



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

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

TESIS

**Características citoarquitectónicas de las neuronas
piramidales de la región CA1 del hipocampo en ratas
sometidas a hipoperfusión cerebral crónica con tratamiento
neuroprotector con melatonina**

PRESENTA:

**Médico Veterinario y Zootecnista
Elena Martínez Celis Rodríguez**

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

DIRECCIÓN DE TESIS:

**Doctora en Ciencias Biomédicas
Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo**



Morelia, Michoacán, México
Agosto 2018

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

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Recibió beca del CONACyT
Durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

El proyecto fue respaldado por el Coordinación de Investigación Científica (CIC)
en el 2016

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:

Médico Veterinario y Zootecnista Elena Martínez Celis Rodríguez

Doctor en Ciencias Biomédicas
José Miguel Cervantes Alfaro

Maestro en Ciencias de la Salud
Manuel López Rodríguez

Doctora en Ciencias Bioquímicas
Martha Eva Viveros Sandoval

Maestra en Farmacología Básica
Dafne García Chávez



Dirección de tesis:

Doctora en Ciencias Biomédicas
Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Colaboradores:

Doctora en Ciencias del Comportamiento
María Esther Olvera Cortes
Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), IMSS

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)

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia donde recibí mi formación profesional.

De manera especial al Laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez: a mí directora de tesis DC. Graciela Letechipía Vallejo por compartir su conocimiento, sus experiencias que han sido de gran ayuda durante estos dos años, al DC. José Miguel Cervantes Alfaro por sus enseñanzas y recomendaciones que facilitaron varios aspectos del proyecto. A mis compañeros de laboratorio por su completo apoyo.

A mi comité tutorial por haber guiado a buen término el presente trabajo M en C Manuel López Rodríguez, D en C José Miguel Cervantes Alfaro, D en C Martha Eva Viveros Sandoval, M en Farmacología Básica Daphne García Chávez.

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

A mis compañeros de generación por haber compartido conmigo esta experiencia.

VI

DEDICATORIA

A mi familia, por apoyar mis decisiones, por creer en mí, por ser mi todo. A mi madre y a mi padre por siempre tener la disposición de auxiliarme. A mi hermano de quien he aprendido cosas que no se adquieren en los libros: Arturo Antonio Martínez Celis Rodríguez.

VII

ABREVIATURAS

AD: Enfermedad de Alzheimer

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CA1: Cuerno de Ammon región 1

CCH: Hipoperfusión cerebral crónica

CBF: Flujo sanguíneo cerebral

COX-2: Ciclooxygenasa 2

GPx: Glutación peroxidasa

GSK-3: Glicógeno sintasa cinasa 3

IL: Interleucina

LTP: Potencialización a largo plazo

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

MWM: Laberinto acuático de Morris

PSD: Densidad post sináptica

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

VaD: Demencia vascular

2VO: Oclusión bilateral de arterias carótidas comunes

WM: Materia blanca

VIII

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Características del neurocitoesqueleto	4
Características de las espinas dendríticas y su función	6
Demencia Vascular (VaD)	9
Fisiopatología de la VaD	10
Fisiopatología de la hipoperfusión cerebral	11
Modelo experimental 2VO para CHH	13
Características de la melatonina como neuroprotector	15
Efectos de la melatonina sobre el neurocitoesqueleto en VaD	17
Técnica de impregnación argéntica de Golgi	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
General	22
Específicos	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Animales y métodos experimentales	23
Modelo experimental de hipoperfusión cerebral crónica mediante oclusión de las arterias carótidas	23
Evaluación de la citoarquitectura, utilizando el método de impregnación argéntica de Golgi	25
RESULTADOS	27
Efectos de la melatonina en la arborización dendrítica de neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo en ratas sometidas a CHH.	27
Efectos de la melatonina en el número y forma de espinas dendríticas en neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo en ratas sometidas a CHH.	29
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIÓN	37
REFERENCIAS	38



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



**Características citoarquitectónicas de las
neuronas piramidales de la región CA1
del hipocampo en ratas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica con
tratamiento neuroprotector con melatonina**

RESUMEN

Introducción. La demencia es un problema de salud asociado al proceso de envejecimiento, en el que ciertas condiciones fisiopatológicas inducen daño en estructuras cerebrales vulnerables, dando lugar al deterioro progresivo y a la pérdida de funciones cognitivas. Una reducción moderada pero persistente en el flujo sanguíneo cerebral causa deterioro de la memoria y contribuye al desarrollo y progresión de la demencia. La oclusión permanente y bilateral de las arterias carótidas comunes en ratas (2VO) es un procedimiento experimental adecuado para modelar la hipoperfusión cerebral crónica (CHH), como ocurre en el envejecimiento humano y la enfermedad de Alzheimer. La CHH provoca daño, alteración funcional y muerte neuronal en las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia, entre las que destaca el hipocampo y en particular las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo, que están directamente involucradas en la integración de funciones cognitivas. **Objetivos.** Caracterizar la citoarquitectura de las neuronas piramidales del hipocampo de ratas, tras un evento de CHH con y sin tratamiento con melatonina. **Material y Métodos.** Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a los lineamientos establecidos en normas internacionales y nacionales. Se utilizaron cerebros de ratas Sprague Dawley macho distribuidas en tres grupos; control (SHAM n=6); (2VO+MEL n=6), ratas que se sometieron a un procedimiento de CHH mediante el método 2VO, seguidas de administración de melatonina (5mg/ml/IV) mediante bombas osmóticas ALZET (10µl/h, 7 días, 2ml) implantadas subcutáneamente, o vehículo (2VO+VEH n=6). De cada cerebro se tomaron cortes de hipocampo dorsal que fueron tratados por el método de impregnación argéntica de Golgi para el análisis de arborización dendrítica mediante el método de Sholl, y caracterización del número y forma de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales del segmento CA1 del hipocampo. **Resultados.** Se observó preservación de la cantidad y morfología de las espinas dendríticas, así como conservación de la arborización en el grupo tratado con melatonina en comparación con el grupo SHAM. **Conclusión.** El tratamiento con melatonina conservó la citoarquitectura de las neuronas, comprobando su efecto neuroprotector.

Palabras clave: hipoperfusión cerebral crónica, demencia vascular, melatonina, hipocampo, espinas dendríticas.



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



SUMMARY

Introduction. Dementia is a health problem associated with the aging process, in which certain physiopathological conditions induce damage in vulnerable brain structures, leading to progressive deterioration and loss of cognitive functions. A moderate but persistent reduction in cerebral blood flow causes memory impairment and contributes to the development and progression of dementia. Permanent and bilateral occlusion of the common carotid arteries in rats (2VO) is an experimental procedure suitable as a model for chronic cerebral hypoperfusion (CHH), as it occurs in human aging and Alzheimer's disease. The CHH causes damage, functional alteration and neuronal death in brain structures most vulnerable to ischemia, such as the hippocampus and in particular the pyramidal neurons of the Ammon horn, which are neurons directly involved in the integration of cognitive functions.

