



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:

Evaluación histológica y funcional del hipocampo de ratas con hipoperfusión cerebral crónica (HCC) y tratamiento posterior con melatonina.

Presenta:

**Químico Farmacobiólogo
José Ulises Chijate Bazán**

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

DIRECCIÓN DE TESIS:

Doctor en Ciencias

José Miguel Cervantes Alfaro

CO- DIRECCIÓN:

Doctora en Ciencias

Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

Morelia, Michoacán, México

Agosto 2020

I

La Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT

El estudiante de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de Estudios de Posgrado
Laboratorio de Neurociencias
Recibió beca del CONACyT
durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud
Registro de becario: 702759
CVU: 889255

El presente trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica (CIC)
con número de registro: 3757721, 4624322 y 5593442 “Evaluación del aprendizaje y
memoria espacial en ratas con oclusión permanente, bilateral de las arterias carótidas
comunes (2VO) y tratamiento posterior con melatonina”.

Responsable del Proyecto: D. en C. Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

II

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Aprobó la tesis que presentó:

Químico Farmacobiólogo José Ulises Chijate Bazán

Doctora en Ciencias Especialidad en Farmacología
Marcia Yvette Gauthereau Torres

Doctora en Ciencias Químico Biológicas
Martha Eva Viveros Sandoval

Doctora en Ciencias del Comportamiento
María Esther Olvera Cortés

III

Dirección de tesis:

Doctor en Ciencias Biomédicas

José Miguel Cervantes Alfaro

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

miguelcer43@hotmail.com

Número de empleado: 94002479

Co-directora de tesis:

Doctora en Ciencias Biomédicas

Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

gletechipia@yahoo.com.mx

Número de empleado: 87002418

Colaboradores:

Doctora en Ciencias del Comportamiento

María Esther Olvera Cortés

Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS

Jefa del Servicio de Anatomía Patológica

Dra. Dalia Marín Pérez

Hospital Regional Morelia del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los

Trabajadores del Estado (ISSSTE)

IV

La presente investigación se realizó en:

Laboratorio de Neurociencias
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Laboratorio de Neurofisiología Experimental
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI)
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

Laboratorio de Anatomía Patológica
Hospital Regional Morelia del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los
Trabajadores del Estado (ISSSTE)

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas Dr Ignacio Chávez y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Mi gratitud al laboratorio de neurociencias especialmente a mis asesores al D.C. José Miguel Cervantes Alfaro y a la D.C. Graciela Letechipía Vallejo, por la dedicación y apoyo que me brindaron en este trabajo, gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a este laboratorio y hacerme sentir en casa, por esas pláticas llenas de risas y buenos momentos.

Asimismo, agradezco a mi comité tutorial por los consejos y sugerencias en este trabajo: DC. Marcia Y. Gauthereau Torres, DC. Martha Eva Viveros Sandoval, DC. María Esther Olvera Cortés

Al Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS, a la DC. María Esther Olvera Cortes por las facilidades otorgadas para el desarrollo del proyecto.

Al Servicio de Anatomía Patológica Hospital Regional Morelia del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), a la Dra. Dalia Marín Pérez, al HT. Israel Aviña Guerrero, HT. Josué Román Aviña Guerrero y a la QFB. Dalia Karen Villanueva Reyes, por todos sus consejos en las técnicas histológicas para el proyecto y por la gran amistad que me otorgaron.

A mis compañeros de generación y compañero de laboratorio Irving, por todas las altas y bajas que hubo en el laboratorio, con él fue más amena esta aventura.

Gracias a mis grandes amigos Elena y Rafa sin ellos este trabajo hubiese sido muy diferente; Rafa con esa actitud siempre tan positiva y Elena con esa paciencia que solo ella tiene.

Pero, sobre todo, gracias a mi familia, en especial a mis padres Ulises y Martha y a mi hermana Larisa, por su comprensión y solidaridad con este proyecto, por ser un ejemplo de valentía, capacidad y superación, por el tiempo que me han concedido un tiempo robado a ustedes. Sin su apoyo este proyecto nunca se habría hecho, por eso, este trabajo es también el suyo.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido es para mi novia Dalia, por ser parte de mi vida, de mis momentos tristes y alegres, por apoyarme, por nunca dejarme caer, por estar siempre ahí, siempre estarán en mi memoria los hermosos recuerdos de mi estancia en Madrid contigo. Gracias mi amor por animarme a lograr este sueño que se está haciendo realidad.

VI ABREVIATURAS

2VO: Oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes

Ach: Acetilcolina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

AMP: Adenosín monofosfato

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BHE: Barrera hematoencefálica

CA1: Cuerno de Ammon región 1

CaMKII: Calcio calmodulina cinasa II

CaM: Calmodulina

COX-2: Ciclo-oxigenasa 2

DA: Dopamina

DAG: Diacilglicerol

DVa: Demencia vascular

EA: Enfermedad de Alzheimer

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FSC: Flujo sanguíneo cerebral

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GPX: glutatión peroxidasa

HCC: Hipoperfusión cerebral crónica

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

IL-6: Interleucina-6

VII

iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible

LAM: Laberinto acuático de Morris

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LTP: Potenciación a largo plazo

MAPs: Proteínas asociadas a los microtúbulos

MB: Materia blanca

ME: Memoria explícita

MEL 1: Grupo de experimentación tratado con melatonina por 53 días 24 horas post-cirugía

MEL 2: Grupo de experimentación tratado con melatonina por 38 días a los 15 días post-cirugía

MI: Memoria implícita

MTs: Microtúbulos

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

NSQ: Núcleo supraquiasmático

PKC: Proteína cinasa C

sc: Subcutáneo

SHAM: Grupo de experimentación con simulación de 2VO

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

Sol.: Solución

VAGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEH: Grupo de experimentación sometido al modelo 2VO

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Alteraciones fisiopatológicas bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica	4
2.2. Estudios clínicos.....	6
2.3. Estudios experimentales	6
2.4. El modelo de hipoperfusión cerebral crónica como modelo de deterioro cognoscitivo y demencia	7
2.5. Características generales del modelo de HCC	8
2.6. Mecanismos de neuroplasticidad inducidos en condiciones de reducción del flujo sanguíneo cerebral.....	8
2.7. Mecanismos de daño cerebral en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica que dan por resultado alteraciones de la estructura y del funcionamiento del hipocampo	9
2.8. Aprendizaje y memoria	12
2.9. Citoesqueleto y espinas dendríticas (características y funciones)	15
2.10. Características de la melatonina en condiciones fisiológicas	17
2.11. La melatonina en la neurogénesis	22
3. Justificación	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivo general.....	25
6. Objetivos específicos.....	26
7. Material y métodos.....	26
7.1. Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica.....	27
7.2. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.....	27
7.3. Evaluación neuronal por medio de técnicas histológicas	29
7.4. Tinción de Nissl.....	29
7.5. Impregnación argéntica de Golgi.....	30
7.6. Análisis estadístico	31

8. Resultados	32
8.1. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial en ratas con hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento con melatonina	32
8.1.1. Aprendizaje espacial. Latencia de escape	32
8.1.2. Aprendizaje espacial. Longitud de trayectorias de nado	34
8.1.3. Aprendizaje espacial. Velocidad de nado	36
8.1.4. Memoria espacial. Tiempo de recorrido por los diferentes cuadrantes en la prueba de transferencia	37
8.1.5. Memoria espacial. Número de cruces por el sitio de la plataforma	39
8.2. Efecto de la melatonina sobre la pérdida de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo inducida por hipoperfusión cerebral crónica	40
8.3. Efecto de la melatonina en la arborización dendrítica de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica	43
8.4. Efecto de la melatonina en el número y forma de espinas dendríticas en neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica	45
9. Discusión	50
10. Conclusión	57
11. Referencias	58



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”



Resumen

Evaluación histológica y funcional del hipocampo de ratas con hipoperfusión cerebral crónica (HCC) y tratamiento posterior con melatonina

Introducción. La demencia, una condición que consiste en el deterioro progresivo de las funciones cognitivas, ha sido considerada como un problema prioritario de salud, puede ser causada por diversas patologías, entre las que se incluye a la reducción del flujo sanguíneo cerebral atribuible a hipoperfusión cerebral crónica (HCC). La melatonina ha sido identificada por sus múltiples mecanismos de acción que operan en contra de los procesos celulares y moleculares de daño cerebral y en favor de los procesos de plasticidad y recuperación morfológica y funcional, inducidos por la reducción o supresión del flujo sanguíneo cerebral. **Objetivo.** Evaluar los efectos de la melatonina en dos esquemas de administración sobre los procesos de recuperación funcional y morfológica del hipocampo, en condiciones experimentales de hipoperfusión cerebral crónica. **Métodos.** Se utilizaron ratas macho adultas Sprague-Dawley, de ocho meses de edad, asignadas aleatoriamente a cualquiera de los siguientes grupos experimentales: SHAM (n=7): sometidas al modelo de 2VO sin oclusión de las arterias carótidas; Vehículo (VEH) (n=6): HCC con el modelo 2VO y tratamiento con vehículo (sol. de propilenglicol al 15% y agua inyectable) a partir del día 15 después de HCC, durante 30 días; Melatonina 1 (MEL 1) (n=6): HCC con el modelo 2VO y tratamiento con melatonina, 10 mg/kg/sc a partir del primer día después de HCC, durante 53 días; Melatonina 2 (MEL 2) (n=6): HCC con el modelo 2VO y tratamiento con melatonina, 10 mg/kg/sc a partir del día 15 después de HCC, durante 38 días. Al término de los tratamientos se evaluaron: el aprendizaje y la memoria espacial (latencia de escape, longitud de trayectorias y velocidad de nado; permanencia en el cuadrante objetivo donde se ubicaba la plataforma) en el laberinto acuático de Morris, la población de neuronas y las características de la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo. **Resultados.** Se observó una reducción progresiva de la latencia de escape en los días de prueba sucesivos con diferencias significativas desde el día 3 hasta el último día de prueba, en los grupos SHAM, MEL 1 y MEL 2; en tanto que la reducción de la latencia de escape se observó a partir del día 5 de prueba en el grupo VEH. El tiempo de permanencia sobre el cuadrante objetivo, en relación al tiempo de permanencia sobre los otros cuadrantes, durante la prueba de transferencia, fue significativamente mayor en los grupos SHAM, MEL 1 y MEL 2; en cambio el grupo VEH no mostró diferencias significativas en el tiempo de permanencia en los diferentes cuadrantes. La HCC provocó una reducción significativa en de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo en el grupo VEH (32%) y MEL 1 (22%), con respecto al grupo SHAM, sin diferencias significativas entre los grupos MEL 2 y SHAM. La HCC provocó una reducción significativa de la longitud de la dendrita apical, de la densidad de espinas dendríticas y de la proporción de espinas en hongo, en el grupo VEH y MEL 1, en comparación con el grupo SHAM; sin diferencias significativas entre los grupos SHAM y MEL 2. Se observó asimismo un incremento significativo de la densidad de espinas dendríticas en el grupo MEL 2, y de la proporción de espinas anchas en el grupo VEH, con respecto al grupo SHAM. **Conclusión.** Los resultados sugieren que la melatonina protege contra el daño y promueve la recuperación de las alteraciones funcionales y morfológicas provocadas por HCC en el hipocampo.

Palabras clave: Demencia vascular, Neuroprotección, Hipocampo, Espinas dendríticas, Melatonin.



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”



Abstract

Histological and functional evaluation of the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion (CCH) and subsequent treatment with melatonin

Introduction. Dementia, a condition consisting of the progressive deterioration of cognitive functions, has been considered a priority health problem. It can be caused by various pathologies, including reduced cerebral blood flow due to chronic cerebral hypoperfusion (CCH). Melatonin has been identified by its multiple mechanisms of action that operate against the cellular and molecular processes of brain damage, and promoting the processes of plasticity and morphological and functional recovery, induced by the reduction or suppression of cerebral blood flow. **Objective.** To evaluate the effects of melatonin in two administration schedules on the processes of morphologic and functional recovery of the hippocampus, under experimental conditions of chronic cerebral hypoperfusion. **Methods.** Eight month-old male Sprague-Dawley adult rats randomly assigned to any of the following experimental groups were used: SHAM (n=7): submitted to 2VO model without carotid artery occlusion; Vehicle (VEH) (n=6): CCH with 2VO model and vehicle treatment (sol. propyleneglycol 15% and water for injection) starting on day 15 after CCH for 30 days; Melatonin 1 (MEL 1) (n=6): CCH with model 2VO and melatonin treatment, 10 mg/kg/sc starting on day 1 after CCH, for 53 days; Melatonin 2 (MEL 2) (n=6): CCH with model 2VO and melatonin treatment, 10 mg/kg/sc starting on day 15 after CCH, for 38 days. At the end of the treatments, the following were evaluated: spatial learning and memory (escape latency, trajectory length and swimming speed; permanence in the target quadrant where the platform was located) in the Morris Water Maze, neuronal population and cytoarchitecture characteristics (apical dendrite length, density and relative proportions of dendritic spine types) of the pyramidal neurons of the CA1 segment of the hippocampus. **Results.** A progressive reduction in the escape latency was observed on successive testing days, with significant differences from day 3 to the last test day in the SHAM, MEL 1 and MEL 2 groups; while a significant reduction in escape latency was observed from day 5 of the test in the VEH group. The time spent in the target quadrant as compared to the time spent in the other quadrants, during the probe trial, was significantly higher in the SHAM, MEL 1 and MEL 2 groups; by contrast, the time spent in the four quadrants was not significantly different in the VEH group. CCH caused a significant reduction in the population of pyramidal neurons of the CA1 segment of the hippocampus in VEH group (32%) and MEL 1 (22%), with respect to the SHAM group, without significant differences between MEL 2 and SHAM groups. CCH resulted in a significant reduction of apical dendrite length, dendritic spines density and relative proportion of mushroom dendritic spines in the VEH and MEL 1 groups compared to the SHAM group, with no significant difference between SHAM and MEL 2 groups. A significant increase of dendritic spines density in the MEL 2 group and the proportion of wide spines in the VEH group, compared to the SHAM group, was also observed. **Conclusion.** The results suggest that melatonin protects against damage and promotes recovery from functional and morphological alterations caused by CCH in the hippocampus.

Keywords: Vascular dementia, Neuroproteccion, Hippocampus, Dendritic Spines, Melatonin.

1. Introducción

El incremento en la esperanza de vida de la población, ha dado lugar a una mayor incidencia de enfermedades que se han relacionado con los procesos del envejecimiento, como es el caso de la demencia, la cual se caracteriza por el deterioro de las funciones cognitivas (SSA, 2018). Ante el aumento progresivo en el número de personas en proceso de envejecimiento se ha estimado que en el año 2030 la incidencia de demencia en la población mundial se prevé aumentará de 75 a 150 millones de individuos en el año 2050. De hecho, cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos de demencia, el 60% de los cuales ocurren en países con ingreso per capita medio y bajo (OMS, 2018).

Por otra parte, en 2015 el costo del tratamiento de demencia a nivel mundial se ha calculado en USD 818 000 millones, lo que equivale a más del 1% del producto interno bruto mundial. Se prevé que en el año 2030, este costo ascenderá a más del doble y alcanzará USD 2 billones, lo que podría tener importantes repercusiones sociales y económicas, especialmente en la implementación y operación de servicios de salud (OMS, 2018).

La causa más frecuente de demencia en individuos de 60 años o más es la enfermedad de Alzheimer (EA), que puede ser la causa del deterioro cognoscitivo en 60-70% de los casos; sin embargo, las patologías cerebrovasculares han sido también señaladas como causas frecuentes de demencia. Así, se ha propuesto el término deterioro cognitivo vascular para identificar diferentes expresiones de las alteraciones de las funciones cognitivas y conductuales asociadas a patologías cerebrovasculares. Estas dos patologías no son mutuamente excluyentes como agentes causales de demencia y pueden ser procesos fisiopatológicos concurrentes para el desarrollo de demencias mixtas (OMS, 2018). En cualquier caso la demencia y el deterioro cognoscitivo no deben ser considerados como parte del envejecimiento; de hecho, el deterioro cognoscitivo se ha identificado como una de las principales causas de discapacidad, dependencia y mala calidad de vida durante el envejecimiento (SSA, 2018).

La hipoperfusión cerebral crónica (HCC) es la reducción crónica del flujo sanguíneo cerebral (FSC), y forma parte de las enfermedades cerebrovasculares. La HCC puede inducir alteraciones estructurales y funcionales de las regiones cerebrales involucradas en las funciones

cognoscitivas, llevando a estados de demencia, especialmente en el curso del envejecimiento (Gorelick et al., 2011).

El conocimiento de los mecanismos de daño y recuperación morfológica y funcional a diversos niveles de organización biológica en el sistema nervioso central (SNC), ante la supresión aguda focal o global del FSC o en el curso de HCC crónica, ha permitido identificar posibles estrategias de neuroprotección. Éstas incluyen acciones farmacológicas en oposición a los mecanismos de daño y a favor de los procesos de recuperación funcional en estructuras cerebrales específicas, entre las que destaca el hipocampo por su gran vulnerabilidad ante la reducción o supresión del FSC, estructura cerebral involucrada en la integración y expresión de las funciones cognoscitivas (Farkas, Luiten, & Bari, 2007).

A este respecto, se han desarrollado diversos enfoques terapéuticos que inciden en la prevención, tratamiento y modificación del curso temporal del deterioro cognoscitivo, que caracteriza a las demencias, con repercusiones importantes sobre la calidad de vida y la atención a la salud de los individuos afectados por esta patología, durante el proceso del envejecimiento (Livingston et al., 2017).

En este sentido se han orientado los estudios tendientes a la caracterización de los efectos neuroprotectores de diversos compuestos químicos. Tal es el caso de la melatonina, un compuesto endógeno, secretado principalmente en condiciones fisiológicas por la glándula pineal como parte de los procesos neuroendócrinos asociados al ritmo circádico de los ciclos de luz/obscuridad y sueño/vigilia en mamíferos (Guerrero, Carrillo-Vico, & Lardone, 2007). Los efectos neuroprotectores de la melatonina, así como sus mecanismos de acción, han sido descritos en múltiples estudios efectuados en modelos experimentales de isquemia cerebral global o focal (Cheung, 2003; Singhanat, Apaijai, Chattipakorn, & Chattipakorn, 2018).

En el presente estudio se analizaron los efectos neuroprotectores de la melatonina en dos esquemas de administración crónica vía subcutánea, sobre la estructura y función del hipocampo en ratas que fueron sometidas a un modelo experimental de simulación de HCC mediante el modelo de oclusión bilateral de las arterias carótidas (2VO) provocando una

reducción del flujo sanguíneo cerebral, induciendo así un daño neuronal (Pulsinelli, Jacewicz, Levy, Petito, & Plum, 1997).

2. Antecedentes

2.1. Alteraciones fisiopatológicas bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica

El encéfalo humano constituye sólo del 2 al 3 % de la masa corporal total, el suministro de oxígeno y glucosa que se requiere para satisfacer sus demandas metabólicas corresponde al 20% y 25 %, respectivamente, de la demanda total del organismo. Dado que el encéfalo no cuenta con reservas de glucosa, es dependiente solamente del aporte continuo de esta sustancia energética y de oxígeno, por lo que una reducción en el flujo sanguíneo cerebral (FSC) podría alterar la función neuronal y ocasionar daño cerebral (Pebet, 2002).

La reducción del FSC causado por hipoperfusión cerebral crónica (HCC) se asocia a varias afecciones cerebrovasculares, que incluyen malformaciones arteriovenosas cerebrales, arteriosclerosis, oclusión carotidea y enfermedades de los pequeños vasos cerebrales. Las alteraciones vasculares que causan el deterioro cognoscitivo son variadas. Los cambios que ocurren en la estructura y funcionamiento de la unidad neurovascular ponen en riesgo la función cerebral causada por las alteraciones del flujo sanguíneo (Jellinger, 2013).

La demencia vascular es causada por un grupo heterogéneo de trastornos cerebrales en los que el deterioro cognitivo es atribuible a patologías cerebrovasculares, es responsable de al menos el 20% de los casos de demencia, siendo el segundo después de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Iadecola, 2013).

La demencia es uno de los problemas de salud más incapacitantes, afecta la calidad de vida del individuo y de sus cuidadores. Debido al alto consumo de energía del SNC, las patologías cerebrovasculares intervienen de manera fundamental en el deterioro cognitivo. Los pacientes con demencia vascular (DVa) comúnmente muestran pérdida de la memoria, fallas en la atención y afectación en pruebas de ejecución, tales como pensamiento ralentizado, desorientación, reducción en habilidades de planeación, razonamiento, juicio e incapacidad en la solución de problemas. Adicionalmente, los pacientes con DVa, tienen dificultades en el desarrollo de actividades de la vida diaria (Sun, 2018).

