.
94. Vinogradova OS. Expression, control, and probable functional significance of the neural theta-rhythm. *Prog Neurobiol.* 1995;45:523-83.
95. Poucet B, Save E, Lenck-Santini PP. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci.* 2000;11:95-111.
96. Navarrete F, Perez-Ortiz JM, Femenia T, Garcia-Gutierrez MS, Garcia-Paya ME, Leiva-Santana C, et al. Methods to evaluate cognitive disorders in animal models. *Rev Neurol.* 2008;47:137-45.
97. Good M. Spatial Memory and Hippocampal Function: Where are we now? *Psicológica.* 2002;23:109-38.

98. Buzsaki G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus*. 2005;15:827-40.
99. O'Keefe J, Recce ML. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus*. 1993;3:317-30.
100. Nelson A, Lebessi A, Sowinski P, Hodges H. Comparison of effects of global cerebral ischemia on spatial learning in the standard and radial water maze: relationship of hippocampal damage to performance. *Behav Brain Res*. 1997;85:93-115.
101. 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.
102. Reiter RJ, Paredes SD, Korkmaz A, Jou MJ, Tan DX. Melatonin combats molecular terrorism at the mitochondrial level. *Interdiscip Toxicol*. 2008;1:137-49.
103. Ramirez-Rodriguez G, Klempin F, Babu H, Benitez-King G, Kempermann G. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology*. 2009;34:2180-91.
104. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropharmacol*. 2010;8:194-210.
105. Massaad CA, Klann E. Reactive oxygen species in the regulation of synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14:2013-54.

106. Pandi-Perumal SR, Bahammam AS, Brown GM, Spence DW, Bharti VK, Kaur C, et al. Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes. *Neurotox Res.* 2012.
107. Benítez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006;40:1-9.
108. Maharaj DS, Glass BD, Daya S. Melatonin: new places in therapy. *Biosci Rep.* 2007;27:299-320.
109. Samantaray S, Das A, Thakore NP, Matzelle DD, Reiter RJ, Ray SK, et al. Therapeutic potential of melatonin in traumatic central nervous system injury. *J Pineal Res.* 2009;47:134-42.
110. Ortiz GG, Benitez-King GA, Rosales-Corral SA, Pacheco-Moises FP, Velazquez-Brizuela IE. Cellular and biochemical actions of melatonin which protect against free radicals: role in neurodegenerative disorders. *Curr Neuropharmacol.* 2008;6:203-14.