Objective. To characterize the cytoarchitecture of the pyramidal neurons of the hippocampus of rats, after an CHH event with and without melatonin treatment.

Material and methods. The experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines established in international and national standards. Brains of male Sprague Dawley rats distributed in three groups were used; control (SHAM n = 6); (2VO + MEL n = 6), rats that underwent a CHH procedure using the 2VO method, followed by administration of melatonin (5mg / ml / IV) by using ALZET osmotic pumps (10µl / h, 7 days, 2ml) implanted subcutaneously, or vehicle (2VO + VEH n = 6). From each brain, dorsal hippocampal cuts were taken and treated by the Golgi silver impregnation method for the analysis of dendritic arborization using the Sholl method, and characterization of the number and shape of the dendritic spines of the pyramidal neurons of the CA1 segment of the hippocampus. **Results.** Preservation of the number and morphology of the dendritic spines was observed, as well as conservation of the arborization in the group treated with melatonin in comparison with the SHAM group. **Conclusion.** The treatment with melatonin conserved the cytoarchitecture of the neurons, proving its neuroprotective effect.

Key words: chronic cerebral hypoperfusion, vascular dementia, melatonin, hippocampus, dendritic spines.

INTRODUCCIÓN

La demencia es un problema de salud asociado al proceso de envejecimiento, en el que ciertas condiciones fisiopatológicas inducen daño en estructuras cerebrales específicas, tales como el hipocampo y la corteza prefrontal, dando lugar al deterioro progresivo y eventualmente a la pérdida de funciones cognoscitivas, lo que la coloca como una de las principales causas de discapacidad y dependencia de las personas mayores en todo el mundo(1, 2). Además, la dependencia funcional en personas con demencia representa una carga, no sólo para el individuo que la sufre, sino también para sus cuidadores, familiares y la sociedad en su conjunto (3, 4).

La demencia vascular (VaD) es la segunda forma más común de demencia, después de la enfermedad de Alzheimer (AD), y afecta principalmente a la población de adultos mayores (5), ya que su incidencia aumenta exponencialmente después de los 65 años de edad (6). Otros factores de riesgo para el desarrollo de VaD incluyen sedentarismo, hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, y obesidad (7).

La VaD es una enfermedad progresiva causada por una reducción del flujo sanguíneo cerebral, y afecta las habilidades cognitivas, especialmente las funciones ejecutivas (5). Los pacientes con VaD pueden mostrar síntomas tales como pensamiento ralentizado, olvido, depresión, ansiedad, desorientación y pérdida de funciones cognoscitivas tales como resolución de problemas, memoria de trabajo, pensamiento, razonamiento, juicio, planeación y ejecución de tareas, con una notable reducción del rendimiento cuando la tarea se complica (5).

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud ha identificado a poco más de 35 millones de personas en el mundo que viven con demencia grave e incapacitante y este número aumenta anualmente con aproximadamente 7 millones de nuevos casos de demencia. Se espera que para el año 2050 este número se triplique (3). El envejecimiento poblacional está teniendo un profundo impacto en la aparición de la epidemia global de demencia (8). La transición a poblaciones envejecidas representa un reto para la sociedad en muchos aspectos, entre ellos los servicios

de salud. La salud en los ancianos es un determinante crucial para definir el balance entre costos y beneficios asociados al envejecimiento de la población(3).

Con el aumento de la expectativa de vida y una población de adultos mayores creciente, aunado a una mayor incidencia de diversos factores de riesgo como hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes, síndrome metabólico e infarto, es recomendable el desarrollo de estrategias terapéuticas para la VaD (5).

La neuroprotección se define como cualquier estrategia, o combinación de estrategias, que antagoniza, interrumpe o detiene la progresión de eventos bioquímicos y moleculares perjudiciales, que de lo contrario, avanzarían hacia un daño irreversible(9). Diversos estudios han destacado la efectividad de la melatonina en neuroprotección. La melatonina y sus metabolitos son antioxidantes que actúan como atrapadores directos neutralizando el efecto de radicales libres, característicos de este padecimiento(10, 11) y como un antioxidante indirecto (12), además tiene acciones moduladoras del citoesqueleto, y también actúa como antiinflamatorio (13). Estas características, aunadas a su propiedad anfipática, baja toxicidad y distribución amplia en el organismo, hacen de la melatonina una alternativa atractiva como molécula neuroprotectora (14).

ANTECEDENTES

El cerebro es particularmente vulnerable a daños por isquemia, las células precisan de flujo sanguíneo constante para mantener la actividad metabólica debido a que no dispone de depósitos energéticos(15). Una interrupción completa del flujo sanguíneo por tan sólo 5 minutos desencadena la muerte de neuronas vulnerables en varias regiones cerebrales(16), siendo las neuronas de la región CA1 del hipocampo y la células de Purkinje del cerebelo las más vulnerables.(17-19) El sistema nervioso central (SNC) es altamente susceptible a especies reactivas de oxígeno porque: 1) Es abundante en ácidos grasos, que son sensibles a la peroxidación; 2) Carece de mecanismos antioxidantes importantes; 3) Consume

una gran cantidad de oxígeno(20). Se considera al hipocampo, y en particular las neuronas de la región CA1, como el área de estudio ideal para evaluar los daños ocasionados por el estrés oxidativo en el sistema nervioso central(17).

El hipocampo es una estructura cerebral bilateral subcortical involucrada en la formación, organización y recuperación de la memoria. Anatómicamente, está organizado en el 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(21). El cuerno de Ammon se subdivide en las regiones CA1, CA2, CA3 e hillus (21, 22). La función del hipocampo en la memoria declarativa está en unión por múltiples entradas que crean y permiten 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 distribuída en diversas regiones corticales (22). Una activación aberrante del hipocampo podría afectar las regiones corticales perceptuales; especialmente aquellas que muestran una gran conectividad funcional dentro del sistema hipocampal(22)

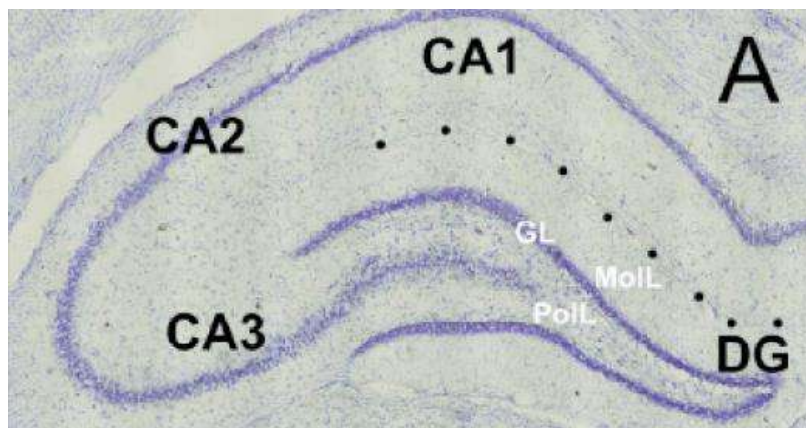


Figura 1. Regiones del cuerno de Ammon del hipocampo. DG: Giro Dentado.