La DVa es una consecuencia de la reducción del flujo sanguíneo al cerebro, lo que dará origen a una patogénesis inducida por la hipoperfusión. La reducción en el suministro de oxígeno y

nutrientes altera el funcionamiento en la sinapsis y mitocondrias, lo que agrava el daño neuronal. Además, las enfermedades cerebrovasculares y la hipoperfusión conllevan al daño de la barrera hematoencefálica (BHE), incluyendo la zona del hipocampo. La BHE protege al cerebro del ingreso de moléculas de la circulación periférica y su disfunción forma parte de la patogenia de la DVa. Por lo anterior, una estrategia terapéutica para la DVa, requiere el restablecimiento de la BHE (Sun, 2018).

La interrupción parcial o total del aporte sanguíneo al cerebro puede reducir el soporte metabólico que provee de energía e impedir la eliminación de productos de desecho a las células nerviosas, lo cual provoca varias alteraciones para el correcto funcionamiento neuronal, como lo es la disminución de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) y posteriormente alteraciones en los gradientes iónicos transmembranales. Los canales iónicos de la membrana celular (principalmente de Na^+ y K^+) y de los organelos celulares que dependen de ATP, pierden la capacidad de mantener la homeostasis iónica, lo que genera la entrada descontrolada a la célula de Ca^{2+} , Na^+ y agua y la salida de K^+ al medio extracelular (desequilibrio iónico) (Pebet, 2002). Como consecuencia, se pierde el equilibrio y la regulación en el potencial de membrana, lo que contribuye el ingreso adicional de Ca^{2+} , produciendo despolarización permanente y poniendo en marcha una cascada de eventos que pueden conducir a la muerte celular. Por lo anterior, el ingreso excesivo y no regulado de Ca^{2+} al interior de las células a través de los canales iónicos operados por voltaje y por la activación anormal de receptores glutamatérgicos, debida a la liberación excesiva de glutamato (excitotoxicidad), puede desencadenar procesos celulares desregulados que promueven alteraciones mitocondriales, en el transporte membranar y en la síntesis de proteínas; así como activación directa de lipasas, proteasas y endonucleasas dependientes de Ca^{2+} (Lipton, 1999). Como consecuencia, puede haber una sobreproducción de radicales libres, daño a las mitocondrias, lipoperoxidación de las membranas celulares, daño a macromoléculas y al citoesqueleto, activación de citocinas proinflamatorias e inducción de la liberación de aminas biógenas (noradrenalina, serotonina), que por su acción vasoconstrictora reducen aún más el FSC. Por lo tanto, la activación de cascadas de señalización proapoptóticas mantienen condiciones que pueden dar lugar a daño

estructural, funcional y muerte neuronal (Sugawara et al., 2004). El orden de vulnerabilidad neuronal a éste daño, en orden decreciente, comienza con las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, las células de Purkinje del cerebelo, neuronas espinosas pequeñas y medianas del cuerpo estriado y las neuronas piramidales de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral (Lipton, 1999; Pebet, 2002; Pulsinelli, 1985; Pulsinelli et al., 1997).

2.2. Estudios clínicos

El término hipoperfusión hace referencia a condiciones de "flujo sanguíneo inadecuado", "defectos de perfusión" o "disfunción de la autorregulación". Este fenómeno puede afectar todo el cerebro o estructuras cerebrales antes mencionadas. Se cree que algunos trastornos clínicos definidos, que incluyen insuficiencia cardíaca, hipotensión, aterosclerosis de vasos grandes o pequeños y estenosis carotídea, causan trastornos cerebrales progresivos debido a hipoperfusión crónica. Se ha sugerido que esta condición puede ser una causa importante de demencia en pacientes con enfermedades cerebro vasculares en las que la oclusión progresiva de los vasos sanguíneos que proveen de irrigación al cerebro, da lugar a diversas alteraciones y finalmente al deterioro y la pérdida de las funciones y capacidades cognitivas (Iadecola, Hachinski, & Rosenberg, 2010).

Dada la importancia de la patología vascular en el deterioro cognitivo, los factores de riesgo vasculares se destacan por su implicación en la DVA. Los factores de riesgo modificables son la obesidad, hipertensión, tabaquismo y diabetes mellitus, los cuales representan el 25% de la demencia en la población. Notablemente la obesidad e hipertensión son los dos factores que se destacan como los más perjudiciales para la salud cerebral cuando se presentan en la edad mediana del paciente (Wolters & Ikram, 2019).

2.3. Estudios experimentales

La aproximación a las características del daño cerebral y las alteraciones de las funciones cognitivas atribuibles a HCC, como podría presentarse en seres humanos, ha sido realizado

mediante modelos de dicha patología en animales de experimentación (Sarti, Pantoni, Bartolini, & Inzitari, 2002). De esta manera, la oclusión permanente o la sección bilateral, simultánea o secuencial, de las arterias carótidas comunes (2VO), en ratas, dejando el suministro de sangre al cerebro dependiente solamente de las arterias vertebrales y su redistribución a partir del polígono de Willis, ha sido considerado como un modelo adecuado de HCC (Cechetti et al., 2012; Farkas et al., 2007).

El modelo 2VO en ratas se ha utilizado ampliamente, el cual causa una reducción del FSC de aproximadamente 35 a 45% en áreas corticales y del 60% en el hipocampo (Bink, Ritz, Aronica, van der Weerd, & Daemen, 2013; Cechetti et al., 2012), además, se ha mostrado que la HCC provoca la muerte de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, las cuales son parte fundamental del circuito trisináptico, donde se realiza la adquisición y procesamiento de la información involucrada en los procesos de aprendizaje y memoria (Farkas et al., 2007; Ohta, Nishikawa, Kimura, Anayama, & Miyamoto, 1997; Otori et al., 2003).

2.4. El modelo de hipoperfusión cerebral crónica como modelo de deterioro cognoscitivo y demencia

La oclusión permanente de las arterias carótidas comunes en ratas (2VO) es un modelo experimental ampliamente aceptado como un procedimiento adecuado para simular HCC, como ocurre en el envejecimiento humano y estadios de demencia (Farkas et al., 2007). La hipoperfusión mantiene un estado crónico de hipoxia e hipoglucemia moderada, una condición fisiopatológica muy parecida a la HCC presente en el envejecimiento humano y demencia. La cercanía de igualar una condición patológica en modelos animales es una adecuada aproximación para dilucidar las relaciones causales y los datos experimentales con enfermedades humanas. Por esta razón, el modelo de 2VO en ratas se ha establecido como un procedimiento para investigar los efectos de la HCC sobre la disfunción cognitiva y procesos neurodegenerativos (Farkas et al., 2007; Otori et al., 2003).

El modelo de 2VO ha sido caracterizado por diversos autores, quienes han descrito la magnitud de la pérdida de las neuronas piramidales en CA1 en función del transcurso del tiempo, a partir del inicio de la isquemia (Cechetti, Worm, Pereira, Siqueira, & Netto, 2010). En estas condiciones se observó que la pérdida neuronal en CA1 se incrementa progresivamente, de tal manera que en el término de 3 meses la población neuronal de CA1 se ha reducido al menos en un 30% (Ni, Ohta, Matsumoto, & Watanabe, 1994). Ésta pérdida neuronal va acompañada por un incremento notable en la activación de las células gliales (Cechetti et al., 2010; Farkas et al., 2007; Ohta et al., 1997). La lesión se debe fundamentalmente a fenómenos proapoptóticos, estrés oxidativo y fenómenos proinflamatorios originados por la activación glial como consecuencia de la HCC (Cechetti et al., 2012).

2.5. Características generales del modelo de HCC

El modelo de HCC se realiza bajo anestesia general y condiciones asépticas. Se localiza la vaina carotidea de la arteria carótida común izquierda, a través de una incisión en la piel, en la línea media del cuello, proximal al esternón y mediante disección roma del tejido celular subcutáneo y fibras musculares; la arteria carótida común izquierda se separa cuidadosamente del nervio vago para colocar una doble ligadura antes de la bifurcación que da origen a las arterias carótidas interna y externa; en estas condiciones se hace el corte de la arteria carótida común entre las ligaduras. Siete días después se realiza el mismo procedimiento en la arteria carótida común derecha (Azzubaidi, Saxena, Talib, Ahmed, & Dogarai, 2012; Cechetti et al., 2010; Farkas et al., 2007).

2.6. Mecanismos de neuroplasticidad inducidos en condiciones de reducción del flujo sanguíneo cerebral

La HCC es un tipo de isquemia cerebral que reduce gradualmente el FSC. En edades avanzadas el daño cerebrovascular causado por la reducción del FSC es mayor en áreas importantes del cerebro, incluida la materia blanca (Ghasemi et al., 2020). Los diferentes fenómenos celulares inducidos por HCC que dan lugar a daño cerebral o de recuperación ya mencionados, pueden

ocurrir en forma secuencial o de manera simultánea. Sus latencias y curso temporal pueden ir desde minutos hasta semanas y son referencias importantes para establecer su relevancia en los periodos críticos para el daño y muerte neuronal; lo mismo que para establecer las “ventanas de oportunidad terapéutica” para procedimientos neuroprotectores específicos (Lipton, 1999; Pulsinelli et al., 1997).

La prevención y el tratamiento en las primeras etapas de una lesión cerebral son deseables. Sin embargo, la escasez actual de métodos para la prevención, detección y tratamiento fuera de esta ventana de oportunidad va agravando las lesiones cerebrales. La rehabilitación es un enfoque empírico que tiene como objetivo mejorar la función cerebral mediante la estimulación de la plasticidad posterior a la lesión, aunque los mecanismos precisos por los cuales esta rehabilitación funciona no están claros (Sizonenko, Bednarek, & Gressens, 2007).

La neuroprotección se define como cualquier estrategia, o una combinación de estrategias, que antagonizan, interrumpen o retrasan la secuencia de eventos bioquímicos y moleculares perjudiciales que, si no se controlan, podría conducir a una lesión isquémica irreversible (Ginsberg, 2009; Leker & Shohami, 2002). Así, los procedimientos de neuroprotección se sustentan en la relación de oposición entre los mecanismos fisiopatológicos de daño celular y el mecanismo de acción del fármaco neuroprotector (Ginsberg, 2009; Wiendl et al., 2015).

2.7. Mecanismos de daño cerebral en condiciones de hipoperfusión cerebral crónica que dan por resultado alteraciones de la estructura y del funcionamiento del hipocampo

Uno de los principales mecanismos de daño causado por la HCC es el estrés oxidativo, generado por un desbalance entre los agentes oxidantes y los antioxidantes en el organismo, resultando en daño al endotelio vascular, daño a la glía y neuronas, lo que lleva a un desacoplamiento neurovascular y una reducción adicional del FSC. El exceso de especies reactivas de oxígeno (ERO) altera la función mitocondrial y promueve el estrés oxidativo. Los radicales libres tienen efectos tóxicos ocasionando daño a los componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos, ADN y ARN. La hipoxia cerebral puede llevar a un aumento de factores vasculares inflamatorios, así como desencadenar disfunción endotelial vascular y aumento de la permeabilidad en la

BHE. Además, algunas especies reactivas actúan como mensajeros en vías de señalización, y alteran las vías normales de la célula, lo que podría conducir a la muerte celular como apoptosis o necrosis. Los radicales libres incluyendo superóxido, hidroxilo y peroxinitrito también son mediadores importantes de daño inflamatorio al tejido cerebral, de la activación y secreción de citocinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina-1 e interleucina-6 (IL-6); así como la expresión y activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) (Ghasemi et al., 2020).

Otro daño causado por la HCC es la lesión a la materia blanca (MB) y pérdida neuronal por neuroinflamación. Las áreas cerebrales más estudiadas son el cuerpo calloso y el hipocampo, lo cual conduce a una disfunción en el aprendizaje y la memoria. En la neuroinflamación las células inmunes que se activan son la microglía y los astrocitos, los cuales regulan las citosinas, quimiocinas, vías inflamatorias y mediadores inflamatorios desempeñando papeles vitales en la fisiopatología de la HCC (Du et al., 2017).

Los sistemas de neurotransmisión son fundamentales para el SNC, contribuyen a una función normal del cerebro. Los neurotransmisores son esenciales para el procesamiento de la información, lo que indica que la modificación de los sistemas de neurotransmisión podría conducir a una disfunción cognitiva. Varios estudios han detectado la disminución de múltiples neurotransmisores por el modelo de HCC, como la acetilcolina (ACh), la dopamina (DA), el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato. La expresión y función de los receptores de neurotransmisores es también afectada por la HCC, la reducción en estos receptores es consecuencia importante de neurodegeneración (Du et al., 2017).

La reducción del FSC, causa una falla energética, reflejada por cambios en los metabolitos energéticos, adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), fosfocreatina y adenosina. La disminución de energía se debe principalmente a la alteración en las mitocondrias las cuales son vulnerables a una reducción del FSC y son encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. También participan en la regulación del estado redox intracelular y el almacenamiento del ion Ca^{2+} , así como en la activación de la apoptosis celular y las vías de señalización citoplasmática (Du et al., 2017).

Los factores de crecimiento son sustancias que promueven el crecimiento, proliferación y diferenciación. Entre todo ellos se encuentra el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) que es secretado en el cerebro y se distribuye en el SNC, especialmente en el hipocampo y la corteza. El BDNF actúa como respuesta protectora endógena a la lesión por HCC, donde se ha observado que a las 6 h después de la oclusión de dos vasos 2VO, el ARNm así como la proteína de BDNF aumenta en el hipocampo. Algunos otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VAGF) también cambiaron por la HCC, otorgando diferentes efectos neuroprotectores (Du et al., 2017).

El hipocampo es una estructura subcortical bilateral involucrada en la formación, organización y recuperación de la memoria. Anatómicamente la formación hipocampal está organizada por cuerno de Ammon (hipocampo propio) y el giro dentado el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal. El cuerno de Ammon se subdivide en las regiones CA1, CA2, CA3 e hillus (Graves et al., 2012). En la región CA1 del hipocampo el principal tipo de célula es la neurona piramidal excitatoria. Estas neuronas integran la información espacial, contextual y emocional que transmiten del hipocampo hacia otras regiones del cerebro. Las células piramidales de las regiones CA1 y del subículo realizan estas funciones disparando potenciales de acción de manera individual o en cúmulos de alta frecuencia. Estos patrones son funcionalmente distintos, ya que los potenciales en cúmulos pueden tener como objetivo incrementar la seguridad de la comunicación sináptica aumentando la probabilidad de evocar un potencial de acción post sináptico y además en la inducción de la plasticidad (Graves et al., 2012; Wible, 2013). Una particularidad de las neuronas excitatorias en comparación con las neuronas inhibitorias son sus características morfológicas, siendo la más prominente la presencia de espinas dendríticas en las neuronas excitatorias, mientras que muy pocas neuronas inhibitorias las poseen (Scheuss & Bonhoeffer, 2014).

Debido a que las alteraciones cognoscitivas son centrales en casos de demencia, existen diferentes pruebas funcionales disponibles para evaluar el daño ocasionado en ratas con 2VO. Se ha reportado un aumento en la tasa de error en el laberinto radial de 8 brazos, sugiriendo

una reducción en el proceso de aprendizaje; así como déficits y latencias prolongadas en el laberinto acuático de Morris (LAM); desempeño pobre en el laberinto elevado en T, laberinto en Y y en la prueba de reconocimiento de objetos (Venkat, Chopp, & Chen, 2015).

El papel del hipocampo en la memoria relacional (declarativa) consiste en unir múltiples entradas para crear y permitir el almacenamiento de representaciones de las asociaciones entre los elementos constitutivos de escenas y eventos. Una mala activación del hipocampo podría afectar las regiones corticales perceptuales; especialmente aquellas que muestran una gran conectividad funcional dentro del sistema hipocampal (Farkas et al., 2007; Pulsinelli, 1985).

La lesión de dichas estructuras cerebrales en condiciones de HCC se debe fundamentalmente a fenómenos proapoptóticos, estrés oxidativo y fenómenos proinflamatorios originados por la activación glial como consecuencia de la HCC (Cechetti et al., 2012).

La participación del hipocampo en la memoria está relacionada con el funcionamiento del circuito trisináptico por el que crea y permite el almacenamiento de representaciones de escenarios y eventos que el individuo ha experimentado. Este procesamiento inicial de la información permitirá el almacenamiento ulterior de memoria a largo plazo distribuida en diversas regiones corticales. Una activación aberrante del hipocampo podría afectar las regiones corticales perceptuales; especialmente aquellas que muestran una gran conectividad funcional dentro del sistema hipocampal (Wible, 2013).

2.8. Aprendizaje y memoria

La memoria y el aprendizaje son capacidades que tienen los seres vivos y son el medio principal para adaptarse al ambiente que los rodea y a sus modificaciones (Almaguer-Melian & Bergado-Rosado, 2002; Morgado, 2005). Los individuos nacen sin conocimientos sobre su ambiente y es a través de la experiencia que adquieren la información necesaria para modificar su conducta y procurar su sobrevivencia. El aprendizaje, o la obtención de nueva información del medio, y la memoria, o en conjunto los procesos de codificación, almacenamiento y recuperación de la

información adquirida son la base de la adaptabilidad funcional de la conducta (Kandel, Schwartz, Jessell, Agud, & Hernando Saudan, 2001).

El aprendizaje es el proceso complejo por el cual se obtienen nuevos conocimientos acerca del mundo que nos rodea. Su importancia radica en que estos sucesos moldean en gran parte la conducta (Sweatt, 2003), de esta manera las experiencias producen cambios en el SNC, que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos (Morgado, 2005)

Hay formas de aprendizaje que requieren del uso de los sentidos y de una eficiente codificación para cada tipo de estímulo, lo cual depende de estructuras cerebrales diferentes e interconectadas (Kandel et al., 2001). Por ejemplo la capacidad de integrar un conjunto de elementos en un contexto depende del hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala (Maren, Phan, & Liberzon, 2013; Rudy, 2009).

La memoria es el proceso a través del cual la información aprendida es integrada, almacenada y posteriormente recuperada (Kandel et al., 2001). La memoria se ha clasificado en explícita (ME) o declarativa e implícita (MI) o no declarativa. La primera se refiere a la memoria de tipo episódica (fig. 1), que es la capacidad de recordar los acontecimientos de la experiencia personal o eventos, y la memoria de tipo semántica, que consiste en recuperar conocimientos objetivos o hechos. La memoria no declarativa por otra parte, abarca los procesos mentales que no requieren de un proceso de recuperación voluntario, como las habilidades motoras, la percepción, y las emociones (Kandel et al., 2001).

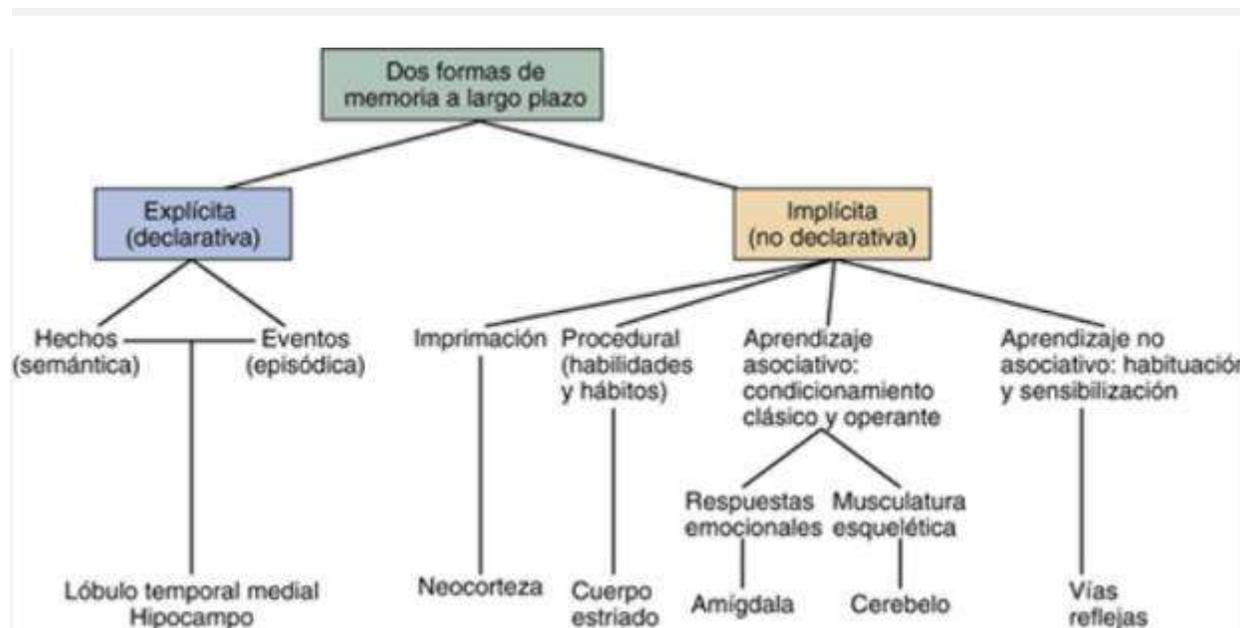


Figura 1. Clasificación de tipos de memoria. Se ha elaborado una clasificación de los tipos de memoria, adquiridos de la práctica clínica y la experimentación animal. Tomado de principios de neurociencia (Kandel et al., 2001).