Tomada de Benítez-King G, Domínguez-Alonso A, Ramírez-Rodríguez G.

Neurocytoskeletal Protective Effect of Melatonin: Importance for Morphofunctional Neuronal Polarization. The Open Neuroendocrinology Journal. 2010;3:105-11.

En la región CA1 el principal tipo de célula es la neurona piramidal excitatoria. Estas neuronas integran la información espacial, contextual y emocional, transmiten del hipocampo hacia otras varias regiones del cerebro. Las células piramidales de las regiones CA1 y del subículo realizan esta función 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(21). 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(23).

Características del neurocitoesqueleto

Desde hace 5 décadas la tubulina se ha identificado como una proteína globular que forma parte de los microtúbulos. Los polímeros de tubulina, o microtúbulos, en conjunto con los microfilamentos de actina y filamentos intermedios, forman parte del citoesqueleto, los cuales proveen estabilidad y dinámica a la célula. Las neuronas son excepcionales en el uso de sus microtúbulos para generar una morfología altamente polarizada que consiste en axones largos y arborizaciones dendríticas que forman un campo receptivo a impulsos electroquímicos. Los microtúbulos axonales están polarizados y confieren la rigidez necesaria para el transporte a larga distancia, mientras que los microtúbulos dendríticos muestran polaridad mixta y tienen influencia en procesos como la arborización y señalización a las espinas dendríticas. (24)

La polaridad de los microtúbulos asegura el transporte direccional de las moléculas en las neuronas y ayuda a establecer la especificación compartimental de la

neurona hacia el axón y la dendrita, una organización que es esencial para la transmisión sináptica (24).

Las MAPs (proteínas asociadas a microtúbulos) contribuyen a la organización normal citoesquelética y la arborización dendrítica, ambas esenciales para la función neuronal normal y formación de redes. Una disminución en la densidad de espinas dendríticas y reducción en la arborización dendrítica están ampliamente asociadas con trastornos neurológicos, incluyendo discapacidad intelectual, depresión y esquizofrenia. Típicamente, la atrofia ocurre en respuesta a estrés crónico en regiones como el hipocampo y la corteza prefrontal, que juegan roles importantes en la homeostasis del estado de ánimo (24).

La pérdida de espinas dendríticas está asociada a una reducción MAP2, sugiriendo un rol en la homeostasis microtubular en regular la estabilidad de la cabeza de las espinas. Es importante destacar en este contexto que la MAP2 influye en la actividad de CREB al actuar como un ancla para PKA en las dendritas. CREB regula la expresión de BDNF (entre otros), el cual juega un rol central en el mantenimiento de la salud sináptica (24).

Dado a que MAP2 es una proteína abundante en el cerebro que es fosforilada por involucradas de alguna manera en desordenes psiquiátricos, parece probable que la fosforilación aberrante de MAP2 pueda contribuir en parte, al desarrollo de la enfermedad. Notablemente, la calcio calmodulina cinasa II (CAMKII) y la glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) están ambas implicadas en la disfunción psiquiátrica. Los genes que codifican a las cinasas, que están asociados a la esquizofrenia, convergen en una vía que regula la estabilidad de los microtúbulos, sugiriendo que la pérdida de la homeostasis citoesquelética puede contribuir al desarrollo de la patología (24).

Características de las espinas dendríticas y su función

Las espinas dendríticas son prolongaciones pequeñas que se localizan a lo largo de la dendrita de diversos tipos de neuronas. Son los principales sitios postsinápticos de las sinapsis excitatorias y pueden tener apariencia diversa. Basadas en su forma y en el tamaño relativo de su cabeza y cuello, se clasifican en tres grandes categorías: espinas en hongo (mushroom spines), espinas delgadas (thin spines) y espinas cortas (stubby spines) (figura 2) (25, 26).

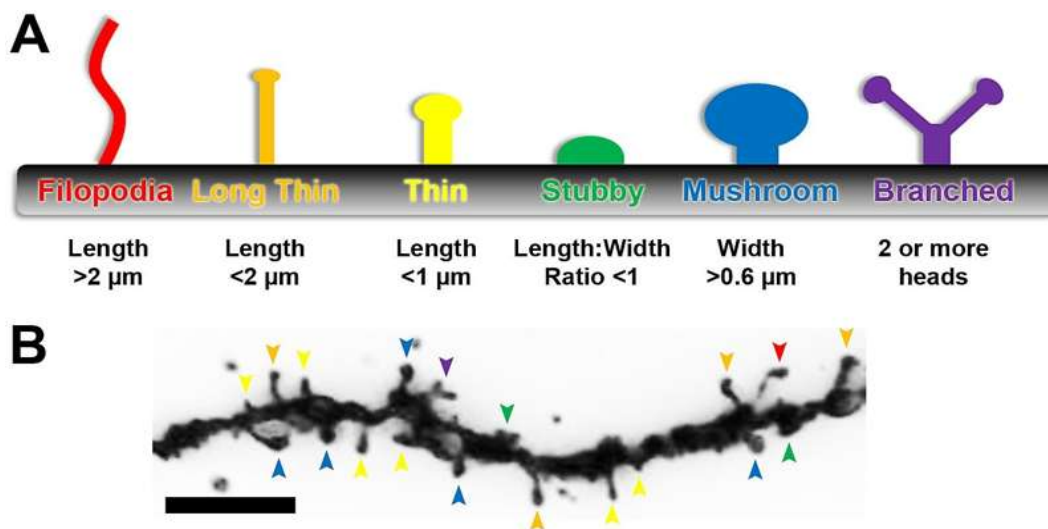


Figura 2. Morfología y criterios de diferenciación de los diferentes tipos de espinas dendríticas. Tomada de Risher WC, Ustunkaya T, Alvarado JS, Eroglu C. Rapid golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines.

PLoS ONE. 2014 (27)

Las espinas se consideran delgadas (thin) si el largo es mayor al diámetro del cuello, y si el diámetro de la cabeza y el cuello son similares. Las de forma de hongo (mushroom) su cabeza tiene un diámetro mayor al diámetro del cuello. Las espinas cortas (stubby) tienen una longitud y ancho similares (28). Las filopodias dendríticas son las estructuras precursoras de las espinas dendríticas.(29) Se

caracterizan por ser largas, muy móviles, delgadas, sin cabeza y libres de densidad postsináptica (PSD). Debido a que son altamente móviles, exploran el espacio alrededor de las dendritas en busca de sitios de acoplación adecuados. Estos cambios en la morfología de las espinas se han relacionado con cambios en la función sináptica; las formas inmaduras, incluyendo las espinas delgadas, son muy móviles, por lo que se ha sugerido que son auxiliares en la iniciación del contacto sináptico. En contraste, las espinas maduras en hongo, son mucho más estables y contienen una abundante cantidad de receptores a neurotransmisores(27, 30). Las filopodias hacen contactos repetidamente con los axones, sin embargo, sólo una pequeña cantidad de estos contactos se estabilizan. Las filopodias tienen la característica de ser selectivas en cuanto a su acoplamiento, y no se realizan contactos estables con axones inhibitorios. Una vez que se ha hecho el contacto, la filopodia cambia morfológica y funcionalmente a espina dendrítica, acortando su cuello mediante la despolimerización de la F-actina (30). Se ha sugerido que las modificaciones morfológicas en la estructura de las espinas puede jugar un rol importante en la plasticidad a corto plazo. Se considera que las espinas móviles y delgadas están relacionadas con el aprendizaje, mientras que las espinas más maduras en forma de hongo son las responsables de mantener las redes neuronales y memoria a largo plazo (25, 26, 28)

En modelos experimentales se ha observado que las espinas dendríticas se forman en etapas tempranas de la vida postnatal, maduran de acuerdo al desarrollo del animal y se mantienen en la etapa adulta. Las sinapsis dentro del hipocampo pasan por distintos cambios estructurales en tamaño y forma después de la potencialización a largo plazo (long-term potentiation, LTP) (30).

Las espinas incrementan la superficie de la membrana por lo tanto contribuyen a establecer más contactos con las terminales axonales. Sin embargo, no son sólo un componente de unión, sino son esencialmente estructuras dinámicas que pueden exhibir varias modificaciones incluyendo cambios en su número, tamaño,

forma y motilidad. Así, cualquier cambio en la estructura de las espinas puede causar alteraciones en la transmisión sináptica y en la plasticidad(25, 26).

Las filopodias y las espinas son similares en términos de tienen pequeñas protrusiones (0.5 – 0.8 μm) en las vainas dendríticas y que carecen de microtúbulos y de filamentos intermedios (31)

In vivo, las espinas dendríticas intercambian rápidamente entre los diferentes tipos de espinas, en otras palabras, la morfología de las espinas observadas en microscopio son fotografías de cambios morfológicos dinámicos.

Las espinas dendríticas continuamente cambian su morfología debido a la modulación de la dinámica de la actina, y de la actividad de los receptores a glutamato (31).

La dinámica de la actina en las espinas dendríticas involucra la formación de nuevos filamentos de actina, que son propuestos en un modelo de nucleación dendrítica. Así, la dinámica de actina en las dendritas está regulada por varios mecanismos moleculares que se originan por señales en la superficie celular. Numerosas proteínas ancladas a actina han sido identificadas en las espinas dendríticas, tales como Arp2/3, cortactina, ADF/cofilina, profilina, gelsolina, drebrina y neuroabina (31).

Diversas vías de señalización inducen la reorganización de la F-actina al modificar las proteínas ancladas a la actina, resultando en cambios en las espinas dendríticas. Sin embargo, no se ha aclarado por completo que proteínas participan en estas vías, ni que tipos de cambios organizacionales están involucrados predominantemente en la morfogénesis de las espinas(31). La morfología de las espinas es determinada por un número de factores, el mejor establecido es el citoesqueleto de actina. Las espinas y sus precursores filopodias son ricos en F-actina y muestran una motilidad sustancial. Muchas señales, tales como las señales de orientación extracelular y los factores de crecimiento que controlan la morfología dendrítica por la vía de las Rho GTPasas, una familia de proteínas altamente

reconocida que vinculan las señales extracelulares a controlar el citoesqueleto de actina. La activación de los diferentes miembros de la familia de los Rho pueden modificar la forma de las espinas y pueden estimular ya sea la extensión o la reducción de la espina (32).

Demencia Vascular (VaD)

La VaD es la segunda forma más común de demencia, después de la enfermedad de Alzheimer (AD), que afecta a la población de adultos mayores. La VaD es una enfermedad progresiva causada por una reducción del flujo sanguíneo cerebral, y afecta las habilidades cognitivas, especialmente las funciones ejecutivas (5).

Los pacientes con VaD pueden sufrir de pensamiento ralentizado, olvido, depresión, ansiedad, desorientación y pérdida de funciones cognoscitivas tales como resolución de problemas, memoria de trabajo, pensamiento, razonamiento, juicio, planeación y ejecución de tareas, con rendimiento disminuido cuando la tarea se complica. Con una mayor expectativa de vida, y un número creciente de población de adultos mayores, los factores de riesgo como la hipertensión, enfermedad cardiovascular, diabetes, síndrome metabólico e infarto, demanda el desarrollo de tratamientos para la VaD (5).

La pérdida prominente de la memoria no es el deterioro cognitivo más importante en VaD pero sí un elemento central u obligatorio. Una fracción sustancial de los casos presenta un déficit severo en la función ejecutiva, función del lenguaje y razonamiento visoespacial con preservación relativa del recuerdo tardío (34, 35).

Considerando la heterogeneidad de la presentación clínica de la VaD, el perfil neuropsicológico también debe ser diferente. Ningún patrón de déficit cognitivo específico define la demencia vascular. La atención, la función ejecutiva, el lenguaje, las habilidades visoespaciales, la memoria y el aprendizaje se pueden afectar en grado variable y en combinaciones acorde al tamaño y localización de la lesión cerebrovascular (34).

Fisiopatología de la VaD

En VaD, la hipoperfusión crónica y los eventos tromboembólicos llevan a una disminución del flujo sanguíneo cerebral (CBF), hipoxia, estrés oxidativo y desencadenan una respuesta inflamatoria. La materia blanca periventricular, los ganglios basales y el hipocampo son altamente susceptibles a las lesiones originadas por hipoperfusión. La disrupción del circuito prefrontal-ganglios basales induce déficits cognoscitivos, los cuales son típicos de la VaD (5).

El estrés oxidativo producido por la hipoxia lleva a disfunción mitocondrial, daño neuronal y apoptosis. El estrés oxidativo es un desbalance entre la proporción de antioxidantes y radicales libres, resultando en daño al endotelio vascular, daño en la glia y neuronas, lo que lleva a un desacoplamiento neurovascular y una reducción adicional del CBF. El exceso de especies reactivas de oxígeno altera la función mitocondrial e induce hipoxia y estrés oxidativo adicionales. La hipoxia cerebral puede llevar a un aumento de factores vasculares inflamatorias, así como desencadenar disfunción endotelial, vascular y fugas en la barrera hematoencefálica (5).