El funcionamiento adecuado del circuito hipocampal es crucial en la memoria de tipo explícita y está particularmente involucrado en resolver tareas que comprenden relaciones espaciales, como la separación de patrones: la capacidad de eliminar la redundancia de eventos o contextos similares de forma que puedan ser diferenciados (Aimone, Deng, & Gage, 2011; Cameron & Glover, 2015; Maren et al., 2013; Whissell et al., 2013). La separación de patrones involucra además la capacidad de los individuos de recordar elementos clave de un ambiente como la presencia de estímulos aversivos, así entonces el hipocampo es también fundamental para recordar contextos (Koehl & Abrous, 2011; Maren et al., 2013).

Para el estudio del aprendizaje y la memoria de tipo declarativa se pueden utilizar diferentes pruebas, como el Laberinto Acuático de Morris (LAM), hay una amplia evidencia de su validez como una medida de la navegación espacial dependiente del hipocampo y la memoria, es específico para la evaluación del aprendizaje. El rendimiento del LAM se ha relacionado con la potenciación a largo plazo (LTP) y la función del receptor ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) por lo que es una técnica clave en la investigación de los circuitos del hipocampo. Y es así que el

control de evaluación en el aprendizaje en esta prueba será medir la reducción del tiempo que el animal tarda en encontrar la plataforma (Vorhees & Williams, 2006).

Investigaciones de la última década adjudican al nacimiento de nuevas neuronas o neurogénesis en el giro dentado del hipocampo un papel preponderante tanto en la separación de patrones, como en la memoria aversiva contextual (Koehl & Abrous, 2011).

2.9. Citoesqueleto y espinas dendríticas (características y funciones)

La neuroplasticidad es un proceso mediante el cual las neuronas forman redes complejas, que incluye la formación de nuevas neuronas (neurogénesis), su diferenciación (axogénesis y dendritogénesis) y el establecimiento de una conectividad adecuada en los circuitos neuronales (sinaptogénesis) permitiendo la supervivencia y la buena adaptación del organismo al medio ambiente (Valdes-Tovar et al., 2018).

La plasticidad neuronal es dependiente de la actividad y función sináptica la cual desempeña un papel esencial en las funciones cognitivas, incluido el aprendizaje y la memoria (Borovac, Bosch, & Okamoto, 2018). En una neurona, el citoesqueleto es una estructura muy dinámica que responde y se adapta rápidamente a diferentes señales intrínsecas y extrínsecas (Hu, An, & Chen, 2015).

La organización estructural del citoesqueleto regula funciones celulares primordiales como son la morfología celular, división celular, exocitosis, endocitosis, adhesión celular, movimiento citoplasmático, polaridad celular, locomoción, movimiento de organelos, etc. (Benitez-King, 2000). El citoesqueleto se compone por diferentes proteínas estructurales en las que se incluyen la actina, tubulina y proteínas asociadas. En el sistema nervioso, las fuerzas generadas por la dinámica de los microtúbulos son cruciales para la guía y el alargamiento de los axones (Hu et al., 2015). Los microtúbulos (MTs) son polímeros del citoesqueleto compuestos de subunidades repetidas de tubulina. Son estructuras dinámicas que se polimerizan y despolimerizan en uno de sus extremos. La dinámica de los microtúbulos es particularmente importante en las neuronas, células con una morfología polarizada y un citoesqueleto en constante cambio en respuesta a estímulos y regulado por una amplia variedad de proteínas

asociadas a los microtúbulos (MAPs). Este proceso dinámico en las dendritas es parte de los mecanismos que influyen en el aprendizaje y memoria además se alteran en enfermedades neurodegenerativas (Fiala, Spacek, & Harris, 2002). En el axón de la neurona la zona positiva de los microtúbulos está orientada hacia el extremo lejano del soma celular mientras que en las dendritas los MTs son de polaridad mixta con extremos positivos y negativos dirigidos hacia el soma. La neurona es particularmente abundante en MAPs que estabilizan y mantienen unidos a los MTs. La importancia de esta organización favorece la estabilidad estructural necesaria en el funcionamiento celular así como el tráfico constante de moléculas a través de dendritas y axón. Las neuronas responden a estímulos y la dinámica de los MTs es un factor importante en la plasticidad neuronal. La plasticidad es especialmente importante para las neuronas en el mantenimiento de su polaridad. Una zona neuronal característica de cambios plásticos es la sinapsis, la unión entre el botón presináptico y la espina dendrítica posináptica. Los cambios morfológicos y moleculares en la sinapsis, sustentan directamente funciones como el aprendizaje y la memoria. Se sabe que los microtúbulos participan en la definición de la estructura de los circuitos neuronales que constituyen los axones y las dendritas y que, además, participan en el fenómeno de la plasticidad neuronal favoreciendo las conexiones interneuronales. Los MTs constituyen un sistema de rieles sobre los cuáles se transportan las vesículas desde el soma de la neuronas hasta las terminales sinápticas o viceversa (transporte anterógrado y retrógrado) (Benitez-King, 2000). En el sistema nervioso, las fuerzas generadas por la dinámica de los MTs son cruciales para la guía y el alargamiento de los axones (Hu et al., 2015).

Los filamentos intermedios, que son otros componentes del citoesqueleto, participan como soporte de otros organelos celulares, y determinan el calibre de los axones (Benitez-King, 2000).

La actina es la proteína más abundante, encontrándose en tres isoformas actina α , β y γ (Dominguez & Holmes, 2011). Un filamento de actina es ensamblado por numerosos monómeros de actina a través de interacciones no covalentes. Se somete a una polimerización y despolimerización dinámica y controlada para lograr que las organizaciones apropiadas se

adapten a las tensiones mecánicas (Hu et al., 2015). El citoesqueleto de actina postsináptico no es una estructura estática sino altamente dinámica. Esta dinámica de los filamentos de actina a través de la interacción con varias proteínas de unión a actina y mensajeros de señalización postsinápticos propician la formación, el mantenimiento y la modulación de las espinas dendríticas (Borovac et al., 2018). Los filamentos de actina se enriquecen en los terminales pre y postsinápticos, controlando la sinaptogénesis dinámica, regulando la plasticidad de las espinas y ajustando la actividad sináptica (Hu et al., 2015).

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias que reciben entradas sinápticas excitadoras y compartimentan las respuestas postsinápticas, fueron descritas por primera vez por Ramón y Cajal hace más de cien años y se ha pensado que proporcionan una base morfológica para la plasticidad sináptica y juegan un papel importante en el aprendizaje y la memoria (Hering & Sheng, 2001; Korobova & Svitkina, 2010). Las espinas dendríticas juegan un papel clave en el funcionamiento apropiado del cerebro y alteraciones en la plasticidad de las espinas se asocia a enfermedades y neurodegeneración (Dent, 2017). En consecuencia, la densidad de espinas dendríticas indica directamente el número de entradas sinápticas excitadoras en una neurona en particular. Las espinas dendríticas son en gran parte heterogéneas en tamaño y forma. La morfología de las espinas dendríticas se puede clasificar generalmente en tres clases: la espina gorda, que carece de un cuello aparente; la espina delgada, que contiene una pequeña cabeza bulbosa y un cuello delgado y largo; y en forma de hongo que contiene una cabeza grande en forma de hongo. Además, hay protuberancias dendríticas alargadas llamadas filopodios y no poseen cabezas distintivas. Se cree que la propiedad funcional de las espinas dendríticas está altamente correlacionada con su morfología (Lai & Ip, 2013).

2.10. Características de la melatonina en condiciones fisiológicas

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es una hormona sintetizada y secretada durante la fase de oscuridad del día. La función principal de la melatonina secretada por la glándula pineal es transmitir la información de los ciclos diarios de luz y oscuridad al organismo.

Mediante su patrón de secreción durante la oscuridad, la melatonina indica la duración de la noche. Esta información es útil para la organización de las funciones que responden a cambios en fotoperiodo tales como ritmos circadianos o estacionales (Cardinali & Pevet, 1998).

La melatonina participa en una amplia variedad de funciones como: la regulación circádica y estacional, regulación del sueño, regulación del sistema inmune, inhibición del crecimiento tumoral, regulación de la presión arterial y captura de radicales libres. La melatonina presenta un perfil rítmico de producción proporcional a la edad y la hora del día, con valores mínimos diurnos y máximos nocturnos (fig. 2). Este perfil presenta también una constante disminución a lo largo de la vida, su producción rítmica comienza desde los tres meses de edad y aumenta gradualmente hasta alcanzar concentraciones máximas a los ocho y los diez años y disminuyendo en la pubertad (Guerrero et al., 2007).

La secreción de melatonina disminuye gradualmente a lo largo de la vida y esta disminución se puede manifestar con una menor eficacia del sueño en el anciano. La deficiencia de melatonina puede afectar la protección antioxidante durante el envejecimiento así como agravar o favorecer el desarrollo de otras enfermedades relacionadas con la edad (Karasek, 2004).

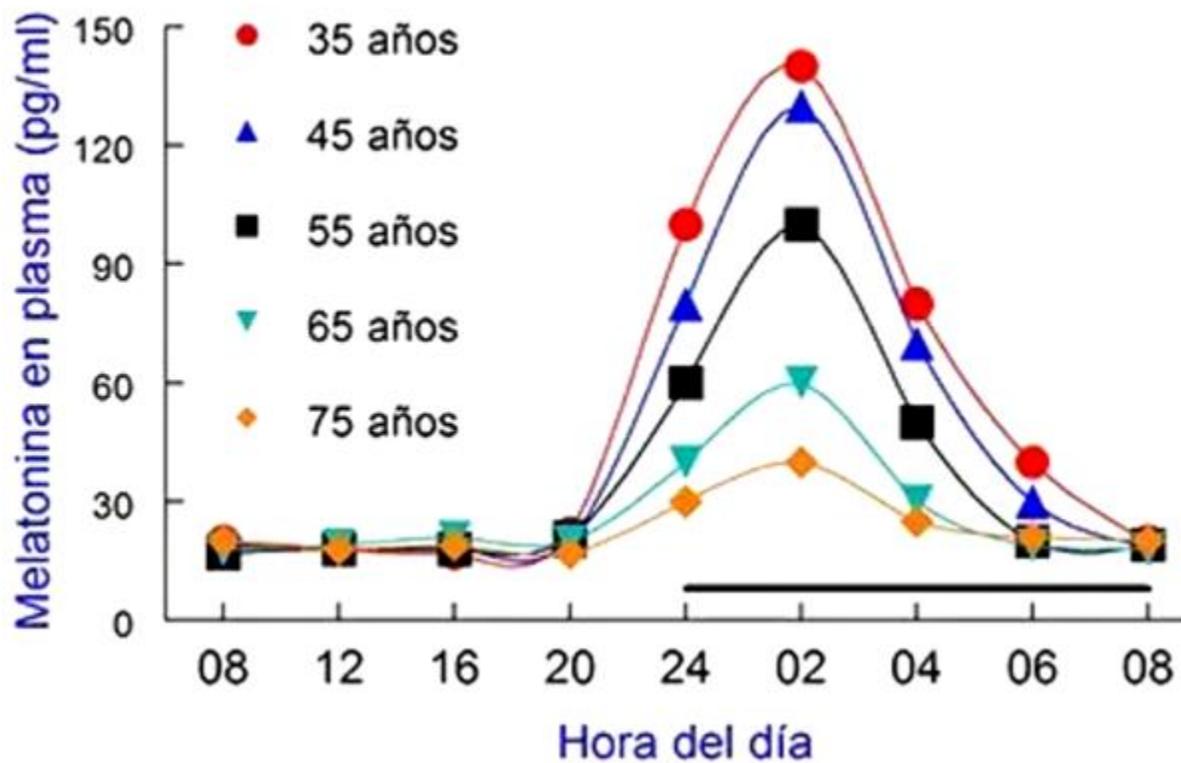


Figura 2. Cambios en la amplitud del ritmo circadiano de melatonina respecto a la edad y hora del día. Entre 45-55 años desciende un 40%, y a los 65 años el pico ha descendido un 80%, lo que hace que se pierda la señal cronobiótica de la melatonina (Escames & Acuña-Castroviejo, 2009).

La melatonina se sintetiza a partir de la serotonina a través de dos reacciones catalizadas por enzimas (fig. 3). Una vez formada, difunde hacia los capilares sanguíneos y líquido cefalorraquídeo (LCR), llegando en primer lugar al tercer ventrículo seguido de los ventrículos laterales. De hecho, la concentración de melatonina en el LCR es 5 a 10 veces mayor que la concentración sanguínea, medida de manera simultánea (Tricoire, Locatelli, Chemineau, & Malpoux, 2002).

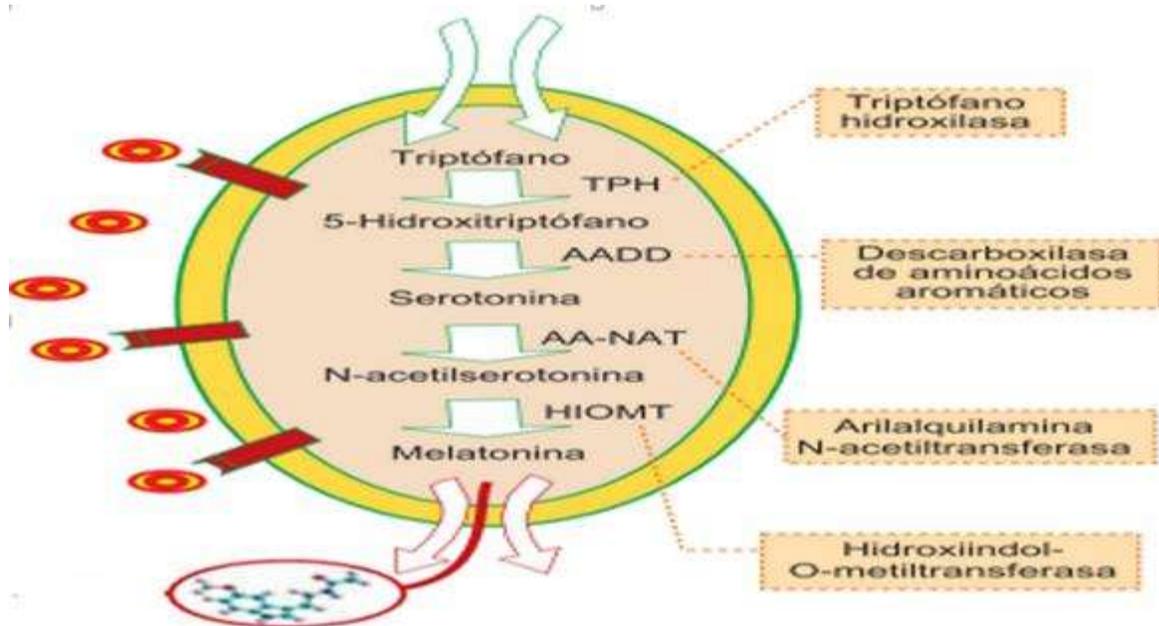


Figura 3. Síntesis de melatonina (Guerrero et al., 2007).

La melatonina, es una molécula anfipática, propiedad que le permite atravesar las membranas celulares con facilidad y puede concentrarse dentro de organelos subcelulares incluyendo la mitocondria (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993), por esta propiedad la melatonina y sus metabolitos poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas bien conocidas en el SNC (Bin-Jaliah & Sakr, 2018).

El estrés oxidativo representa una amenaza a la integridad química de las biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN. El daño oxidativo a estas moléculas se le relaciona con diversas patologías tales como enfermedades neurodegenerativas, diversos tipos de cáncer entre muchas otras. Existen mecanismos de defensa de tipo enzimáticos a los cuales se suman compuestos llamados antioxidantes, que ofrecen protección química contra los efectos nocivos del estrés oxidativo. Entre estos antioxidantes, la melatonina y sus metabolitos constituyen una familia de compuestos químicamente eficiente. La protección antioxidante continua de la melatonina y sus metabolitos, con variados mecanismos de acción, se le denominan protección en cascada. Por lo tanto, la protección de la melatonina contra el estrés oxidativo es

excepcional respecto a otros antioxidantes, versátil y colectiva lo que la convierte en una de las mejores defensas naturales contra el estrés oxidativo (Galano & Reiter, 2018).

A la fecha, se han propuesto muchos mecanismos causantes de la alteración o pérdida de espinas dendríticas en la EA. Estos cambios estructurales se relacionan con el detrimento de la memoria. Las neuronas del hipocampo participan en la integración de la memoria espacial y se pierden en estados de demencia. La melatonina aumenta la maduración y complejidad de dendritas en neuronas nuevas formadas en el giro dentado en ratones adultos (Domínguez-Alonso, Ramírez-Rodríguez, & Benítez-King, 2012) y repara la pérdida de dendritas de neuronas piramidales del hipocampo mediante el aumento de las concentraciones de calmodulina, activando la protein-quinasa II dependiente del complejo Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) favoreciendo la dendritogénesis a través de la activación de la protein-quinasa C (PKC) efecto vía receptor (Shukla, Sotthibundhu, & Govitrapong, 2020)

Los efectos neuroprotectores que se le atribuyen son principalmente la capacidad que tiene de eliminar radicales y sus propiedades antioxidantes. Además del potencial efecto antioxidante directo posee varios mecanismos que son responsables de sus efectos beneficiosos, como la inhibición de la inflamación, protección de la unidad neurovascular y la inhibición de la apoptosis. La melatonina tiene la capacidad de aumentar directamente la actividad de enzimas antioxidantes que incluyen a la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peróxidasa (GPX), estos cambios mejoran la capacidad de defensa antioxidante de una célula (Ozacmak, Barut, & Ozacmak, 2009).

La melatonina aumenta la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones de una manera dependiente del tiempo en tejidos cerebrales y hepáticos. Se ha reportado en diversos estudios que la melatonina interactúa con los complejos de la cadena de electrones donando electrones y como un intermediario oxidado, aceptando electrones, ambas acciones favorecen el flujo de electrones (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993; Tricoire et al., 2002).

La melatonina es una molécula atrapadora de radicales libres y actúa como antioxidante de lípidos y por estas características la melatonina se ha propuesto como agente neuroprotector.

Adicionalmente tiene funciones antiexcitadoras y en dosis suficientes, efectos sedantes (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993; Tricoire et al., 2002).

La melatonina participa en muchas de estas acciones a través de mecanismos mediados por receptores de membrana como MT₁ y MT₂ acoplados a proteína G y receptores nucleares como RZR/ROR. La familia de receptores MT desarrollan diversos mecanismos de transducción de señales que culminan en respuestas fisiológicas específicas. La melatonina, por su carácter anfifílico, también actúa directamente en las células sin la participación de receptores a través de su unión a calmodulina, o a través de la activación de la PKC (Reiter & Tan, 2002).

A medida que el envejecimiento progresa se pierde la capacidad de autorregulación del FSC que posiblemente contribuye a la DVa. Estudios sugieren a la melatonina como un mediador importante para la etiología de DVa, dado que su concentración disminuye gradualmente con el envejecimiento (Ozacmak et al., 2009).

2.11. La melatonina en la neurogénesis

La formación de nuevas neuronas en el cerebro adulto ocurre durante toda la vida. Sin embargo, la neurogénesis en modelos experimentales, disminuye durante el envejecimiento y se altera en algunos trastornos neuropsiquiátricos como la depresión y demencia (Ramirez-Rodriguez, Ortiz-Lopez, Dominguez-Alonso, Benitez-King, & Kempermann, 2011).

La organización del citoesqueleto cambia en sincronía con el fotoperíodo y está relacionada con los niveles séricos de melatonina circulante en la fase oscura, en ratas pinealectomizadas, lo que provoca una disminución en densidad de espinas dendríticas. La administración de melatonina a ratas pinealectomizadas provoca un aumento robusto en el contenido de microfilamentos en el hipocampo (De Reviere, Tillet, & Pelletier, 1991). La organización de microfilamentos se modula con el fotoperíodo mediante la señalización de melatonina (Jiménez-Rubio, Ortiz-López, & Benítez-King, 2012).

La melatonina puede aumentar la neuroplasticidad en el núcleo supraquiasmático (NSQ) que actúa sobre el sistema glutamatérgico (Valdes-Tovar et al., 2018). La melatonina estimula las etapas tempranas de la formación de neuritas, un proceso que se sabe antecede a la formación

de dendritas y la maduración de la dendrita en la neurogénesis adulta que se produce en el giro dentado (Domínguez-Alonso et al., 2012). La melatonina podría ser un adyuvante útil que apoye el reclutamiento apropiado de nuevas neuronas (Ramirez-Rodriguez et al., 2011).

En roedores, la melatonina estimula todas las etapas de la neuroplasticidad. Se sabe que la melatonina también estimula la dendritogénesis y la sinaptogénesis en el hipocampo (Valdes-Tovar et al., 2018). Además, la melatonina aumenta la formación axonal en cultivo de neuronas de hipocampo de ratas (Liu, Clough, & Dubocovich, 2017), y también potencia el proceso de la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo de ratones C3H / HeN adultos (Liu, Somera-Molina, Hudson, & Dubocovich, 2013).