Diversos factores de inflamación se liberan al producirse daño por hipoxia, como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y la degradación microvascular de la barrera hematoencefálica, así como la permeabilidad de esta a diversos factores como interleucinas (IL-1, IL-6), MMPs, TNF α , TRL4 y la proteína C reactiva. Al entrar al cerebro, estos factores exacerbaban el daño a la WM, la desmielinización, pérdida axonal y degeneración de oligodendrocitos, causando neurodegeneración y muerte celular. La WM es altamente susceptible a daño inducido por hipoxia debido a su suministro limitado de flujo sanguíneo y flujo colateral mínimo en estructuras internas. En la VaD, el daño a la materia blanca (WM) surge primariamente de la desmielinización que esta atribuida el daño de oligodendrocitos ocasionado por la hipoxia. La interrupción de la neurogénesis, la proliferación de las células progenitoras neuronales, la plasticidad sináptica y la densidad de espinas

dendríticas ocurren como resultado de la cascada inflamatoria en el hipocampo. Así, los déficits de aprendizaje y memoria sobrevienen (5)

Fisiopatología de la hipoperfusión cerebral

El efecto lesivo de la isquemia cerebral se presenta primariamente como resultado de la perturbación del metabolismo energético celular. La reducción del aporte de oxígeno desencadena el metabolismo anaerobio de la glucosa, que conduce a la producción de ácido láctico y a la acidosis tisular. Así mismo, la hipoxia ocasiona el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. En consecuencia, disminuye la producción de ATP y otros nucleótidos energéticos, con lo que se reduce la energía disponible. El descenso de la producción de energía lleva a la abolición de los mecanismos de síntesis y reparación de macromoléculas, y aumentan los procesos de degradación. Por otro lado, los canales de membrana dependientes de ATP pierden la capacidad de mantener la homeostasis iónica en contra del gradiente, por lo que se produce la salida de K^+ del interior hacia el espacio intersticial y el consecuente aumento citosólico de Na^+ y de agua, osmóticamente obligada, así como de Ca^{2+} ocasionando edema e incapacidad de mantener el potencial de membrana, por lo que se desencadena una despolarización anóxica y, por consecuencia, la pérdida de la capacidad de mantener el potencial de membrana(15). Los procesos de isquemia, hipoperfusión y algunas toxinas determinan un aumento de la concentración de calcio en el citosol, inicialmente por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y por un aumento en el flujo a través de la membrana celular(36). La liberación masiva de neurotransmisores y la elevación de la concentración del Ca^{2+} intracelular tras un evento de isquemia producen perturbaciones en las rutas de señalización intracelulares que pueden contribuir a la perpetuación del daño y muerte celular. La proteína quinasa C (PKC) es rápidamente activada como una respuesta común por varios órganos, incluyendo el cerebro, el riñón y el corazón, durante el evento isquémico, y puede

favorecer la excitotoxicidad neuronal al incrementar la liberación vesicular de glutamato y así incrementando la excitabilidad neuronal(15, 16).

La señalización de muerte celular en la mitocondria ha sido recientemente demostrada con el evento isquémico del cerebro y liberación del citocromo C (Cyt C), un proteína de membrana hidrosoluble de la mitocondria esencial en la cadena respiratoria. El cyt C se trasloca de la mitocondria pasando al compartimiento citosólico en neuronas de la región CA1 del hipocampo tras un evento isquémico en ratas(37). La liberación del citocromo C hacia el citosol es un fuerte indicador de que el proceso de apoptosis se ha activado(16, 18, 37). El proceso de muerte celular por isquemia incluye la inhibición del transporte de electrones, disminuyendo el ATP y el pH intracelular con acumulación de lactato, aumento del Ca^{2+} intracelular, liberación de neurotransmisores, como el glutamato, incremento del ácido araquidónico y activación de genes que llevan a síntesis de citosinas, síntesis de enzimas involucradas en la producción de radicales libres y acumulación de leucocitos. Estos cambios llevan a la activación de perpetradores; estos son los radicales libres y su producto, el peroxinitrito, las acciones del aumento de las calpains dependientes de Ca^{2+} , y la actividad de las fosfolipasas (16, 18). Este fenómeno está producido por el fallo en el flujo de iones dependientes de energía, junto con la interrupción de los gradientes iónicos de la membrana celular, producidos por la falta de aporte de oxígeno y glucosa(18, 38).

Las especies reactivas de oxígeno que se acumulan anormalmente después del evento isquémico, son mediadores del daño del tejido. La activación de las citosinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), expresión incrementada de ciclooxigenasa-2 (COX-2), contribuyen al daño neuronal a través de reacciones inflamatorias en cascada por radicales libres(16, 18).

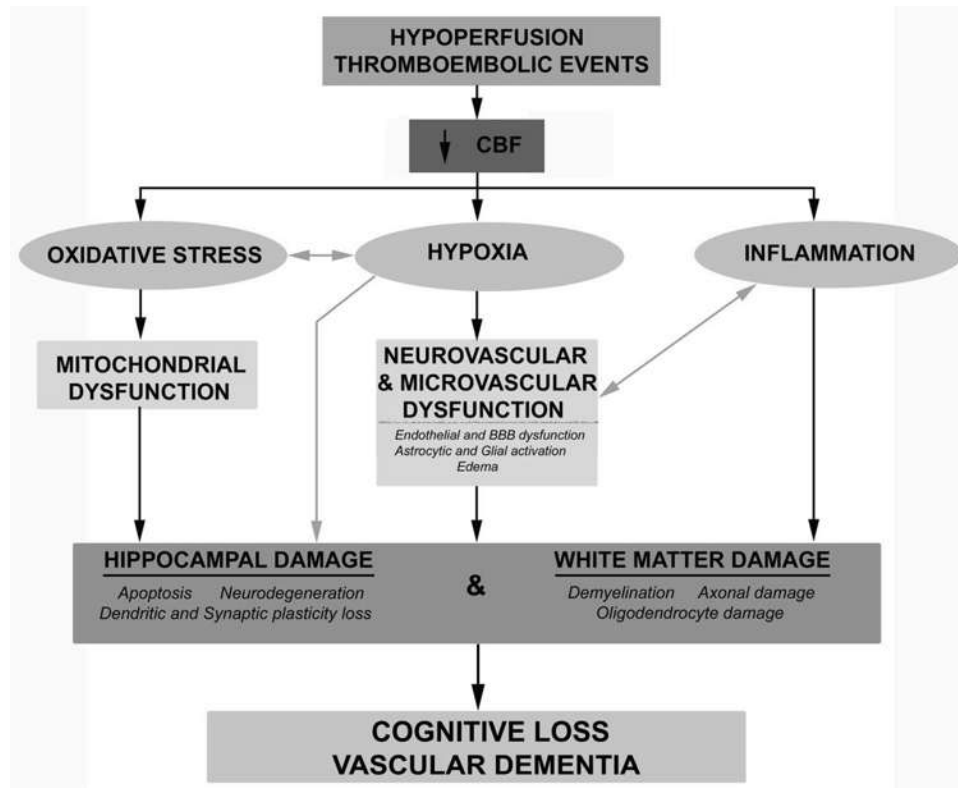


Figura 3. Resumen de los mecanismos involucrados en la patogénesis de VaD. Tomada de Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia. *Experimental Neurology* 2015;272:97-108.

Modelo experimental 2VO para CHH

Para reproducir la hipoperfusión cerebral crónica, como ocurre en humanos durante los procesos de envejecimiento y trastornos de demencia, se sugiere el uso de un modelo de oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas en ratas (2VO)(39, 40). La rata es una especie idónea para este propósito ya que el círculo de Willis recibe flujo incesante (pero reducido) después del comienzo de 2VO(39-41) Los cambios fisiopatológicos en este modelo incluyen daño a la WM, disrupción del flujo sanguíneo cerebral, daño neuronal en la corteza y en el hipocampo, respuestas inflamatorias incrementadas y gliosis primaria en la WM (5) y mantiene un estado

crónico de hipoglucemia moderada, una condición fisiopatológica muy parecida a la CHH presente en el envejecimiento humano y la demencia (42). En ratas con 2VO, la oclusión de los vasos es un procedimiento permanente, por lo que una lesión de reperfusión (como resultado de una recuperación instantánea a la perfusión) no ocurre (40).

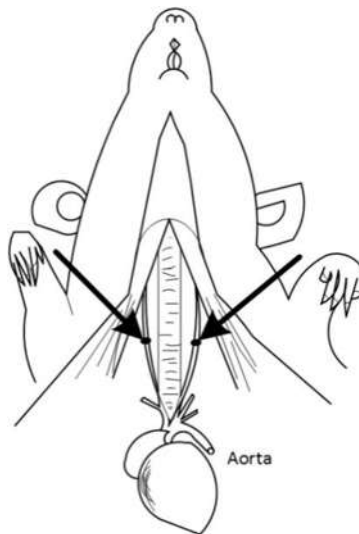


Figura 4. Esquema del modelo experimental 2VO. Las flechas indican las arterias carótidas comunes y el lugar de oclusión. Tomada de Farkas, E. and Luiten, P. G. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. Prog Neurobiol 64(6): 575-611.

Debido a que las alteraciones cognitivas son centrales en casos de demencia, existen diferentes pruebas funcionales disponibles para evaluar los resultados 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; se ha reportado déficits y latencias prolongadas en el laberinto acuático de Morris; desempeño pobre

en el laberinto elevado en T, laberinto en Y y en la prueba de reconocimiento de objetos (5).

La reconstrucción de una condición patológica en modelos animales es una adecuada aproximación a la desintegración de las relaciones causales. Por esta razón, la oclusión de 2VO en ratas se ha establecido como un procedimiento para investigar los efectos de la hipoperfusión cerebral crónica sobre la disfunción cognitiva y procesos neurodegenerativos (40, 41).

Características de la melatonina como neuroprotector

La melatonina, conocida también como N-Acetil-5-metoxitriptamina, es una hormona lipofílica sintetizada por la glándula pineal y otros órganos en los mamíferos. Existe evidencia que la melatonina actúa mediante diferentes mecanismos para reducir el estrés oxidativo(10). Esta hormona cruza libremente la barrera hematoencefálica, lo que la hace un agente neuroprotector atractivo (43).

La síntesis de melatonina no es constante a lo largo de la vida. En humanos, su producción rítmica empieza desde los tres o cuatro meses de edad. A partir de ahí, aumenta de forma gradual hasta alcanzar su máximo pico entre los ocho y los diez años. Luego, coincidiendo con los cambios puberales, la producción disminuye. En el individuo adulto, la concentración nocturna de melatonina va descendiendo paulatinamente hasta la vejez, de manera que después de los setenta años los niveles de la hormona no superan el 10% de los prepuberales(44).

La melatonina, es una molécula anfipática, propiedad que le permite atravesar las membranas celulares con facilidad y puede concentrarse dentro de organelos incluyendo la mitocondria(10, 44).

La melatonina, así como sus metabolitos, son atrapadores directos y efectivos de radicales libres, con la habilidad de remover el oxígeno singulete (1O_2), el radical anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) y el radical producto de la lipoperoxidación (LOO^{\bullet}). También actúa como un

antioxidante indirecto al incrementar la eficiencia del transporte de electrones, al disminuir el estrés oxidativo en la mitocondria, manteniendo la producción de ATP, y al activar las enzimas antioxidantes más importantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), y la glutatión peroxidasa (GPx). Además de sus acciones sobre los radicales libres, la melatonina también posee efectos antiinflamatorios al inhibir la óxido nítrico sintasa (NOS), la ciclooxigenasa-2 y la infiltración neutrofílica(12, 45, 46).

La actividad contra el daño oxidativo y capacidad atrapadora de radicales libres de la melatonina es superior a las vitaminas C y E. Asimismo la eficiencia antioxidante de la melatonina se ve acrecentada debido al hecho de que los metabolitos de la melatonina formados por su actividad como atrapadora de radicales libres poseen actividad antioxidante (10).

La actividad contra el daño oxidativo y capacidad atrapadora de radicales libres de la melatonina es superior a las vitaminas C y E. Asimismo la eficiencia antioxidante de la melatonina se ve acrecentada debido al hecho de que los metabolitos de la melatonina formados por su actividad como atrapadora de radicales libres persisten Un estudio demostró que la melatonina es capaz de estimular la generación y formación de espinas dendríticas en el hipocampo de ratas intactas(47), mientras que en otro estudio se observó que el desempeño en pruebas conductuales relacionadas con memoria en función del hipocampo en ratas bajo un modelo de hipoperfusión cerebral crónica mejoró al administrar melatonina en comparación a aquellas a las que se les administró vehículo. Por lo tanto, existe evidencia en estudios en modelos animales previos(14, 48, 49) que la melatonina puede resultar útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas por medio de su mecanismo restaurador de la organización neurocitoesquelética, y previniendo la apoptosis y el daño citoesquelético producido por radicales libres(13). Ya que la secreción de melatonina endógena disminuye en enfermedades neurodegenerativas, así como en algunos trastornos psiquiátricos,(46) la defensa

endógena hacia el daño causado por estrés oxidativo puede ser restituido por administración de melatonina exógena(13).

Dentro del mismo equipo de trabajo en el laboratorio de Neurociencias se han realizado estudios que datan del 2001 sobre el efecto de la melatonina en un modelo de isquemia cerebral aguda (14) en el que se observó que tenía un efecto protector de las células piramidales del hipocampo, y mejora del desempeño neurológico en gatos. Adicionalmente, se han realizado también estudios en los que se analiza de manera funcional los efectos neuroprotectores de la melatonina en modelos de isquemia cerebral global de 4VO(49) , observándose que no sólo la melatonina preserva la morfología celular en el hipocampo, si no también notándose un desempeño positivo en las pruebas conductuales, manteniendo la funcionalidad celular.

Efectos de la melatonina sobre el neurocitoesqueleto en VaD

La organización de los componentes citoesqueléticos determina la polarización neuronal adecuada para establecer los contactos sinápticos que son necesarios para la transmisión precisa de información en el cerebro. La polarización neuronal está afectada en varios desordenes neuropsiquiátricos, tales como depresión, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. La pérdida progresiva de la polaridad neuronal afecta las funciones cognoscitivas, por lo tanto, los efectos de la melatonina en la polarización neuronal son importantes. Este evento está caracterizado por el colapso del citoesqueleto subyacente a la pérdida de la polaridad estructural y se sabe que precede a la muerte neuronal y a la consecuente desaparición de la conectividad sináptica. Considerando que el indol exhibe propiedades para modular la organización citoesquelética y prevenir la apoptosis, la melatonina es importante para el re-establecimiento de la conectividad neuronal en el cerebro, específicamente en áreas importantes para las funciones cognoscitivas, como el hipocampo (50).