La organización del citoesqueleto desempeña un papel clave en el transporte axonal, la liberación de neurotransmisores y la posición del receptor. Por lo tanto, los niveles disminuidos de melatonina causados por diferentes factores, participan en alteraciones del citoesqueleto que conducen a deficiencias funcionales (Jiménez-Rubio et al., 2012).

Los MTs desempeñan un papel en los cambios de fase inducidos por la melatonina de los ritmos de actividad circadiana, posiblemente explicando por qué se producen trastornos circadianos en enfermedades asociadas con trastornos de los MTs. Aquí, el estado de los MTs gobierna la actividad neural, con un aumento en la cantidad de tubulina polimerizada que disminuye la actividad (Gardiner, Overall, & Marc, 2011).

En una revisión realizada por Sarlak y col. encontraron que el receptor de melatonina MT1 está involucrado en efecto de la melatonina en la producción de BDNF. El receptor de melatonina MT1 y los agonistas de MT2 aumentan el BDNF en los cultivos primarios de células granulares de ratón (Sarlak, Jenwitheesuk, Chetsawang, & Govitrapong, 2013).

En un estudio realizado por Rudnitskaya y col. sugieren que la melatonina puede estar relacionada en el desarrollo y/o progresión en la EA. Encontraron que la melatonina administrada por vía oral en animales con senescencia acelerada (ratas OXYS) un modelo que simula la EA tiene propiedades neuroprotectoras, las cuales normalizan la producción de algunas moléculas como BDNF y la hormona de crecimiento, que previene la muerte neuronal en el hipocampo y atenúa las anomalías en el comportamiento y alteraciones en la memoria.

Sugiriendo a la melatonina como una estrategia profiláctica en contra del desarrollo temprano de la EA (Rudnitskaya et al., 2015).

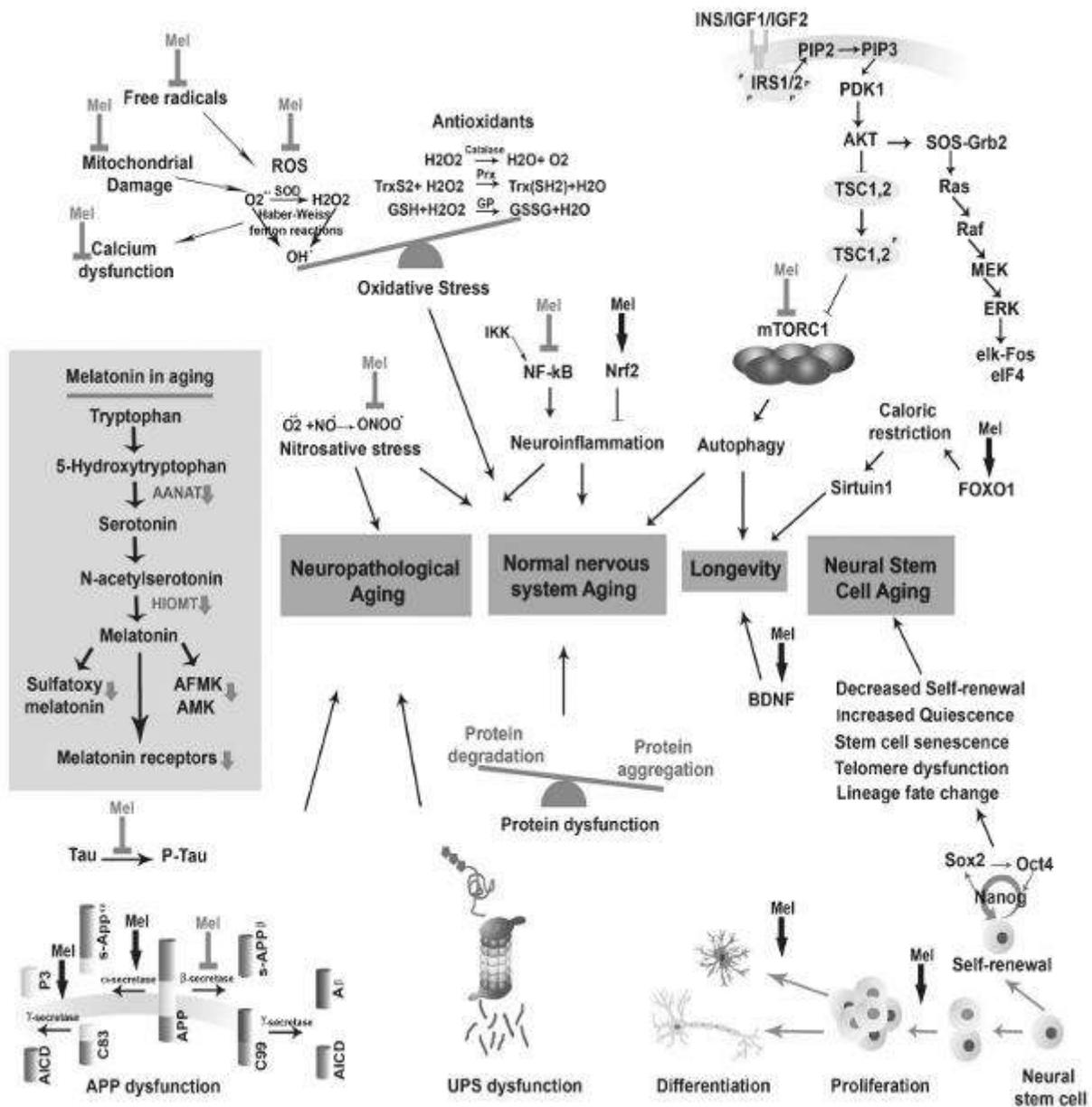


Figura 4. Mecanismos del envejecimiento del sistema nervioso y los efectos de la melatonina (Sarlak et al., 2013).

3. Justificación

Dado que la esperanza de vida de la población a nivel mundial se ha incrementado, la incidencia en las enfermedades crónico-degenerativas también se ha visto aumentada, entre ellas la demencia, por lo que es de suma importancia contar con tratamientos que puedan prevenir, disminuir o revertir las repercusiones de esta patología.

Las modificaciones en la estructura y funcionamiento cerebral relacionadas al envejecimiento, así como la disminución en las concentraciones plasmáticas sanguíneas y tisulares de melatonina, pueden favorecer la presencia y progresión de trastornos neurodegenerativos. A su vez, la hipoperfusión cerebral crónica puede ser un factor concurrente de daño cerebral y deterioro cognoscitivo.

Se ha demostrado que la melatonina posee la capacidad de evitar la muerte neuronal asociada a diversos procesos fisiopatológicos de daño cerebral, así como promover la neurogénesis y ser un eficaz antioxidante y antiinflamatorio.

Este proyecto empleará un modelo en el que se imitarán las condiciones fisiopatológicas características de la hipoperfusión cerebral crónica en los humanos. Actualmente, no existen estudios que comprueben los efectos neuroprotectores de la melatonina bajo estas condiciones.

4. Hipótesis

La melatonina preservará la eficacia de las funciones cognoscitivas en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial así como la población de neuronas remanentes y la citoarquitectura en el segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en condiciones experimentales de hipoperfusión cerebral crónica en ratas.

5. Objetivo general

Evaluar los efectos de la administración de melatonina sobre los procesos de recuperación estructural y funcional del hipocampo, luego de hipoperfusión cerebral crónica.

6. Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la administración de melatonina en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en ratas macho bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica.

Evaluar el efecto de la administración de melatonina sobre la población neuronal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en ratas macho bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica.

Evaluar el efecto de la administración de melatonina sobre la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en ratas macho bajo condiciones de hipoperfusión cerebral crónica.

7. Material y métodos

Se utilizaron 25 ratas macho adultas Sprague-Dawley, de ocho meses de edad aproximadamente (450 g), y se conservaron en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), iluminación (ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad) y alimentación *ad libitum*.

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la guía de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicación NIH No. 80-23, 1996) y la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se tuvieron 4 grupos experimentales:

- **Grupo Sham (SHAM n=7):** animales sometidos a simulación del modelo modificado de HCC (2VO).
- **Grupo Vehículo (VEH n= 6):** animales sometidos al modelo modificado de HCC (2VO), tratados con sol. vehículo (propilenglicol al 15% y solución inyectable) vía subcutánea.
- **Grupo Melatonina 1 (MEL 1 n= 6):** animales sometidos al modelo modificado de HCC (2VO), tratamiento con Melatonina (10 mg/kg/sc en sol. vehículo con Melatonina 10mg/mL) 24 horas después de HCC por 53 días.
- **Grupo Melatonina 2 (MEL 2 n= 6):** animales sometidos al modelo modificado de HCC (2VO), tratamiento con Melatonina (10 mg/kg/sc en sol. vehículo con melatonina 10mg/mL) 15 días después de HCC por 38 días.

7.1. Modelo de Hipoperfusión Cerebral Crónica

El episodio de HCC se provocó siguiendo el procedimiento previamente descrito por otros autores (Cechetti et al., 2010). La rata se anestesió con Xilacina (10 mg/kg, intramuscular) y Ketamina (50 mg/kg, intramuscular), a través de una incisión en la línea media ventral del cuello se localizó las arterias carótidas comunes y se separaron del nervio vago. La arteria carótida derecha se ocluyó con una doble ligadura (Azzubaidi et al., 2012), se cortó la arteria entre las dos ligaduras y se suturó la herida. Después de una semana se realizó una nueva incisión y el mismo procedimiento se llevó a cabo sobre la arteria carótida izquierda (Azzubaidi et al., 2012; Cechetti et al., 2012; Cechetti et al., 2010).

7.2. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris

Para la evaluación funcional se utilizó el laberinto acuático de Morris (Morris, 1984), que consistió en una tina circular de 140 cm de diámetro y 50 cm de altura, llenada hasta una altura de 25 cm con agua teñida con violeta de genciana ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Dentro de la tina se colocó una plataforma circular de 15 cm de diámetro, cuya superficie quedó 2 cm por debajo del nivel del agua. La tina se dividió de manera imaginaria en cuatro puntos (N, S, E y O) y en cuatro

cuadrantes (NO, NE, SO y SE), de manera que la plataforma sumergida se colocó en un cuadrante de forma aleatoria y permanente.

A los 45 días post-2VO, cada rata se sometió a 2 ensayos diarios durante 7 días, cada ensayo consistió en el siguiente proceso:

Se colocó a la rata dentro del agua, de frente a la pared del laberinto, y se le permitió nadar hasta localizar la plataforma oculta o hasta que transcurrieran 60 segundos (s), luego de los cuales la rata fue guiada hacia la plataforma donde se le permitió permanecer por 15 s. El punto de inicio de la prueba para cada animal en los siete días fue diferente y se eligió aleatoriamente, y la posición de la plataforma permaneció constante. Hubo objetos en el cuarto de experimentación que con el experimentador constituyeron las señales espaciales disponibles para el animal. Las pruebas fueron videograbadas con una cámara colocada en una posición fija, arriba de la tina, al centro, obteniendo el video, las trayectorias de nado y los valores de latencia de escape (tiempo que tarda el animal en localizar la plataforma) fueron analizados y evaluados por el programa FIJI.

El día 8 se realizó la prueba de transferencia, en la que se retiró la plataforma y el animal nadó durante 30 s. Se registró la trayectoria de nado del animal, el tiempo de permanencia de la rata en el sitio previamente ocupado por la plataforma y los cruces por dónde se encontraba la plataforma, para evaluar la memoria espacial.

Se evaluaron los siguientes parámetros para la eficiencia del aprendizaje y la memoria espacial: latencia de escape (s), distancia recorrida (cm) para localizar la plataforma, velocidad de nado (cm/s), tiempo de recorrido en el cuadrante objetivo (s) y en los otros tres cuadrantes; y número de cruces por el sitio donde se encontraba la plataforma. Las comparaciones intragrupal de los valores de latencia de escape (mediana) entre el día 1 y los 6 días subsiguientes de prueba, se realizaron mediante análisis de varianza no paramétrica, ANOVA de Friedman y la prueba de rangos señalados y pares igualados de Wilcoxon, *post hoc*. Las comparaciones intergrupales de las latencias de escape durante los 7 días de prueba, fueron realizadas mediante ANOVA de Kruskal-Wallis y prueba U de Mann-Whitney, *post hoc*. La longitud de las trayectorias y la velocidad de nado durante el período de prueba, así como el

número de cruces y el tiempo de recorrido en el cuadrante donde debería estar la plataforma (día 8), fueron comparados entre los diferentes grupos mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey, *post hoc*. Para las comparaciones intragrupalas de los valores de la longitud de las trayectorias y la velocidad de nado durante el período de 7 días de prueba se empleó ANOVA de medidas repetidas y prueba de Tukey, *post hoc*; finalmente, la comparación entre el número de cruces en el cuadrante en el que originalmente se encontraba la plataforma objetivo y en los otros cuadrantes se realizó por ANOVA de una vía y prueba de Tukey, *post hoc* (Downie & Heath, 1983).

7.3. Evaluación neuronal por medio de técnicas histológicas

Se realizaron las pruebas histológicas para el estudio del daño neuronal en las neuronas piramidales del segmento CA1 de hipocampo; los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora (solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.4) seguida de una solución fijadora compuesta de formaldehído al 10 % en la solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Los cerebros fueron retirados del cráneo y se conservarán en el mismo fijador hasta realizar el procesamiento histológico. Cada cerebro fue seccionado en 2 mitades a partir de la fisura longitudinal; del hemisferio derecho cada animal de experimentación se obtuvieron cortes coronales de la región que contiene el hipocampo dorsal, para ello se utilizó una matriz de acrílico para cortes coronales de cerebro de rata (Stoelting mod. 51384) para la técnica de Nissl (Luna, 1960); del hemisferio izquierdo se obtuvo el hipocampo intacto para realizar la técnica de impregnación metálica de Golgi (González-Burgos, Tapia-Arizmendi, & Feria-Velazco, 1992).

7.4. Tinción de Nissl

Las rebanadas de tejido cerebral que se obtuvieron, se deshidrataron mediante inmersión en alcohol etílico, en concentraciones crecientes y en alcohol amílico, posteriormente fueron aclaradas en aceite de madera de cedro y en cloroformo, para su inclusión en parafina. De estos bloques de tejido cerebral incluido en parafina se obtuvieron por medio de un micrótopo, series de cortes coronales de 10 μm de espesor, del hipocampo dorsal localizado entre -2.52

mm y -4.56 mm a partir de bregma, de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2009). Uno de cada 5 cortes coronales fueron teñidos con violeta de Cresilo al 0.5%, pH 3.9 (Luna, 1960). Se contó el número de neuronas piramidales remanentes (neuronas con morfología normal, integridad de la membrana y nucléolo claramente visible) en 5 cortes histológicos de cada cerebro de los animales en los diferentes grupos experimentales. El número de neuronas piramidales remanentes se evaluó en una extensión lineal de 400 μ m del estrato piramidal del segmento CA1, del cuerno de Ammon del hipocampo, mediante microscopio óptico (Leica Mod. DM 1000) con un aumento de 400x y un sistema computarizado de análisis de imágenes histológicas (Leica Microsystems Mod. LAS06886)(Letechipía-Vallejo et al., 2007).

7.5. Impregnación argéntica de Golgi

Del hemisferio izquierdo del cual se obtuvo el hipocampo se realizó una impregnación argéntica de Golgi modificada (González-Burgos et al., 1992), la cual consistió en:

Induración del hipocampo. El hipocampo intacto del hemisferio izquierdo del cerebro de la rata se sumergió en una solución de dicromato de potasio al 2% en 50 mL de agua desionizada, 10 mL de formaldehído al 40% y 5 mL de ácido acético glacial a 25°C durante 24 horas. Al pasar las 24 horas se renovó la solución de induración y se dejó por otras 24 horas. Pasado ese tiempo, se realizaron enjuagues por bloque con agua desionizada. Impregnación argéntica. Los bloques enjuagados se colocaron en una solución de nitrato de plata al 0.75% en 20 mL de agua desionizada con 2 μ L de ácido fórmico durante 24 horas en oscuridad. El tejido impregnado se incluyó en parafina y se cortó utilizando el micrótopo Stoelting © Tissue Slicer 51425, obteniéndose cortes coronales de 200 μ m de espesor. Para el análisis se seleccionaron 5 neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo por animal, las cuales requirieron mostrar las siguientes características: a) que se pueda observar desde el soma hasta el final de sus dendritas con suficiente claridad y sin interferencia de otras dendritas o vasos sanguíneos; b) Al menos 100 μ m de longitud. En cada neurona se evaluaron las siguientes variables: longitud de la dendrita apical, densidad de espinas dendríticas por segmento y proporción de

los diferentes tipos de espinas dendríticas (hongo, anchas y delgadas) en la primera oblicua de la dendrita apical.

Para la evaluación de la longitud de la dendrita apical de las neuronas piramidales se utilizó el método de Sholl (Sholl, 1953) el cual consiste en la medición aproximada de la longitud de las dendritas de acuerdo con la ubicación de su extremo distal en un conjunto de anillos concéntricos con una separación de 40 μ m entre anillos adyacentes. Se utilizó un molde en acetato en conjunto con un analizador de imágenes (Leica© Microsystems Mod LAS06886) en una amplificación de 400 aumentos (40X).

Se evaluó la densidad de las espinas de las neuronas piramidales, de la dendrita apical desde su última bifurcación se tomó una dendrita oblicua, se delimito un segmento de 50 μ m de longitud, se contaron las espinas dendríticas en dicho segmento, y se identificaron sus diferentes tipos (hongo, delgadas y anchas), mediante microscopio óptico (Leica Mod. DM 1000) con un aumento de 4000x y un sistema computarizado de análisis de imágenes histológicas (Leica Microsystems Mod. LAS06886)(Letechipía-Vallejo et al., 2007).

7.6. Análisis estadístico

La comparación del número de neuronas remanentes en el segmento CA1 del cuerno de Ammon en los diferentes grupos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba de Tukey, *post hoc* (Downie & Heath, 1983).

Para la proporción de los diferentes tipos de espinas (hongo, anchas y delgadas) en los diferentes grupos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA), la prueba post hoc de Tukey; así también se utilizó la corrección de Bonferroni (Downie & Heath, 1983).

8. Resultados

8.1. Evaluación del aprendizaje y memoria espacial en ratas con hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento con melatonina

8.1.1. Aprendizaje espacial. Latencia de escape

Los valores (mediana y rango) de las latencias de escape de los diferentes grupos experimentales obtenidos cada día, durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris se muestran en la fig. 5; se aprecia una reducción progresiva con el transcurso de la prueba de 7 días (Fig. 5) en todos los grupos.

En el grupo SHAM, puede observarse una reducción de los valores de latencia de escape en comparación con los valores en el 1er día de prueba (comparación intragrupal) a partir del 2do día, siendo significativa la diferencia a partir del 3er día de prueba ($p < 0.05$); una reducción a partir del día 5to día de prueba ($p < 0.05$) en el grupo VEH y a partir del 3er día de prueba ($p < 0.05$) en los grupos MEL 1 y 2.

La comparación intergrupala de los valores de latencia de escape mostró una diferencia significativa de este parámetro el día 6 de prueba en el grupo MEL 1, en comparación con los grupos SHAM y MEL 2 ($p < 0.05$).