En cultivos celulares, se ha observado que el estrés oxidativo causa organización aberrante de los componentes citoesqueléticos. Los niveles incrementados de

radicales libres causan la despolimerización de la actina. En células NIE-115 (definir) los microfilamentos y microtúbulos colapsan en presencia de sustancias químicas que producen concentraciones elevadas de radicales libres. El estrés oxidativo causa la pérdida de la morfología neuronal y su forma altamente asimétrica. Actualmente se conoce que la melatonina previene el daño citoesquelético al reducir el estrés oxidativo restableciendo la organización citoesquelética, por lo tanto conservando la forma asimétrica de las neuronas dañadas (50).

En condiciones normales, la proteína tau está concentrada y distribuida en los axones, se une a los microtúbulos, estimulando la formación de microtúbulos y estabilizando la estructura neuronal. Por otro lado, la proteína tau está extensamente fosforilada y pareada en filamentos helicoidales en la mayor parte de las demencias, formando inclusiones patológicas (5). Cuando esta proteína está hiperfosforilada, pierde su estructura y, por lo tanto, los microtúbulos se ven alterados. Se ha sugerido que la melatonina actúa como molécula moduladora del citoesqueleto al reducir la hiperfosforilación de la proteína tau, preservando la estructura microtubular (5). La proteína tau hiperfosforilada se encuentra dissociada de los microtúbulos y está ensamblada en filamentos helicoidales pareados, los cuales se encuentran de manera abundante en pacientes con demencia. La melatonina erradica la hiperfosforilación excesiva de la proteína tau, así como su formación helicoidal en cultivos celulares de NIE-115. Esto sugiere que la melatonina actúa como neuroprotector citoesquelético previniendo la hiperfosforilación y preservando la estructura microtubular. Así, la melatonina preserva las funciones cognitivas al impedir el daño ocasionado por esta hiperfosforilación (50). Además, la melatonina protege, previene y restablece la organización neurocitoesquelética y la forma asimétrica funcional de las neuronas que es dañada por compuestos que generan estrés oxidativo elevado. Por otra parte, el colapso citoesquelético precede la apoptosis, por lo que la melatonina puede mejorar la supervivencia neuronal al estabilizar el citoesqueleto y mantener la forma asimétrica de las neuronas (50).

En las dendritas de animales hipóxicos el daño por el óxido nítrico está incrementado. Este efecto es contrarrestado por la melatonina y está acompañado por el establecimiento de dendritas en el hipocampo en desarrollo. Los efectos de la melatonina indican que la modulación de las espinas dendríticas y la estructura de las dendritas puede estar relacionada con los arreglos del citoesqueleto y con el desarrollo del hipocampo y su funcionalidad (50).

Además de los efectos de la melatonina sobre la reorganización citoesquelética y en la complejidad de las dendritas en las neuronas hiliares, se ha observado que la melatonina también modula la formación de neuronas nuevas en el giro dentado del hipocampo en ratones adultos. La organización dendrítica de las nuevas neuronas es importante para la supervivencia celular y la integración dentro del circuito neuronal. También se ha identificado que la melatonina también modula la morfología dendrítica de neuronas nuevas. Esto sugiere que los componentes de la melatonina que modulan el citoesqueleto pueden ser importantes para el establecimiento de conexiones sinápticas de las neuronas nuevas en el hipocampo de ratones adultos. Así, la melatonina favorece la funcionalidad hipocampal mediante el establecimiento adecuado de contactos neuronales en esta región que es importante para el aprendizaje y memoria (50).

Finalmente, la melatonina es un potente atrapador de radicales libres, que al mismo tiempo actúa como un regulador del citoesqueleto, así, se ha sugerido que el rol neuroprotector de la melatonina puede ser útil en la prevención y atenuación de las enfermedades psiquiátricas que exhiben una disrupción de la conectividad sináptica (50).

Técnica de impregnación argéntica de Golgi

El método de tinción de Golgi por impregnación con nitrato de plata proporciona una imagen completa de las células del sistema nervioso. A diferencia de otras tinciones utilizadas para analizar el tejido nervioso, esta técnica tiñe selectivamente un bajo número de células de la preparación, pero estas aparecen teñidas con

todas sus prolongaciones, lo que facilita el estudio morfológico en especial de la dendrita (25) (27, 51). El fundamento de esta técnica radica en la formación de un precipitado argéntico que vuelve a la célula opaca. Esta tinción se ha revelado como una técnica muy útil para la caracterización morfológica de los diversos tipos celulares del sistema nervioso, así como para la descripción de su organización y el esbozo de circuitos que la establecen (51).

JUSTIFICACIÓN

Diversas evidencias en la literatura, apoyan el efecto neuroprotector de la melatonina y su potencial uso en la clínica. De acuerdo a datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud(52) , se espera que la proporción de personas de 60 años o más se triplique para el año 2050. Esto lleva a un mayor riesgo de alteraciones cerebrovasculares tales como procesos de isquemia e hipoperfusión cerebral crónica, muchas veces asociadas o como consecuencia de diversas patologías. Estos padecimientos dejan secuelas neurológicas usualmente graves y permanentes en el individuo así como a su entorno familiar y social. La evolución gradual del daño de estructuras cerebrales vulnerables permite la implementación de maniobras de neuroprotección, como la aplicación de melatonina, orientadas a prevenir o neutralizar los fenómenos fisiopatológicos provocados por la hipoperfusión. Se considera a la hipoperfusión cerebral crónica una causa de demencia en pacientes con enfermedad cerebrovascular, ya que existe una correlación entre la severidad de la alteración de la memoria y la disminución en el flujo sanguíneo cerebral en padecimientos tales como enfermedad de Alzheimer, demencia vascular e hipoperfusión posterior a un evento isquémico. La importancia de sustancias en neuroprotección, como la melatonina radica en entender cómo actúan sobre la estructura de las neuronas, puede ayudar a determinar mejores alternativas en el tratamiento en pacientes con demencia vascular en un futuro.

HIPÓTESIS

El tratamiento neuroprotector con melatonina en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica en ratas preservará la longitud y arborización, así como la densidad y morfología de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales remanentes de la región CA1 del hipocampo.

OBJETIVOS

General

Caracterizar la citoarquitectura de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas, tras un evento de hipoperfusión cerebral crónica con y sin tratamiento neuroprotector con melatonina

Específicos

1. Evaluar la morfología de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas, tras un evento de hipoperfusión cerebral crónica con y sin tratamiento neuroprotector con melatonina
2. Evaluar la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas, tras un evento de hipoperfusión cerebral crónica con y sin tratamiento neuroprotector con melatonina
3. Caracterizar el patrón de arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratas, tras un evento de hipoperfusión cerebral crónica con y sin tratamiento neuroprotector con melatonina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y métodos experimentales

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.