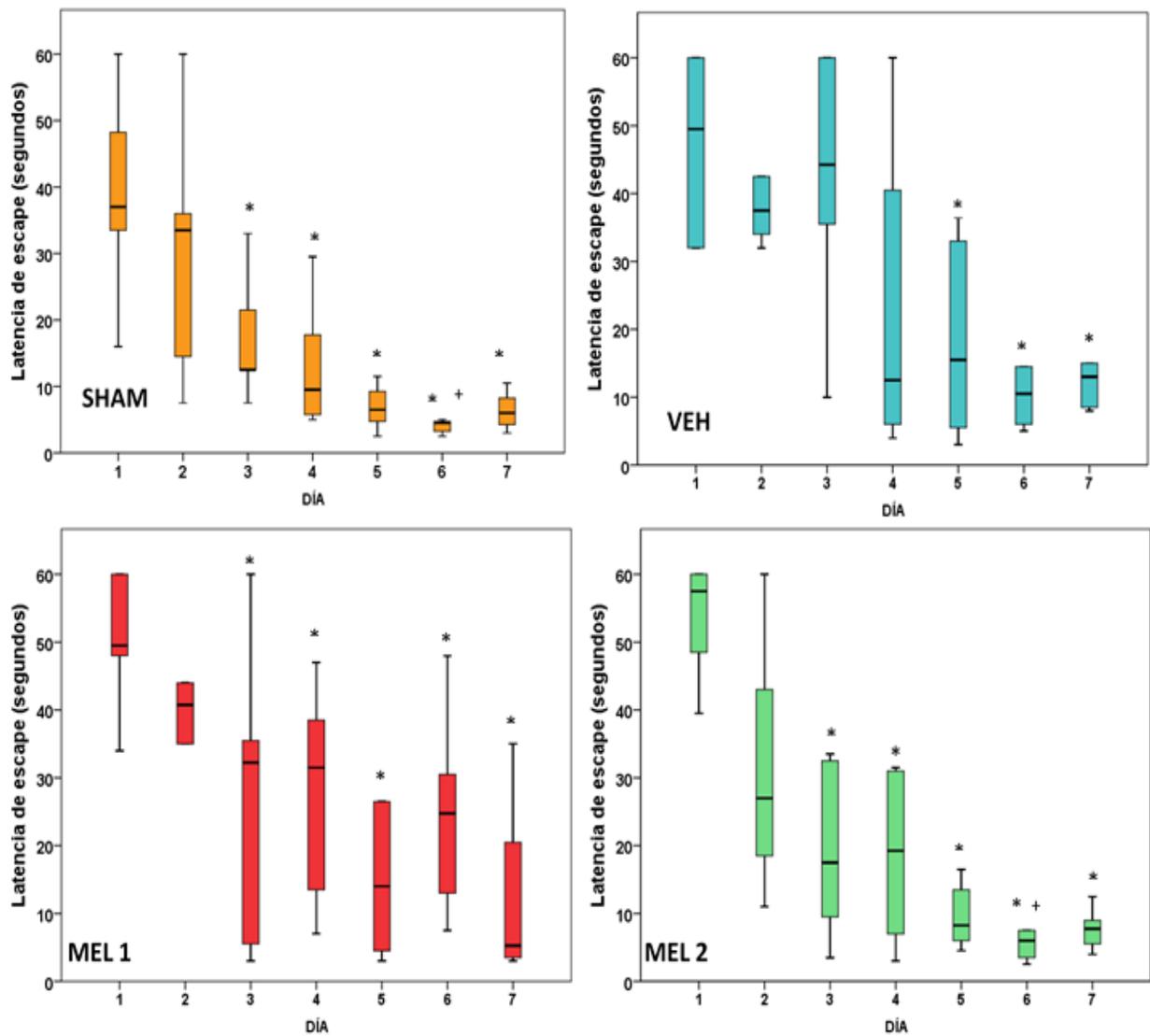


Figura 5. Latencias de escape (mediana y rango) de los grupos SHAM (n=7), MEL 1 (n=6), MEL 2 (n=6) y VEH (n=6), durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris puede observarse la reducción significativa de la latencia de escape a partir del segundo o tercer día de prueba, en algunos días en los diferentes grupos experimentales (*) y la diferencia intergrupar del grupo MEL 1, en comparación con los grupos SHAM y MEL 2 (+). $p < 0.05$, días 2 y subsecuentes vs día 1; + $p < 0.05$, día 6 de prueba.

* $p < 0.05$ vs 1er día de prueba

+ $p < 0.05$ vs SHAM y MEL 2

8.1.2. Aprendizaje espacial. Longitud de trayectorias de nado

Los valores (mediana y rango) de las longitudes de las trayectorias de nado de los diferentes grupos experimentales obtenidos cada día, durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris se muestran en la fig. 6; puede observarse la reducción progresiva en los días sucesivos en todos los grupos, con diferencias significativas con respecto al primer día de prueba en los grupos SHAM, MEL 1 y MEL 2, a partir del tercer día de prueba. En el grupo VEH, la longitud de la trayectoria de nado se redujo significativamente a partir del 5º día de prueba. La comparación intergrupala de los valores de longitud de las trayectorias de nado mostró una diferencia significativa ($+P<0.05$) de este parámetro en el grupo MEL 1, en comparación con el resto de los grupos.

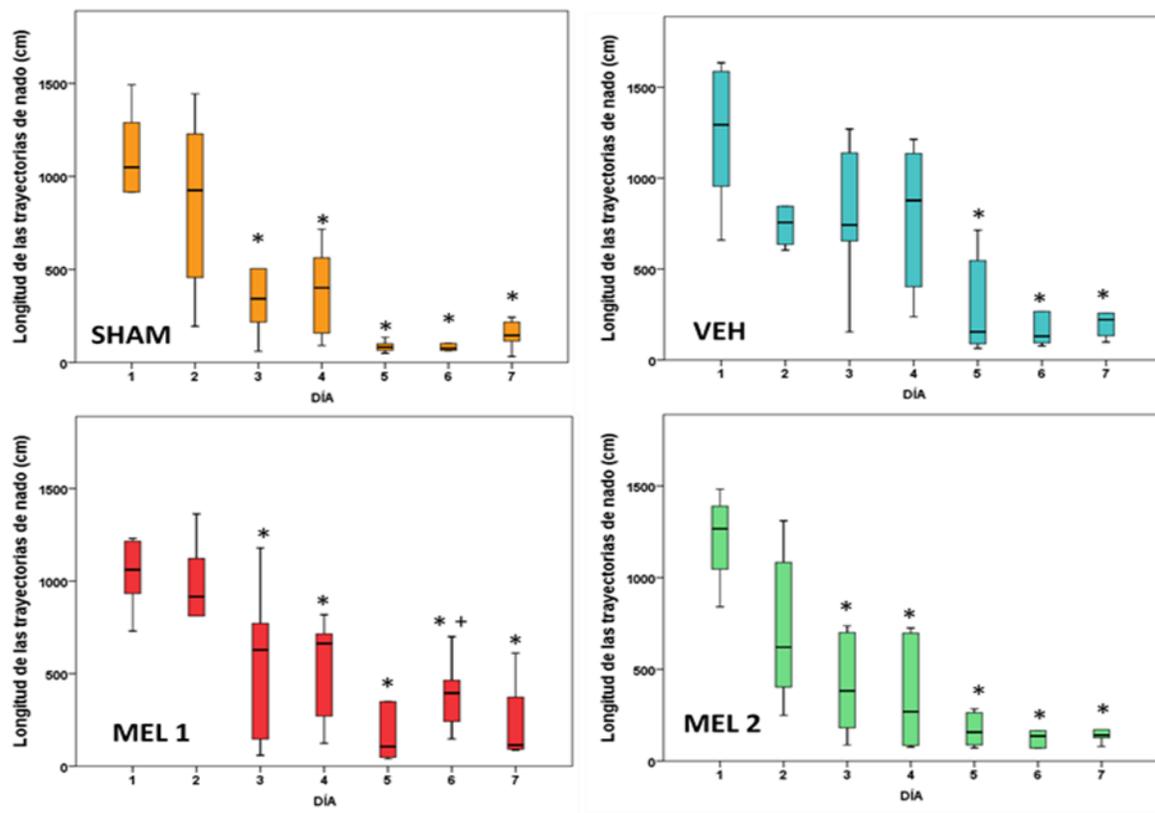


Figura 6. Longitud de trayectorias de nado (Mediana y Rango) de los grupos SHAM (n=7), MEL 1 (n=6), MEL 2 (n=6) y VEH (n=6), durante los 7 días de prueba, en el laberinto acuático de Morris. Puede observarse la reducción significativa ($P < 0.05$) de la longitud de las trayectorias de nado, con respecto al primer día de prueba, a partir del tercer día de prueba, en los grupos Sham, Mel1 y Mel2 así como a partir del 5º día de prueba en el grupo Sham (*).

En la Fig. 7, se ilustran las trayectorias de nado representativas de los grupos SHAM, MEL 1, MEL 2 y VEH en los días 1, 3 y 7 de prueba y en la prueba de transferencia (día 8). Se destaca el cambio de la trayectoria de nado, circular y cercano a la pared de la tina, observado el primer día de prueba, hacia rutas más cortas y orientadas hacia el sitio de la plataforma en los días sucesivos en todos los grupos experimentales. El grupo VEH presentó una trayectoria de mayor longitud el día 3 y 7 respecto al resto de los grupos (fig. 7).

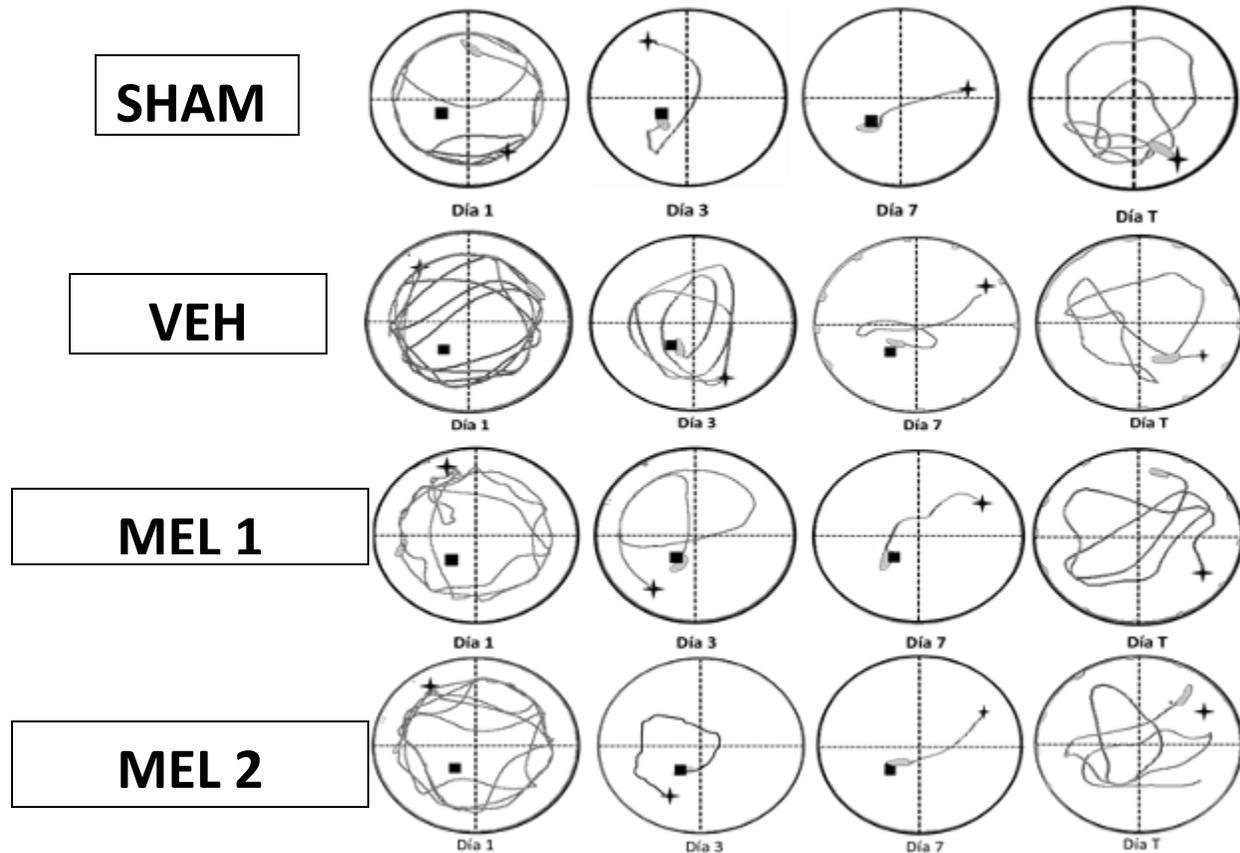


Figura 7. Trayectorias de nado representativas de un animal de cada uno de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris en los días de prueba 1, 3 y 7; así como durante la prueba de transferencia; el inicio de la ruta está representado por la estrella en color negro. Cada diagrama del laberinto acuático de Morris dividido en 4 cuadrantes y con la localización de la plataforma (cuadrante 4). Durante el primer día, se observa una trayectoria de nado circular en los diversos grupos experimentales; posteriormente las trayectorias son más cortas, y mejor orientadas hacia el sitio de ubicación de la plataforma sumergida en todos los grupos, principalmente en los grupos SHAM, MEL 1 y MEL 2.

8.1.3. Aprendizaje espacial. Velocidad de nado

La Fig. 8 muestra los valores de la velocidad de nado (cm/s) en los diferentes grupos experimentales durante los 7 días de prueba en el laberinto acuático de Morris. Se observaron

diferencias en la velocidad de nado entre el grupo experimental MEL 2, con respecto al grupo SHAM, VEH y MEL 1 por un incremento significativo ($p < 0.05$).

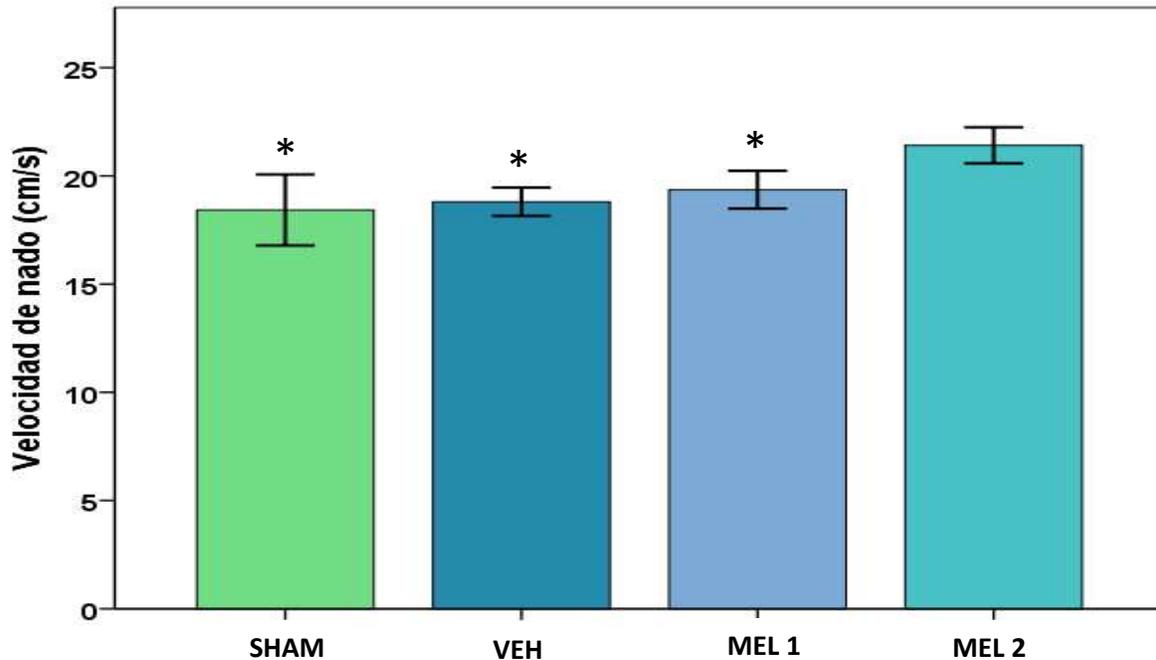


Figura 8. Valores (media \pm EE) de la velocidad de nado (cm/s) de los animales de los grupos SHAM, VEH, MEL 1 y MEL 2 durante los 7 días sucesivos de la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris.

* $p < 0.05$ vs Mel 2

8.1.4. Memoria espacial. Tiempo de recorrido por los diferentes cuadrantes en la prueba de transferencia

En la prueba de transferencia, se encontraron diferencias en el recorrido por los cuadrantes del laberinto acuático de Morris, entre los grupos experimentales (Fig. 9). El grupo SHAM realizó un recorrido predominante en el cuadrante objetivo, donde originalmente se encontraba la plataforma (cuadrante 4) y en menor grado en los cuadrantes adyacentes, con tiempos de recorrido significativamente más cortos ($p < 0.05$) en los cuadrantes 1, 2 y 3 que en el 4. Los animales del grupo VEH mostraron recorridos similares por los cuatro cuadrantes, sin

diferencias entre los mismos. De igual manera el grupo MEL 1 mostró recorridos similares en los 4 cuadrantes. Se destaca que los grupos SHAM y MEL 2, presentaron un tiempo de recorrido similar y predominante en el cuadrante objetivo, sin diferencia significativa y en el cuadrante 3, con recorridos significativamente menores ($p < 0.05$) por los cuadrantes 1 y 2 que por el cuadrante 4. Las ratas del grupo MEL 1 presentaron recorridos predominantes en el cuadrante objetivo (cuadrante 4) y en el cuadrante adyacente (cuadrante 3), con recorridos significativamente más cortos ($p < 0.05$) por los cuadrantes 1 y 2.

Por otra parte, los resultados de un análisis intergrupar no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, en el tiempo de recorrido en el cuadrante donde originalmente se encontraba la plataforma.

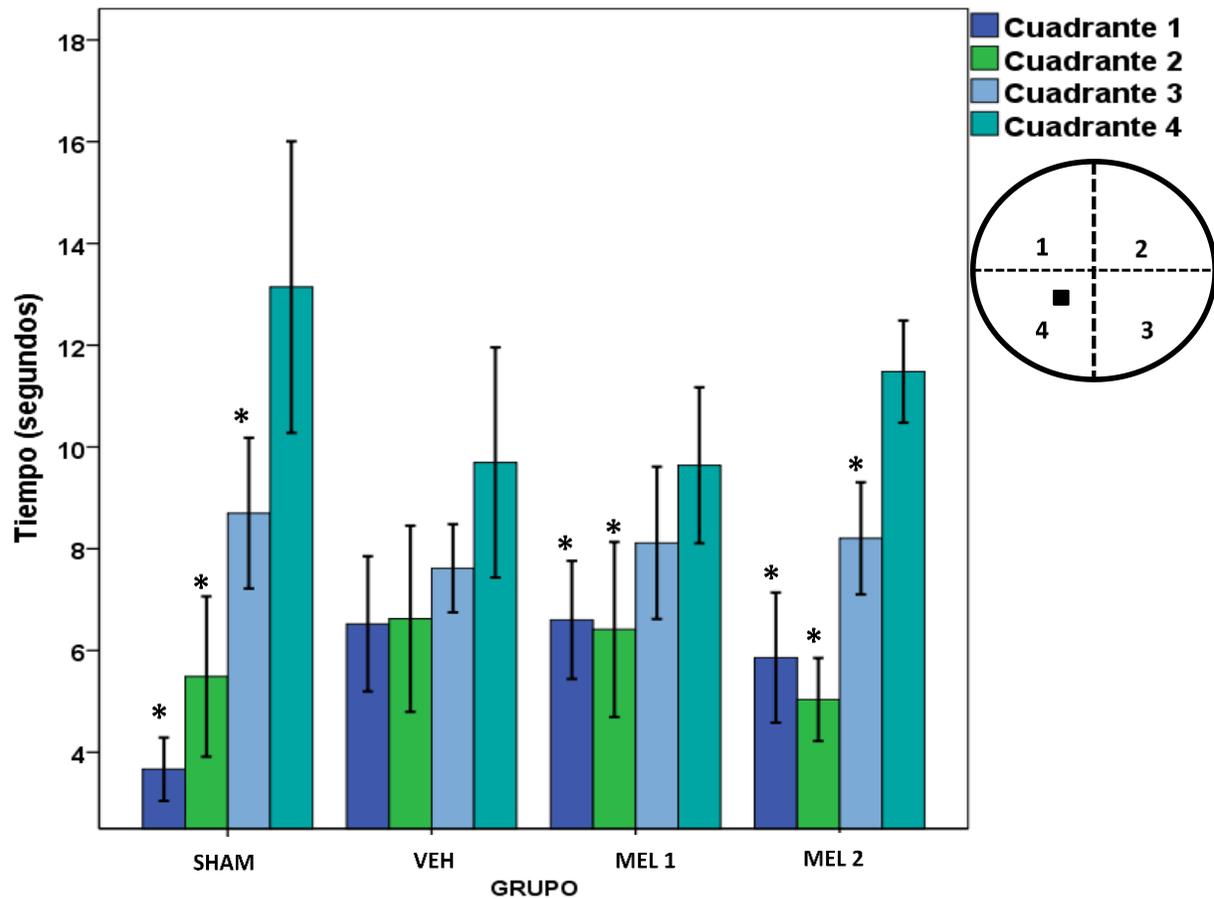


Figura 9. Tiempo (s) de recorrido (media \pm EE) en los diferentes cuadrantes durante la prueba de transferencia (30 s) del laberinto acuático de Morris, de los diferentes grupos experimentales. Puede observarse el tiempo de permanencia mayor en el cuadrante 4 (donde originalmente se encontraba la plataforma) en los grupos SHAM, VEH, MEL 1 y MEL 2 y pero sin diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo a diferencia de los demás grupos, el grupo VEH no mostró diferencias significativas entre los cuadrantes.

* $p < 0.05$ vs cuadrante 4 (cuadrante objetivo)

8.1.5. Memoria espacial. Número de cruces por el sitio de la plataforma

La tabla 1 muestra el desempeño de los animales de los diferentes grupos experimentales durante la prueba de transferencia, en cuanto al número de cruces por el sitio donde estaba la plataforma; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla 1. Número de cruces (mediana y rango) por el sitio donde se encontraba la plataforma, realizados por los grupos SHAM (n=7), VEH (n=6), MEL 1(n=6) y MEL 2 (n=6).

Grupo	Mediana	Rango
SHAM	5	(2-9)
VEH	3.5	(0-7)
MEL 1	3	(2-7)
MEL 2	5.5	(1-9)

8.2. Efecto de la melatonina sobre la pérdida de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo inducida por hipoperfusión cerebral crónica

La hipoperfusión cerebral crónica ocasionó una pérdida neuronal en el segmento CA1 del hipocampo, en el grupo VEH a los 60 días post-cirugía (fig. 10) con diferencia significativa; $p < 0.05$, (fig. 11. MEDIA \pm EEM 93.53 ± 8.66), en comparación con el grupo SHAM (fig. 11. MEDIA \pm EEM 139.01 ± 2.75). El grupo MEL 1 también mostró una diferencia significativa (fig. 11. MEDIA \pm EEM 108.50 ± 4.38) al grupo SHAM ($p < 0.05$) pero sin diferencia significativa con el grupo VEH. El grupo MEL 2 mostró diferencia significativa (fig. 11. MEDIA \pm EEM 135.04 ± 3.07); ($p < 0.05$), en comparación con los grupos VEH y MEL 1, y sin diferencia significativa respecto al grupo SHAM.

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de pérdida de neuronas piramidales de los diferentes grupos experimentales respecto al grupo SHAM. La hipoperfusión cerebral ocasionó una pérdida neuronal de 32.71 % en el grupo VEH mientras que el grupo MEL 1 tuvo una pérdida de 21.94 % y el grupo MEL 2 de 2.86 % sin diferencia con el grupo SHAM.

En las microfotografías de los cortes coronales del hemisferio derecho del cerebro de animales SHAM, VEH, MEL 1 y MEL 2, teñidos con violeta de Cresilo se muestra una imagen panorámica del hipocampo (40X) y la población neuronal del cuerno de Ammon (400X).

Tabla 2. Porcentaje de la pérdida de las neuronas piramidales del hipocampo del segmento CA1 en los diferentes grupos experimentales (VEH, MEL 1 y MEL 2) en comparación con el grupo SHAM.

GRUPO	% Pérdida de neuronas del hipocampo en CA1 vs SHAM
VEH	32.71
MEL 1	21.94
MEL 2	2.86

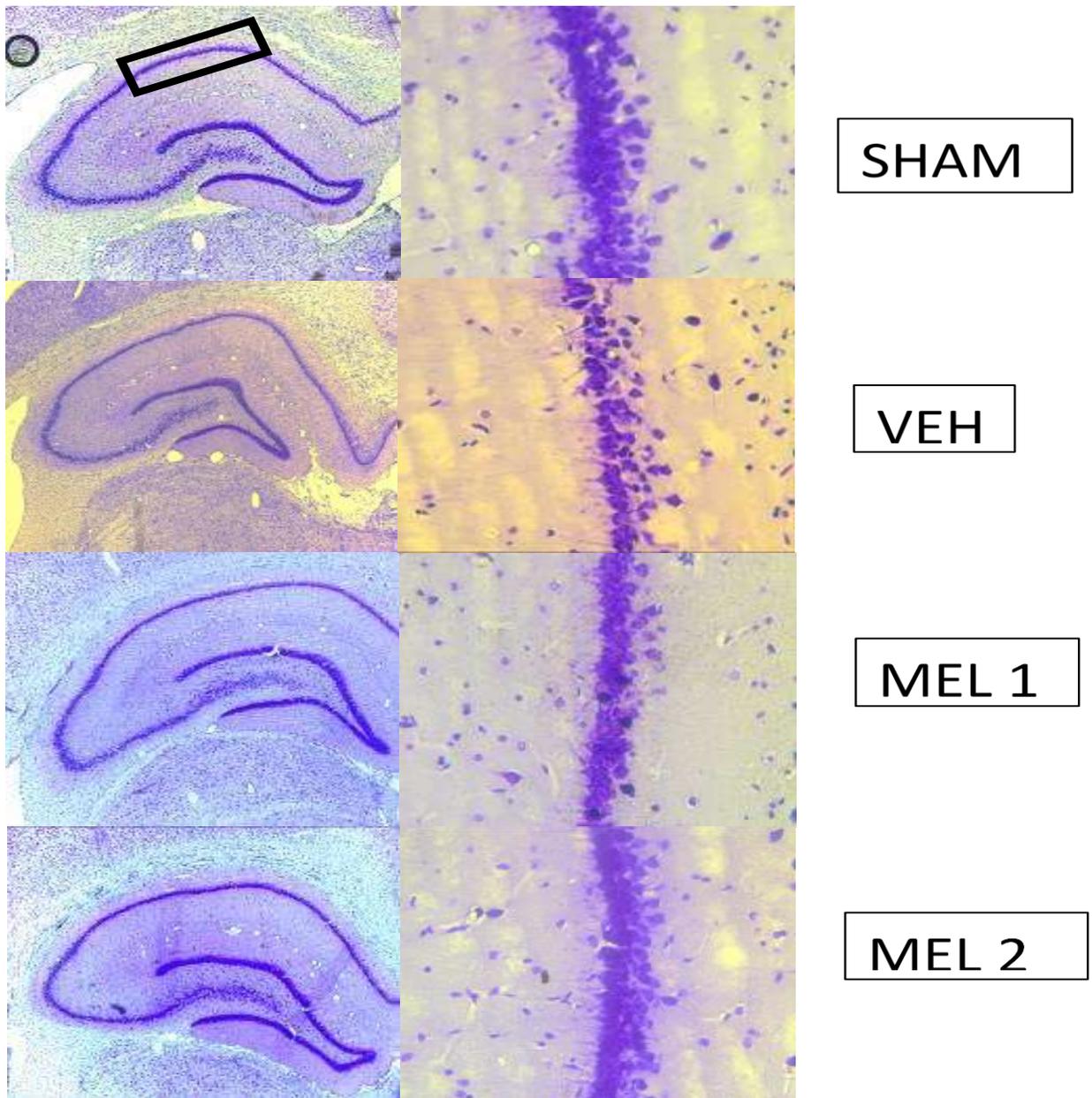


Figura 10. Fotomicrografías de cortes histológicos representativos, que ilustran a dos diferentes aumentos (40x del lado izquierdo y 400x del lado derecho) la población de neuronas piramidales remanentes, del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo en las diferentes condiciones experimentales. Puede observarse una reducción parcial del número de neuronas por efecto de la HCC en la imagen correspondiente al grupo VEH y MEL 1, sin embargo, hay preservación en el grupo SHAM y MEL 2.

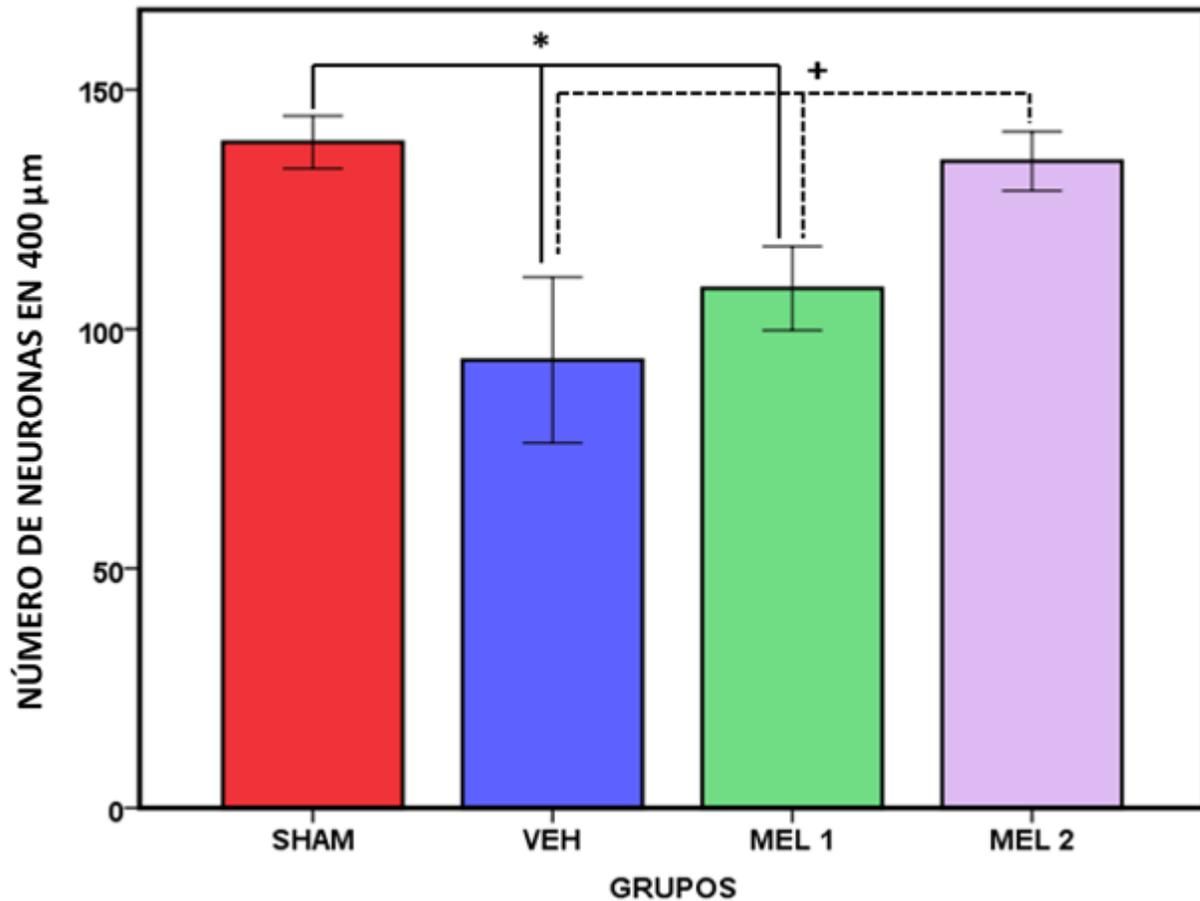


Figura 11. Número de neuronas piramidales remanentes (media \pm EE) en una extensión lineal de 400 μ m en el estrato piramidal del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo de los en los cuatro grupos experimentales. SHAM vs VEH * $p < 0.05$; SHAM vs MEL 1* $p < 0.05$; sin diferencia significativa entre los grupos SHAM vs MEL 2.

* $P > 0.05$ vs SHAM

+ $p > 0.05$ vs MEL 2

8.3. Efecto de la melatonina en la arborización dendrítica de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica

En las micrografías de los cortes coronales del hipocampo izquierdo de los animales SHAM, VEH, MEL 1 y MEL 2, impregnados con plata, se muestra una imagen panorámica de las neuronas piramidales del segmento CA1 (800X). La HCC ocasionó una reducción en la longitud

de la dendrita apical de las neuronas piramidales en el grupo VEH, con una longitud significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con la longitud de la dendrita apical de las ratas del grupo SHAM. El grupo MEL 1 también mostró una diferencia significativamente menor al grupo SHAM ($p < 0.05$) pero sin diferencia significativa con el grupo VEH. El grupo MEL 2 mostró una longitud significativamente mayor ($p < 0.05$) que grupo VEH y MEL 1, y sin diferencia significativa respecto al grupo SHAM.

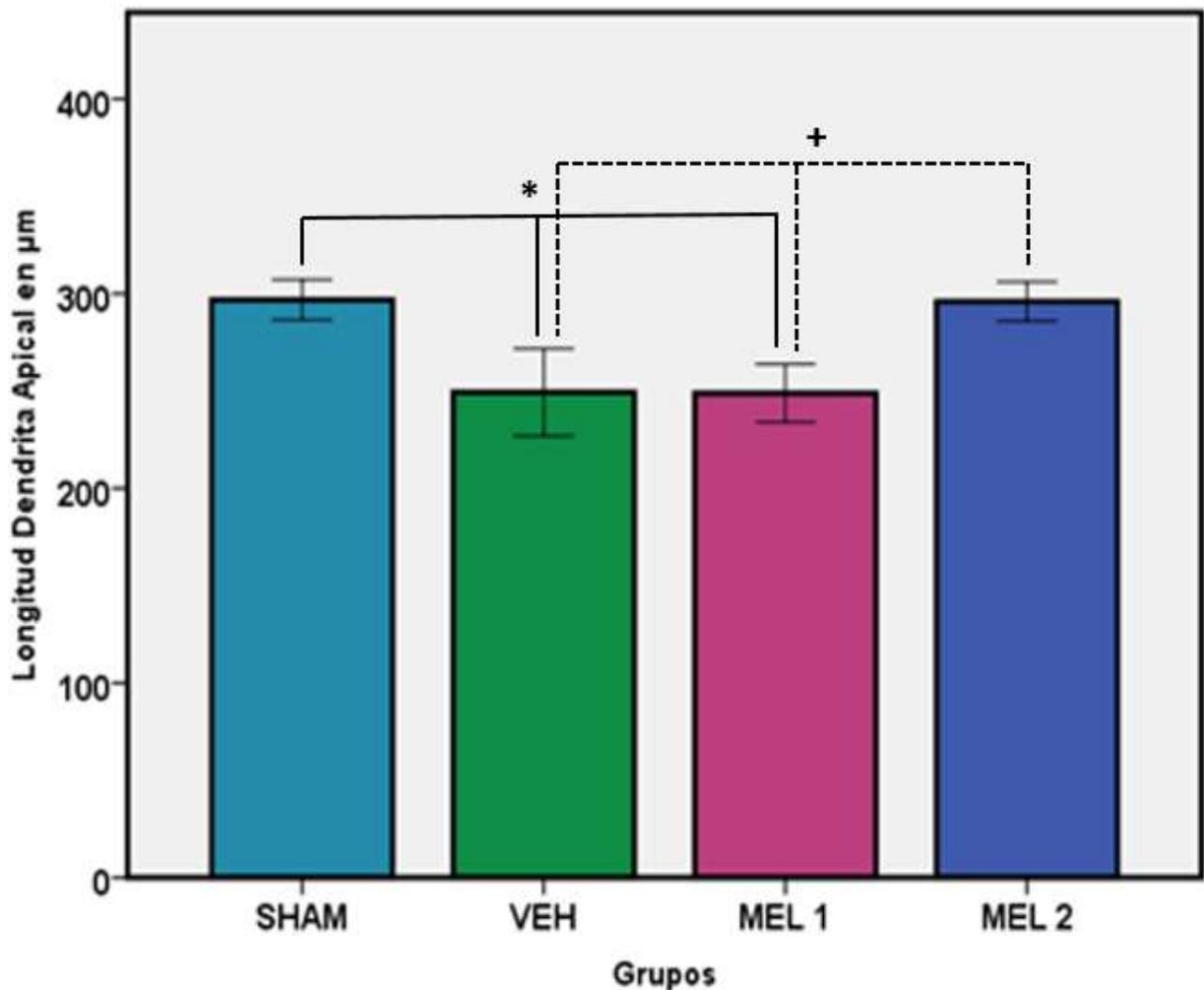


Figura 12. Longitud de la dendrita apical (media \pm EE) de las neuronas piramidales del segmento CA1 en μm , de los diferentes grupos experimentales. SHAM vs VEH $*p < 0.05$; SHAM vs MEL 1 $*p < 0.05$; sin diferencia significativa entre los grupos SHAM vs MEL 2.

* $p < 0.05$ vs SHAM

+ $p < 0.05$ vs MEL 2

La HCC ocasionó también una reducción en la arborización dendrítica, la cual se observa en las micrografías; en el grupo VEH se observan menos arborizaciones en comparación con el grupo SHAM, MEL 1 y MEL 2.

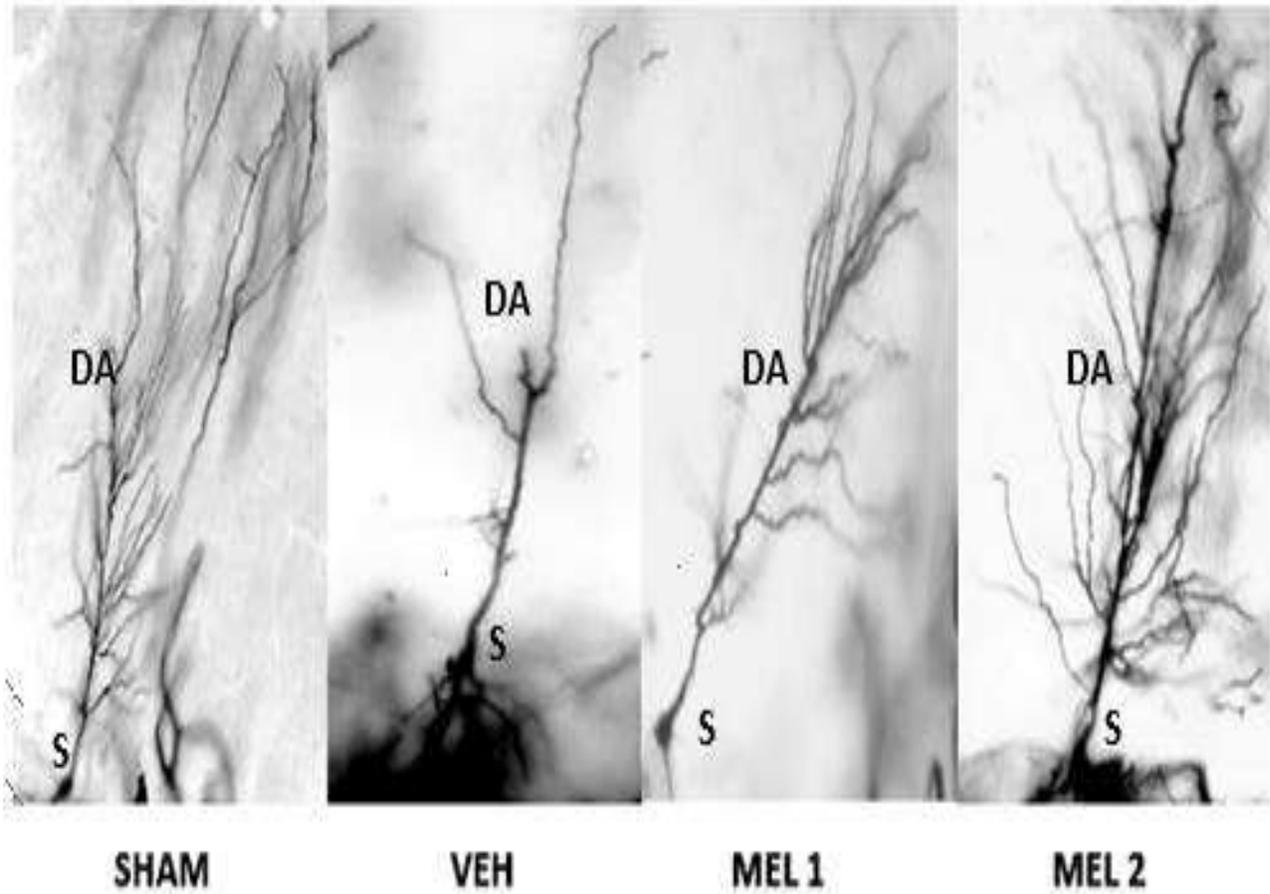


Figura 13. Fotomicrografías representativas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de los diferentes grupos SHAM, VEH, MEL 1 Y MEL 2, en las cuales se observa el soma (S) y la dendrita apical (DA) con sus ramificaciones.

8.4. Efecto de la melatonina en el número y forma de espinas dendríticas en neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica

Se observó la densidad de los diferentes tipos de espinas dendríticas (figura 14). La tabla 2 muestra el conteo correspondiente a cada tipo de espina dendrítica. El número total de espinas dendríticas en el grupo VEH fue significativamente menor ($*p<0.05$) en relación al grupo SHAM. El grupo MEL 1 fue significativamente menor ($*p<0.05$) al grupo SHAM y MEL 2, pero sin diferencia con el grupo VEH. El grupo MEL 2 fue significativamente mayor ($*p<0.05$) a todos los grupos.

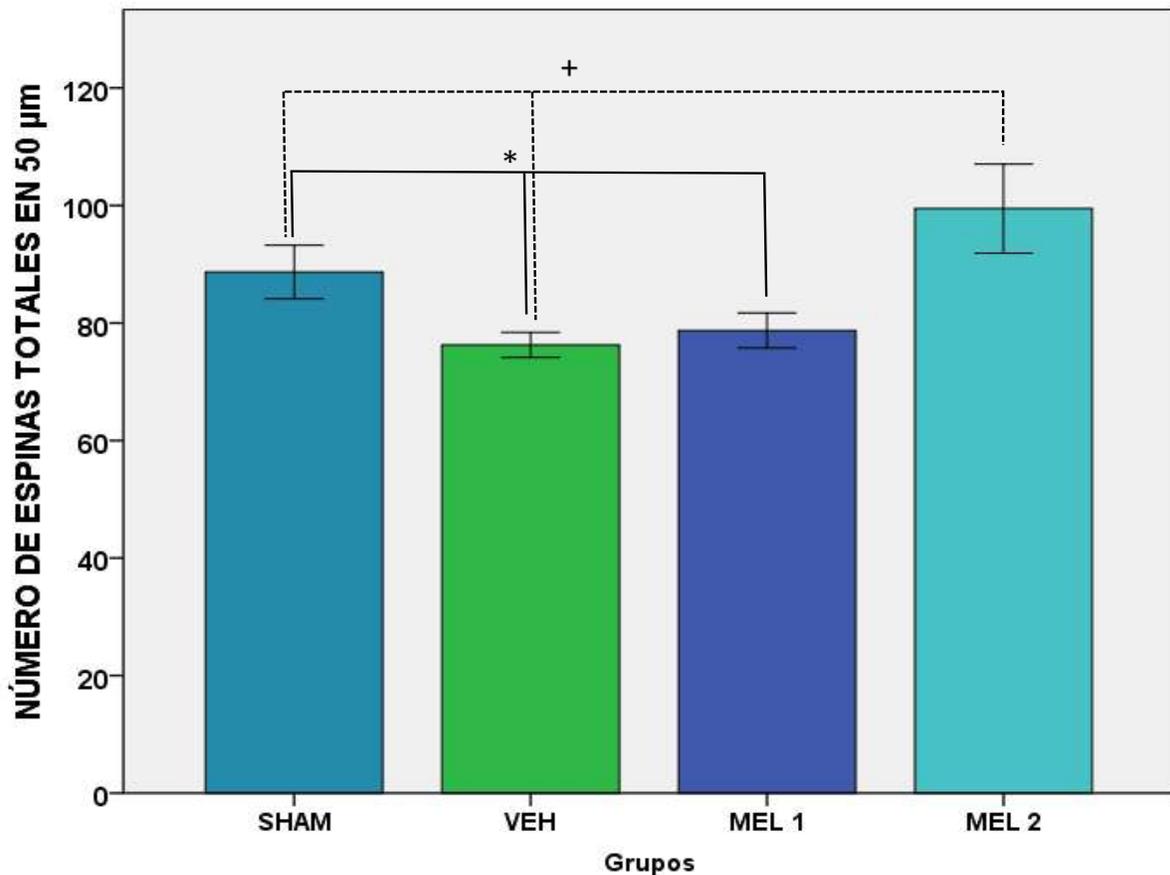


Figura 14. Reducción de la densidad del total de espinas dendríticas (media \pm EE), la HCC provocó una reducción del total de espinas en el grupo VEH en comparación con el grupo SHAM; pero sin diferencias entre el grupo MEL 1 y VEH; en el grupo MEL 2 se observó un aumento de espinas con respecto a los demás grupos.

* $p<0.05$ vs SHAM

+ $p<0.05$ vs MEL 2

Tabla 3. Densidad y porcentaje de los diferentes tipos de espinas de los segmentos de la primera oblicua (50 μ m) de la dendrita apical provenientes de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.

Grupo	Espinas en Hongo	Espinas Anchas	Espinas Delgadas	Espinas Totales
SHAM	38.3 \pm 1.13 (43.20%)	28.55 \pm 0.74 (32.20%)	21.8 \pm 1.44 (24.59%)	88.65 \pm 2.28 #
VEH	18.6 \pm 0.89 (24.39%)	38.8 \pm 0.66 (50.87%)	18.86 \pm 1.43 (24.73%)	76.26 \pm 1.06 * #
MEL 1	23.75 \pm 1.32 (30.17%)	29.8 \pm 0.65 (37.85%)	25.15 \pm 1.33 (31.94%)	78.72 \pm 1.49 * #
MEL 2	41.8 \pm 2.15 (42.02%)	33.66 \pm 1.55 (33.84%)	24 \pm 1.39 (24.13%)	99.46 \pm 3.79

* $p < 0.05$ vs SHAM

$p < 0.05$ vs MEL 2

La HCC ocasionó una diferencia en la forma de espinas dendríticas (hongo, anchas y delgada), las cuales se observaron en un segmento (50 μ m) en las fotomicrografías de la primera oblicua de la dendrita apical en los diferentes grupos SHAM, VEH, MEL 1 y MEL 2 (figura 15). Se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) de espinas en hongo en el grupo VEH en comparación con el SHAM, sin embargo hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) en las espinas anchas, y sin diferencia en las espinas delgadas. El grupo de MEL 1 fue significativamente menor ($p < 0.05$) en las espinas en hongo en comparación con el grupo SHAM y MEL 2; y sin diferencias significativas en las espinas anchas y delgadas. El grupo de MEL 2 no mostró diferencias con el grupo SHAM.

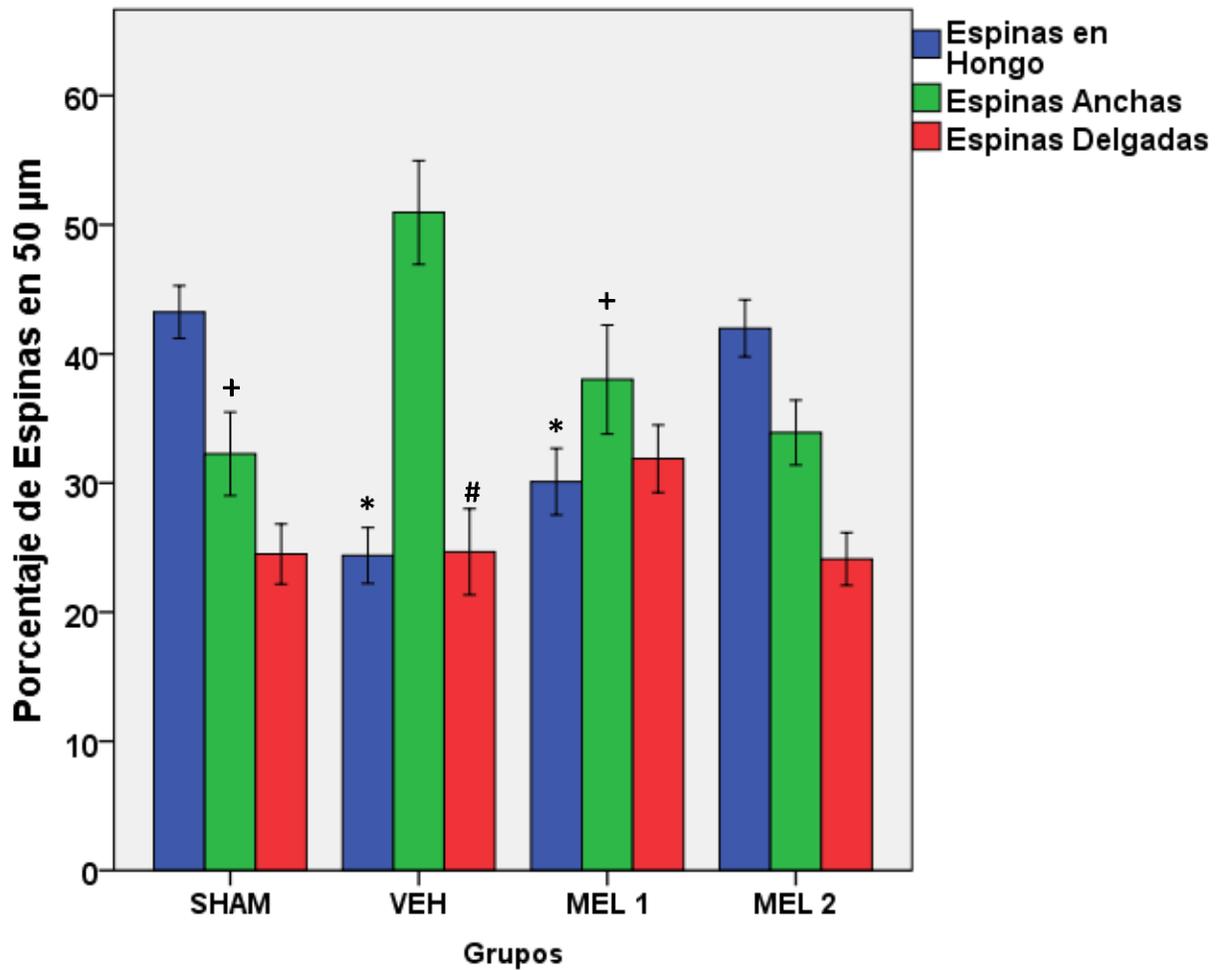


Figura 15. Proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas de la primera oblicua de la dendrita apical de los diferentes grupos experimentales.

* $p < 0.05$ vs SHAM y MEL 2

$p < 0.05$ vs MEL 1

+ $p < 0.05$ vs VEH

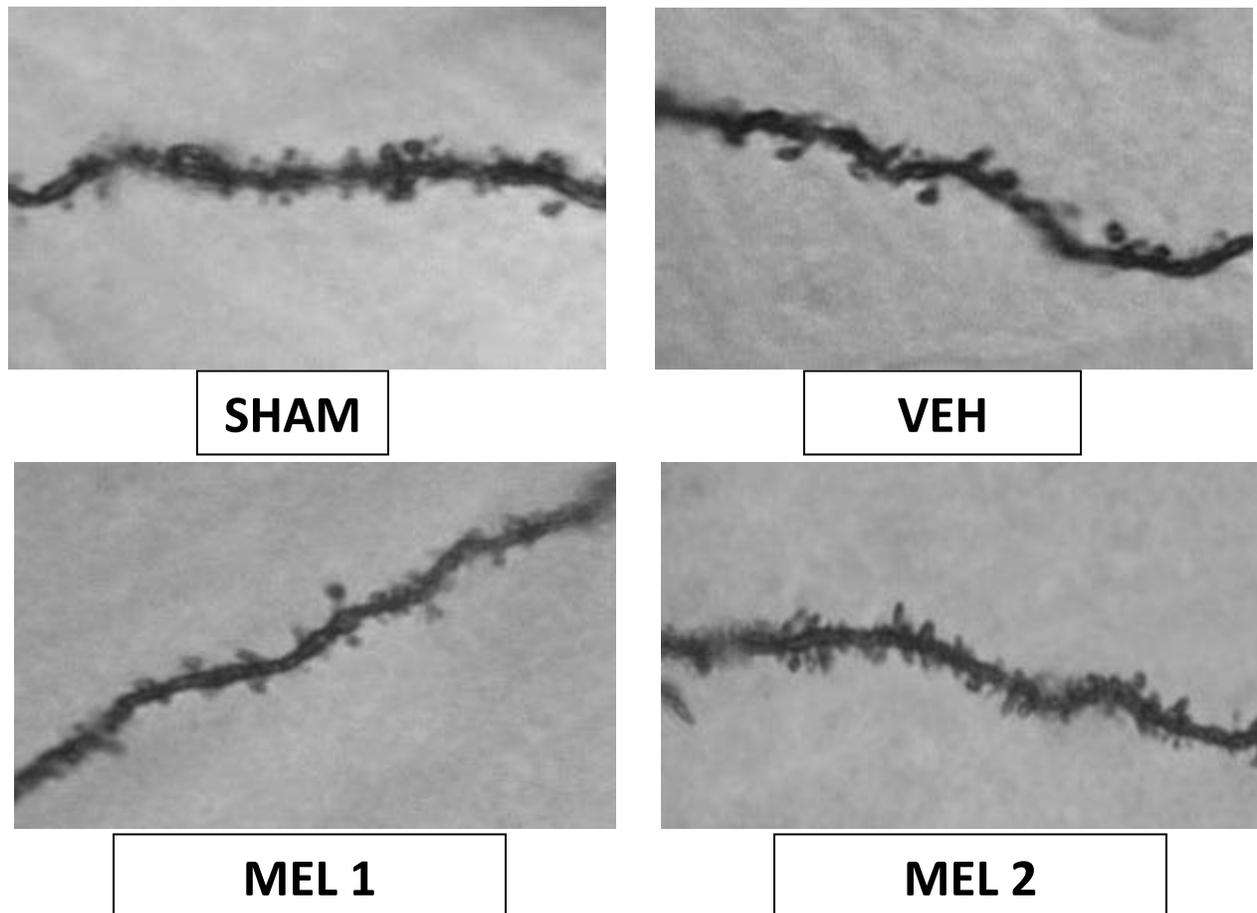


Figura 16. Fotomicrografías representativas de segmentos de la primera oblicua de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo correspondientes a grupo SHAM, VEH, MEL 1 y MEL 2, en las cuales se puede observar una menor cantidad de espinas y una estructura más delgada en los grupos VEH y MEL 2 en comparación con los grupos SHAM y MEL 2.

9. Discusión

La demencia vascular es el resultado de la combinación de condiciones fisiopatológicas y factores de riesgo que desembocan en accidentes cerebrovasculares diversos y pérdida progresiva de habilidades cognitivas. El modelo experimental 2VO reportado ampliamente en la literatura (Venkat et al., 2015) ocasiona en la rata una HCC que afecta estructuras vulnerables como el hipocampo, con alteraciones cognitivas factibles de evaluar mediante pruebas conductuales e histológicas.

En el presente estudio se evaluaron los efectos neuroprotectores de la melatonina administrada por vía subcutánea en un modelo experimental (2VO) en referencia a un grupo de ratas SHAM y un grupo de ratas VEH que solo se les administro el vehículo empleado para la solución de melatonina.

Se analizó la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo de ratas con HCC por un periodo de 60 días, y se confirmó una reducción del 32.7 % en el conteo neuronal, de manera similar a lo reportado por diversos autores (Cechetti et al., 2012) así como en trabajos previos en nuestro laboratorio (Flores-Domínguez, 2016). Este hallazgo, de una reducción del 30% en la población de neuronas piramidales en el segmento CA1 del hipocampo de ratas con HCC respecto al grupo experimental sin la condición experimental (100%). La disminución se atribuye a el desencadenamiento de mecanismos de daño como estrés oxidativo, daño a la BHE, procesos inflamatorios en el hipocampo que afecta la neurogénesis, circuitos neuronales que se manifestaran en muerte neuronal, y déficits en aprendizaje y memoria dependiente de esta estructura (Venkat et al., 2015).

Respecto a este parámetro, los datos experimentales muestran que el tratamiento crónico con melatonina/sc durante los 60 días posteriores (Grupo MEL 1) a la HCC causo una reducción del 21.9 % en el conteo neuronal, mientras que el tratamiento crónico con melatonina/sc por 45 días, iniciando a los 15 días posteriores a la HCC (Grupo MEL 2) mejoró la preservación de la población de neuronas piramidales con una reducción menor al 3% respecto al grupo SHAM, sin diferencia significativa en el conteo, dato similar al reportado por Flores-Domínguez (Flores-Domínguez, 2016).

La reducción de la población de neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo observada en ratas bajo HCC mediante el modelo de ligadura secuencial de las arterias carótidas comunes se ha asociado con el deterioro del aprendizaje y memoria espacial (Ohta et al., 1997; Vicente et al., 2009).

En el presente trabajo los animales del grupo SHAM, tuvieron una reducción progresiva de las latencias de escape, indicador de eficiencia en el aprendizaje y memoria espacial en el Laberinto acuático de Morris. Por el contrario, los animales bajo HCC pertenecientes al grupo VEH, no presentaron un patrón regular de reducción de las latencias de escape, lo que sugiere la presencia de deterioro cognoscitivo en esta situación experimental. Por otro lado, los animales con tratamiento con melatonina (MEL 2) siguieron un patrón muy similar al grupo SHAM, en la disminución de las latencias de escape a lo largo de los siete días del laberinto acuático de Morris, lo que revela eficiencia en el aprendizaje y memoria espacial. Sin embargo, en el grupo MEL 1 su desempeño fue similar al grupo VEH.

Posterior al registro de las latencias de escape, se aplicó la prueba de transferencia, en el mismo laberinto sin la plataforma de escape. Los cuatro grupos experimentales no mostraron diferencias significativas entre ellos, aunque tanto el grupo SHAM como MEL 2 presentaron una tendencia a mayor tiempo de estancia en el cuadrante objetivo, con un resultado muy similar. Sin embargo, la dispersión aparente de los datos no permitió mostrar una diferencia significativa.

Una característica común en varios desordenes neuropsiquiátricos es la presencia de alteraciones cerebrales estructurales. En particular, la disminución del volumen del hipocampo en enfermedades como esquizofrenia, depresión mayor y EA, así como una pérdida de la conectividad sináptica entre la corteza prefrontal y el hipocampo. El deterioro cognitivo es el resultado de lesiones isquémicas/vasculares pequeñas generalizadas en todo el cerebro, predominando estructuras subcorticales. Su fisiopatología afecta la organización de redes neuronales involucradas en procesos de cognición, memoria, comportamiento y funciones ejecutivas (Jellinger, 2007; Scheff, Price, Schmitt, & Mufson, 2006).

El modelo experimental 2VO que ocasiona HCC es un modelo validado por diversos autores en cuanto a la reproducción de procesos cerebrales de daño y deterioro cognoscitivo (Du et al., 2017; Venkat et al., 2015). En la DVa, la hipoperfusión crónica así como eventos tromboembólicos, conducen a una disminución progresiva del FSC, principalmente en estructuras vulnerables como el hipocampo y la corteza cerebral (Farkas et al., 2007), hipoxia, estrés oxidativo y desencadena respuestas inflamatorias. La MB periventricular, ganglios basales e hipocampo son susceptibles a lesiones inducidas por la hipoperfusión. La interrupción de los circuitos neuronales que relacionan a la corteza prefrontal con estructuras subcorticales como el hipocampo provoca déficits cognitivos característicos de la DVa (Venkat et al., 2015).

Por lo tanto, el propósito de la investigación para el tratamiento de diversos trastornos neuropsiquiátricos, debiera enfocarse en la búsqueda de moléculas con propiedades de reparación de los circuitos cerebrales dañados (Benitez-King G, 2006; Wakade, Mahadik, Waller, & Chiu, 2002).

Las dendritas son estructuras neuronales importantes en el procesamiento de la información y de la transmisión sináptica. Mediante las técnicas de Golgi de impregnación metálica, entre otras, se pretende analizar las características citoarquitectónicas de las neuronas. La importancia de la evaluación de parámetros como la morfología dendrítica y densidad de espinas, se han relacionado con enfermedades como epilepsia, isquemia, daño neurológico de origen diverso, EA y otros padecimientos neurológicos (Jia, Zhang, Zhang, Liu, & Li, 2012).

En este contexto, en el desarrollo de este estudio, se realizó el análisis de la consecuencia de la HCC en la citoarquitectura de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo del cerebro de rata, así como el efecto del tratamiento con melatonina. La HCC ocasiono una reducción en la longitud de la dendrita apical de las neuronas piramidales en el grupo VEH, una disminución en la arborización dendrítica (Fig. 13), así como una disminución en 14% de la densidad del total de espinas dendríticas. En cuanto a la forma de las espinas, el grupo VEH presentó un patrón de proporciones diferente al grupo SHAM con predominio de las espinas anchas y un número bajo de espinas en hongo y delgadas. Con estos datos, apreciamos que la HCC tiene un efecto adverso en la citoarquitectura de las neuronas en estudio, lo que conlleva a

la afectación de la conectividad óptima y formación de circuitos en condiciones de flujo sanguíneo adecuado, lo que repercute en la funcionalidad tal y como se estableció en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial ya citadas. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Jia (Jia et al., 2012) empleando el mismo modelo experimental. Sabiendo de la importancia de las espinas dendríticas como los sitios postsinápticos primarios, su presencia y plasticidad se refleja en una mejor conectividad. Por lo que alteraciones en los parámetros de evaluación de la citoarquitectura de la zona analizada implica reducción en las conexiones sinápticas, que conlleva a una afectación en las transmisiones de información desde el hipocampo hacia la corteza prefrontal y consecuentemente alteración en el aprendizaje y memoria.

En el presente estudio se empleó melatonina como propuesta neuroprotectora en dos esquemas de administración. Ambos en forma subcutánea con una dosis de 10 mg/mL/kg con una diferencia en el tiempo de administración. Uno inicio a las 24 horas de establecida la HCC (MEL 1) mientras el grupo (MEL 2) recibió el tratamiento 15 días posterior al establecimiento de la HCC.

Respecto al grupo MEL 1, la HCC y tratamiento con melatonina ocasiono una reducción en la longitud de la dendrita apical de las neuronas piramidales y disminución en 11% de la densidad del total de espinas dendríticas similar a la observada en el grupo VEH, En cuanto a la arborización dendrítica (Fig. 13), el daño fue menos evidente que en el grupo VEH. La forma de las espinas, el grupo MEL 1 presento un patrón de proporciones diferente al grupo SHAM sin diferencia entre el tipo de espinas. Los datos obtenidos, indican que la melatonina administrada de la manera ya especificada no cumplió con su efecto neuroprotector. Una de las posibles explicaciones se debe al cambio de flujo sanguíneo que se observa en este modelo experimental en el transcurso del tiempo. En la literatura se reporta una recuperación gradual del FSC al paso de los días de la HCC. Siendo los primeros días muy baja la irrigación sanguínea (disminución de 78.4% en hipocampo) y a través de mecanismos de autorregulación y reparación mejora en un 66% a las 4 semanas para alcanzar un 96% a los 3 meses posteriores a

la cirugía (Otori et al., 2003). Por lo que el escenario de daño es muy diferente a las 24 horas de la HCC que al transcurso de los días.

Además, la dosis y vía de administración, que difiere a otras propuestas anteriores (Flores-Domínguez, 2016; Martínez Celis-Rodríguez 2018) se conjuga para explicar la carencia de efecto neuroprotector. Lo mismo ocurre con los mecanismos fisiopatológicos que se emiten inicialmente y predominan mientras que el sistema opone mecanismos de reparación (Leker & Shohami, 2002).

El grupo con HCC y 15 días después tratado con melatonina (MEL 2) se observaron los siguientes resultados en la citoarquitectura. La longitud de la dendrita apical de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo se conservó y no mostró diferencias significativas respecto al grupo SHAM. Así mismo la arborización dendrítica (Fig. 13), se aprecia similar al grupo SHAM. En el grupo MEL 2, la densidad del total de espinas dendríticas fue 12% mayor al grupo SHAM. En cuanto a la forma de las espinas, el grupo MEL 2 presento un patrón similar de la proporción de espinas (Fig. 15, predominio de espinas en hongo, seguido de anchas y delgadas) sin diferencia significativa con el grupo SHAM. Adicionalmente, en la figura 13 el aspecto de las dendritas del grupo SHAM y MEL 2 es similar en cuanto al grosor y densidad de espinas. Los resultados de la conservación de la citoarquitectura se relacionan con el desempeño de los animales en el laberinto acuático de Morris, así como la preservación de la población de neuronas piramidales.

Los resultados apoyan un efecto neuroprotector de la melatonina en los animales del grupo MEL 2. Suponemos que la administración de melatonina coincide con la presencia de mecanismos de reparación por lo que la melatonina ejerce un efecto de sinergia favoreciendo el restablecimiento de la integridad del hipocampo, que incluye favorecer la conectividad entre las estructuras afectadas por la HCC.

La melatonina por sus múltiples propiedades contra los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a trastornos cerebrovasculares es una propuesta farmacológica citadas en diversas ocasiones (Cervantes, Morali, & Letechipia-Vallejo, 2008; De Butte & Pappas, 2007; García-

Chávez et al., 2008; González-Burgos, Letechipía-Vallejo, López-Loeza, Morali, & Cervantes, 2007; Karasek, 2004; Letechipía-Vallejo et al., 2007; Ramirez-Rodriguez et al., 2011)

Esta indolamina, promueve la formación de nuevas dendritas y la maduración de nuevas neuronas (Domínguez-Alonso et al., 2012; Ramirez-Rodriguez et al., 2011).

Por lo tanto, el propósito de la investigación para el tratamiento de diversos trastornos neuropsiquiátricos, debiera enfocarse en la búsqueda de moléculas con propiedades de reparación de los circuitos cerebrales dañados (Benitez-King G, 2006; Wakade et al., 2002). Las propuestas farmacológicas para el tratamiento de la DVA estarían encaminadas hacia la recuperación de circuitos neuronales que mejorarían el desempeño cognitivo del sujeto además de el manejo de los factores de riesgo vasculares (Sun, 2018) .

La melatonina además de sus múltiples propiedades neuroprotectoras, tiene efectos relevantes en el mantenimiento del citoesqueleto, estructura que se ve dañada en la DVA y en diversas enfermedades neurodegenerativas, y de cuya integridad depende la funcionalidad de los circuitos neuronales. (Domínguez-Alonso, Valdés-Tovar, Solís-Chagoyán, & Benítez-King, 2015).

En particular la PKC y CaMKII regulan múltiples funciones neuronales mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina de las proteínas blanco. Ambas quinasas participan en el mecanismo mediante el cual la melatonina estimula la dendritogénesis. La melatonina interactúa con sus receptores de membrana (MT2/MT1) para estimular a la PKC a través de la vía de síntesis de diacilglicerol (DAG). También la melatonina puede difundir a través de la membrana plasmática e interactuar directamente con PKC. Esta enzima puede fosforilar calmodulina (CaM), la cual puede unirse a CaMKII con mayor afinidad. Una vez activada CaMKII pasa por autofosforilación lo que la dirige al compartimento del citoesqueleto donde se une y contribuye a la fosforilación de la proteína asociada a los MAP2, la cual desempeña un importante papel en la formación de dendritas. La presencia de melatonina, incrementa CaM lo que facilita la activación de CaMKII. Lo antes descrito son hallazgos importantes en estudios realizados en rebanadas de hipocampo de ratas adultas cultivadas con o sin melatonina fue el incremento de CaM lo que facilita la activación de CaMKII (Domínguez-Alonso et al., 2015).

El factor neurotrófico BDNF es una proteína que juega un papel crucial en la formación y sobrevivencia de nuevas neuronas en el cerebro. La melatonina aumento la concentración de BDNF en un cultivo de neuronas y en el hipocampo (Imbesi, Uz, & Manev, 2008). Lo anterior sugiere que la melatonina afectaría el microambiente en el hipocampo favoreciendo la neurogénesis en el adulto. Estos datos en conjunto, muestra que la melatonina modula diferentes etapas en el proceso de la neurogénesis, la sobrevivencia de las neuronas y la maduración de las dendritas ambos pasos importantes para la integración final de las redes neuronales (Ramirez-Rodriguez et al., 2011).

Por lo anterior los datos de este trabajo sugieren que la administración de melatonina previene la muerte neuronal y la perdida de conectividad neuronal, así como la preservación de la conducta de memoria y aprendizaje en el modelo de HCC en rata. Los resultados obtenidos en el análisis de la citoarquitectura con la preservación de dendritas, así como de espinas dendríticas, apoyan el uso de melatonina en el cerebro adulto para el restablecimiento de la conectividad sináptica afectada en DVa entre otras enfermedades neurodegenerativas.

10. Conclusión

Los resultados obtenidos sustentan la propuesta de la melatonina como neuroprotector por su efecto en la reparación y recuperación del daño y alteraciones funcionales inducidas por hipoperfusión cerebral crónica, así como la potencialidad de su uso clínico como parte de los esquemas terapéuticos en patologías como la DVa y otras enfermedades relacionadas con la degeneración neuronal con similares mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral.

11. Referencias

- Aimone, J. B., Deng, W., & Gage, F. H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, *70*(4), 589-596.
- Almaguer-Melian, W., & Bergado-Rosado, J. A. (2002). [Interactions between the hippocampus and the amygdala in synaptic plasticity processes. A key to understanding the relations between motivation and memory]. *Rev Neurol*, *35*(6), 586-593.
- Azzubaidi, M. S., Saxena, A. K., Talib, N. A., Ahmed, Q. U., & Dogarai, B. B. (2012). Protective effect of treatment with black cumin oil on spatial cognitive functions of rats that suffered global cerebrovascular hypoperfusion. *Acta Neurobiol Exp.*, *72*, 154 - 165.
- Benitez-King, G. (2000). El papel de la melatonina como modulador de la organización del citoesqueleto. *Salud Mental*, *23*, 18-22.
- Benitez-King G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*, *40*, 1-9.
- Bin-Jaliah, I., & Sakr, H. F. (2018). Melatonin ameliorates brain oxidative stress and upregulates senescence marker protein-30 and osteopontin in a rat model of vascular dementia. *Physiol Int*, *105*(1), 38-52.
- Bink, D. I., Ritz, K., Aronica, E., van der Weerd, L., & Daemen, M. J. (2013). Mouse models to study the effect of cardiovascular risk factors on brain structure and cognition. *J Cereb Blood Flow Metab*, *33*(11), 1666-1684.
- Borovac, J., Bosch, M., & Okamoto, K. (2018). Regulation of actin dynamics during structural plasticity of dendritic spines: Signaling messengers and actin-binding proteins. *Mol Cell Neurosci*, *91*, 122-130.
- Cameron, H. A., & Glover, L. R. (2015). Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev. Psychol*, *66*, 53-81.
- Cardinali, D. P., & Pevet, P. (1998). Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, *2*(3), 175-190.
- Cechetti, F., Pagnussat, A. S., Worm, P. V., Elsner, V. R., Ben, J., da Costa, M. S., . . . Netto, C. A. (2012). Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull*, *87*(1), 109-116.
- Cechetti, F., Worm, P. V., Pereira, L. O., Siqueira, I. R., & Netto, C. A. (2010). The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Braz J Med Biol Res*, *43*, 1178 - 1183.

- Cervantes, M., Morali, G., & Letechipia-Vallejo, G. (2008). Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res*, 45, 1-7.
- Cheung, R. T. (2003). The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res.*, 34, 153-160.
- De Butte, M., & Pappas, B. A. (2007). Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin supplementation. *Neurobiol Aging*, 28(2), 306-313.
- De Reviere, M. M., Tillet, Y., & Pelletier, J. (1991). Melatonin binding sites in the brain of sheep exposed to light or pinealectomized. *Neurosci. Lett*, 121, 17-20.
- Dent, E. W. (2017). Of microtubules and memory: implications for microtubule dynamics in dendrites and spines. *Mol Biol Cell*, 28(1), 1-8.
- Domínguez-Alonso, A., Ramírez-Rodríguez, G., & Benítez-King, G. (2012). Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures. *J Pineal Res*, 52, 427-436.
- Domínguez-Alonso, A., Valdés-Tovar, M., Solís-Chagoyán, H., & Benítez-King, G. (2015). Melatonin stimulates dendrite formation and complexity in the hilar zone of the rat hippocampus: participation of the Ca⁺⁺/Calmodulin complex. *Int J Mol Sci*, 16(1), 1907-1927.
- Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annu Rev Biophys*, 40, 169-186.
- Downie, N., & Heath, R. (1983). Basic Statistical Methods. *J. Am. Stat. Assoc*, 54, 816-853.
- Du, S. Q., Wang, X. R., Xiao, L. Y., Tu, J. F., Zhu, W., He, T., & Liu, C. Z. (2017). Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion? *Mol Neurobiol*, 54(5), 3670-3682.
- Farkas, E., Luiten, P. G., & Bari, F. (2007). Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.*, 54, 162-180.
- Fiala, J. C., Spacek, J., & Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 39(1), 29-54.
- Flores-Domínguez, L. (2016). Evaluación morfológica y funcional a largo plazo del efecto neuroprotector de la melatonina contra el daño producido por hipoperfusión cerebral crónica en ratas (Maestría en Ciencias de la Salud), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

- Galano, A., & Reiter, R. J. (2018). Melatonin and its metabolites vs oxidative stress: From individual actions to collective protection. *J Pineal Res*, 65(1), e12514.
- García-Chávez, D., González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Moralí, G., & Cervantes, M. (2008). Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neurosci Lett*, 448(1), 148-152.
- Gardiner, J., Overall, R., & Marc, J. (2011). The Microtubule Cytoskeleton Acts as a Key Downstream Effector of Neurotransmitter Signaling. *Synapse*, 65, 249–256.
- Ghasemi, E., Afkhami Aghda, F., Rezvani, M. E., Shahrokhi Raeini, A., Hafizibarjin, Z., & Zare Mehrjerdi, F. (2020). Effect of endogenous sulfur dioxide on spatial learning and memory and hippocampal damages in the experimental model of chronic cerebral hypoperfusion. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 31(3)
- Ginsberg, M. D. (2009). Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synaptic overview. *Stroke*, 40, 111-114.
- González-Burgos, I., Letechipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Moralí, G., & Cervantes, M. (2007). Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*, 423(2), 162-166.
- González-Burgos, I., Tapia-Arizmendi, G., & Feria-Velazco, A. (1992). Golgi Method without Osmium Tetroxide for the Study of the Central Nervous System. *Biotech Histochem*, 67, 288-296.
- Gorelick, P. B., Scuteri, A., Black, S. E., DeCarli, C., Greenberg, S. M., Iadecola, C., & Seshadri, S. (2011). Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 42, 2672-2713.
- Graves, A. R., Moore, S. J., Bloss, E. B., Mensh, B. D., Kath, W. L., & Spruston, N. (2012). Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron*, 76(4), 776-789.
- Guerrero, J. M., Carrillo-Vico, A., & Lardone, P. J. (2007). La Melatonina. *Investigación y ciencia*, 373, 30-38.
- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, 2(12), 880-888.

- Hu, W., An, C., & Chen, W. J. (2015). MolecularMechanoneurobiology: An Emerging Angle to Explore Neural Synaptic Functions. *Biomed Res. Int.*, 2015, 1-13.
- Iadecola, C. (2013). The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron*, 80, 844 -866.
- Iadecola, C., Hachinski, V., & Rosenberg, G. A. (2010). Vascular cognitive impairment: introduction. *Stroke*, 41(10 Suppl), 127-128.
- Imbesi, M., Uz, T., & Manev, H. (2008). Role of melatonin receptors in the effects of melatonin on BDNF and neuroprotection in mouse cerebellar neurons. *J Neural Transm (Vienna)*, 115(11), 1495-1499.
- Jellinger, K. A. (2007). The enigma of vascular cognitive disorder and vascular dementia. *Acta Neuropathol*, 113(4), 349-388.
- Jellinger, K. A. (2013). Pathology and pathogenesis of vascular cognitive impairment-a critical update. *Front Aging Neurosci*, 5, 1-19.
- Jia, H., Zhang, X. M., Zhang, B. A., Liu, Y., & Li, J. M. (2012). Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats. *Neurol Sci*, 33(5), 1063-1070.
- Jiménez-Rubio, G., Ortíz-López, L., & Benítez-King, G. (2012). Melatonin modulates cytoskeletal organization in the rat brain hippocampus. *Neurosci. Lett*, 511, 47– 51.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Agud, A., & Hernando Saudan, A. (2001). Principios de neurociencia *Aprendizaje y Memoria* (pp. 1227-1246). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
- Karasek, M. (2004). Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol*, 39(11-12), 1723-1729.
- Koehl, M., & Abrous, D. N. (2011). A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33(6), 1101-1114.
- Korobova, F., & Svitkina, T. (2010). Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 21, 165–176.
- Lai, K., & Ip, N. Y. (2013). Structural plasticity of dendritic spines: The underlying mechanisms and its dysregulation in brain disorders. *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 2257–2263.
- Leker, R., & Shohami, E. (2002). Cerebral ischemia and trauma different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev.*, 39, 55–73.

- Letchipía-Vallejo, G., López-Loeza, E., Espinoza-González, V., González-Burgos, I., Olvera-Cortés, M. E., Morali, G., & Cervantes, M. (2007). Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res*, *42*, 139-146.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, *74*, 1431-1568.
- Liu, J., Clough, S., & Dubocovich, M. (2017). Role of the MT1 and MT2 melatonin receptors in mediating depressive- and anxiety-like behaviors in C3H/HeN mice. *Genes Brain Behav.*, *16*, 546–553.
- Liu, J., Somera-Molina, K., Hudson, R., & Dubocovich, M. (2013). Melatonin potentiates running wheel-induced neurogenesis in the dentate gyrus of adult C3H/HeN mice hippocampus. *J Pineal Res.*, *54*, 222–231.
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S., Huntley, J., Ames, D., . . . Cohen-Mansfield, J. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet*, *17*, 1-62.
- Luna, G. (1960). *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (McGRAW-HILL Ed. 3 ed.).
- Maren, S., Phan, K. L., & Liberzon, I. (2013). The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*, *14*(6), 417-428.
- Martínez Celis-Rodríguez , E. (2018). Características citoarquitectónicas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica con tratamiento neuroprotector con melatonina. (Maestría en Ciencias de la Salud), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Menendez-Pelaez, A., & Reiter, R. J. (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.*, *15*, 59-69.
- Morgado, I. (2005). [The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances]. *Rev Neurol*, *40*(5), 289-297.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, *11*(1), 47-60.
- Ni, J., Ohta, H., Matsumoto, K., & Watanabe, H. (1994). Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res. Bull.*, *653*, 231-236.

- Ohta, H., Nishikawa, H., Kimura, H., Anayama, H., & Miyamoto, M. (1997). Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*, *79*(4), 1039-1050.
- OMS. (2018). DEMENTIA. Retrieved 20 DE JUNIO, 2018, from www.who.int/es/news-room/07-12-2017-dementia-number-of-people-affected-to-triple-in-next-30-years
- Otori, T., Katsumata, T., Muramatsu, H., Kashiwagi, F., Katayama, Y., & Terashi, A. (2003). Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *30*(4), 266-272.
- Ozacmak, V. H., Barut, F., & Ozacmak, H. S. (2009). Melatonin provides neuroprotection by reducing oxidative stress and HSP70 expression during chronic cerebral hypoperfusion in ovariectomized rats. *J Pineal Res*, *47*(2), 156-163.
- Pebet, M. (2002). Vascularización encefálica y fisiopatología de la isquemia cerebral. In Micheli F., Nogués M.A., Asconapé J.J. & Fernández-Pardial M.M. (Eds.), *Tratado de neurología clínica*, 396-408.
- Pulsinelli, W. A. (1985). Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*, *63*, 29-37.
- Pulsinelli, W. A., Jacewicz, M., Levy, D. E., Petito, C. K., & Plum, F. (1997). Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *835*, 187-193.
- Ramirez-Rodriguez, G., Ortiz-Lopez, L., Dominguez-Alonso, A., Benitez-King, G. A., & Kempermann, G. (2011). Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res*, *50*(1), 29-37.
- Reiter, R. J., & Tan, D. X. (2002). Role of CSF in the transport of melatonin. *J Pineal Res.*, *33*, 61.
- Rudnitskaya, E. A., Maksimova, K. Y., Muraleva, N. A., Logvinov, S. V., Yanshole, L. V., Kolosova, N. G., & Stefanova, N. A. (2015). Beneficial effects of melatonin in a rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Biogerontology*, *3*, 303–316.
- Rudy, J. W. (2009). Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learn Mem*, *16*(10), 573-585.
- Sarlak, G., Jenwitheesuk, A., Chetsawang, B., & Govitrapong, P. (2013). Effects of melatonin on the aging of the nervous system: neurogenesis and neurodegeneration. *J Pharmacol Sci.*, *123*, 9 – 24.

- Sarti, C., Pantoni, L., Bartolini, L., & Inzitari, D. (2002). Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci*, 203-204, 263-266.
- Scheff, S. W., Price, D. A., Schmitt, F. A., & Mufson, E. J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 27(10), 1372-1384.
- Scheuss, V., & Bonhoeffer, T. (2014). Function of dendritic spines on hippocampal inhibitory neurons. *Cereb Cortex*, 24(12), 3142-3153.
- Sholl, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* (87),387–406.
- Shukla, M., Sotthibundhu, A., & Govitrapong, P. (2020). Role of melatonin in regulating neurogenesis: Implications for the neurodegenerative pathology and analogous therapeutics for Alzheimer's disease. *Melatonin Research*, 3, 216-242.
- Singhanat, K., Apaijai, N., Chattipakorn, S., & Chattipakorn, N. (2018). Roles of melatonin and its receptors in cardiac ischemia–reperfusion injury. *Cell. Mol. Life Sci.*, 75, 4125-4149.
- Sizonenko, S. V., Bednarek, N., & Gressens, P. (2007). Growth factors and plasticity. *Semin Fetal Neonatal Med.*, 12, 241-249.
- SSA. (2018). demencia. Retrieved 20 de junio, 2018, from www.gob.mx/salud/prensa/152-se-incrementa-la-demencia-senil
- Sugawara, T., Fujimura, M., Noshita, N., Kim, G. W., Saito, A., Hayashi, T., . . . Chan, P. H. (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), 17-25.
- Sun, M. K. (2018). Potential Therapeutics for Vascular Cognitive Impairment and Dementia. *Curr Neuropharmacol*, 16(7), 1036-1044.
- Sweatt, J. D. (2003). Chapter 1 - Introduction: The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. In J. D. Sweatt (Ed.), *Mechanisms of Memory* (pp. 3-28). San Diego: Academic Press.
- Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., & Malpoux, B. (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*, 143(1), 84-90.
- Valdes-Tovar, M., Estrada-Reyes, R., Solis-Chagoyan, H., Argueta, J., Dorantes-Barron, A. M., Quero-Chavez, D., . . . Dubocovich, M. L. (2018). Circadian modulation of neuroplasticity

- by melatonin: a target in the treatment of depression. *Br J Pharmacol* 175(16), 3200-3208.
- Venkat, P., Chopp, M., & Chen, J. (2015). Models and mechanisms of vascular dementia. *Exp Neurol*, 272, 97-108.
- Vicente, E., Degerone, D., Bohn, L., Scornavaca, F., Pimentel, A., Leite, M. C., . . . Gonçalves, C. A. (2009). Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res*, 1251, 204-212.
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 1(2), 848-858.
- Wakade, C. G., Mahadik, S. P., Waller, J. L., & Chiu, F. C. (2002). Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *J Neurosci Res*, 69(1), 72-79.
- Whissell, P., Rosenzweig, S., Lecker, I., Wang, D. S., Wojtowicz, J., & Orser, B. (2013). γ -aminobutyric acid type A receptors that contain the δ subunit promote memory and neurogenesis in the dentate gyrus. *Ann Neurol*, 74, 611-621.
- Wible, C. (2013). Hippocampal physiology, structure and function and the neuroscience of schizophrenia: a unified account of declarative memory deficits, working memory deficits and schizophrenic symptoms. *Behavioral sciences (Basel, Switzerland)*, 3(2), 298-315.
- Wiendl, H., Elger, C., Förstl, H., Hartung, H. P., Oertel, W., Reichmann, H., & Schwab, S. (2015). Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ("Neuroprotection"). *Neurotherapeutics*, 12, 449-454.
- Wolters, F. J., & Ikram, M. A. (2019). Epidemiology of Vascular Dementia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(8), 1542-1549.