El estudio se realizó en ratas Sprague-Dawley macho con un peso de 400-600g. Los animales se mantuvieron en jaulas de acrílico bajo condiciones ambientales de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura de $(20 \pm 2^\circ\text{C})$, con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

Las ratas se distribuyeron en los siguientes grupos:

SHAM (n=6): Animales sometidos a las maniobras simuladas de CHH por el modelo 2VO, sin interrumpir el flujo sanguíneo cerebral.

2VO+VEH (n=6): Animales sometidos a CHH mediante el modelo modificado de 2VO sin administración de melatonina.

2VO+MEL (n=6): Animales sometidos a CHH mediante el modelo modificado de 2VO con administración de melatonina por IV con Bombas Alzet

Se utilizó el modelo de CHH mediante el método modificado de oclusión de las 2 arterias carótidas internas (2VO) (53, 54)

Modelo experimental de hipoperfusión cerebral crónica mediante oclusión de las arterias carótidas

La CHH fue provocada mediante el procedimiento de 2VO (40, 42), que consiste en la oclusión y resección permanente (53) de las arterias carótidas. Bajo anestesia con xilacina (10 mg/kg, IM) y ketamina (90 mg/kg IM) a través de una incisión en la línea media ventral del cuello, se localizó la arteria carótida común derecha y se

separó del nervio vago. La carótida fue ocluida con una doble ligadura (54) y se realizó un corte entre las dos ligaduras, procediendo a suturar la herida. (53-55). Posterior a la cirugía los animales se hidrataron con solución salina isotónica (SSI) de manera subcutánea y se administró antibiótico y antiinflamatorio por vía intramuscular. Una semana después se realizó una nueva incisión y el mismo procedimiento se realizó a la arteria carótida izquierda. La temperatura corporal se mantuvo a $37.5 \pm 0,5$ °C, utilizando un cobertor eléctrico hasta su recuperación total de la anestesia. La melatonina (sigma, ST Louis. Mo, USA), fue preparada para administración en disolución de etanol absoluto y dilución con solución de NaCl al 0.9% hasta concentración final de 5 mg/ml, en una solución al 15% de etanol en SSI. La solución de melatonina fue administrada al grupo 2VO + MEL por infusión continua IV a partir de bombas osmóticas ALZET MODEL 2 ML1 (10 μ L/h, 7 días, 2ml), implantadas subcutáneamente y de la misma manera se procedió con el grupo 2VO + VEH para la administración de la solución vehículo (etanol 15% en SSI). Para ambos grupos se implantaron las bombas un día después del procedimiento 2VO.

Se realizaron las evaluaciones de aprendizaje y memoria mediante el Laberinto Acuático de Morris (56), así como el conteo de neuronas piramidales remanentes en la región CA1 del hipocampo (estudio paralelo)

Al término de las pruebas en el Laberinto Acuático de Morris las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35mg/kg) y perfundidas vía intracardiaca con solución salina seguida por una solución de formaldehído al 10% en amortiguador de fosfatos. Se extrajeron los cerebros y se dejaron en inmersión antes del procesamiento histológico.

Para el estudio histológico del daño neuronal en el hipocampo, los animales fueron perfundidos vía intracardiaca con solución lavadora (solución salina 0,9%) seguida de una solución fijadora compuesta de formaldehído al 4% en la solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4). Los cerebros fueron extraídos inmediatamente y fijados por inmersión en formaldehído al 4% por un mínimo de 24h.

Evaluación de la citoarquitectura, utilizando el método de impregnación argéntica de Golgi

Se realizaron cortes sagitales en un hemisferio desde el quiasma óptico hasta el tentorio de cada animal, y se procedió a extraer el hipocampo completo a partir del tejido obtenido (figura 5). Posteriormente se hizo una evaluación poblacional neuronal de la región CA1 del hipocampo de cada animal por grupo, utilizando una técnica modificada de Golgi (25), la cual consistió en la induración de los bloques mediante la inmersión de estos en dicromato de potasio al 2% en 50ml de agua desionizada, 10ml de formaldehído al 40% y 5ml de ácido acético glacial a 25°C durante 24 horas protegidos de la luz y en constante agitación. Al pasar las 24h se renovó la solución indurante y se dejó por otras 24h. Trascurrido ese tiempo, se enjuagaron de manera sucesiva por periodos de 10min cada bloque con agua desionizada hasta aclarar. Cada bloque de tejido se depositó en 20ml de una solución de nitrato de plata al 0.75% preparada en agua desionizada adicionada con 2µl de ácido fórmico y se dejó en reposo durante 24h en oscuridad. El bloque de tejido impregnado se incluyó en parafina y después se cortó utilizando un cortador de tejidos (Stoelting© Tissue Slicer 51425) obteniéndose cortes coronales de 200µm de espesor. Se obtuvieron en promedio 15 cortes por hipocampo los cuales se colocaron en laminillas. Para el análisis se seleccionaron 5 neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo por animal, las cuales requerían mostrar las siguientes características: a) que se pueda observar desde su inicio en el soma hasta el final de sus dendritas con suficiente claridad y sin interferencia de otras dendritas o vasos sanguíneos; b) Al menos 100 µm de longitud. En cada neurona se evaluaron las siguientes variables: longitud de la dendrita apical, número de bifurcaciones de la primera oblicua de la dendrita apical, densidad de espinas dendríticas por segmento y proporción de los diferentes tipos de espinas dendríticas.



Figura 5. Hipocampo completo extraído del hemisfero derecho.

Para la evaluación de la longitud de la dendrita apical de las neuronas piramidales se utilizó el método de Sholl(57) 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 $40\mu\text{m}$ 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).

Para evaluar la densidad de las espinas de las neuronas piramidales; de la dendrita apical desde su última bifurcación se tomó una dendrita oblicua, se delimitó un segmento de $20\mu\text{m}$ de longitud, y se contaron las espinas dendríticas en dicho segmento, y se identificaron sus diferentes tipos (delgadas, hongos, anchas y bifurcadas). Lo anterior se realizó a una amplificación de 2000 aumentos (200X) en un microscopio óptico (Leica© Mod. DM 1000) que contaba con un magnificador (Leica© Manual Mag. Charger V15 3-POS).

El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA), la prueba post hoc de Tukey, a una significancia menor o igual a 0.05; así también se utilizó la corrección de Bonferroni para la evaluación de la proporción de los diferentes tipos de espinas.

RESULTADOS

Efectos de la melatonina en la arborización dendrítica de neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo en ratas sometidas a CHH.

A la observación bajo microscopio óptico, una de las características más destacadas en la estructura de las neuronas piramidales entre los grupos experimentales fue la diferencia en la forma de la dendrita apical. Tanto las dendritas del grupo SHAM como las del grupo 2VO+MEL presentaban ondulaciones abundantes en toda su longitud, mientras que las dendritas del grupo 2VO+VEH se mostraban con una estructura lineal (figura 5).

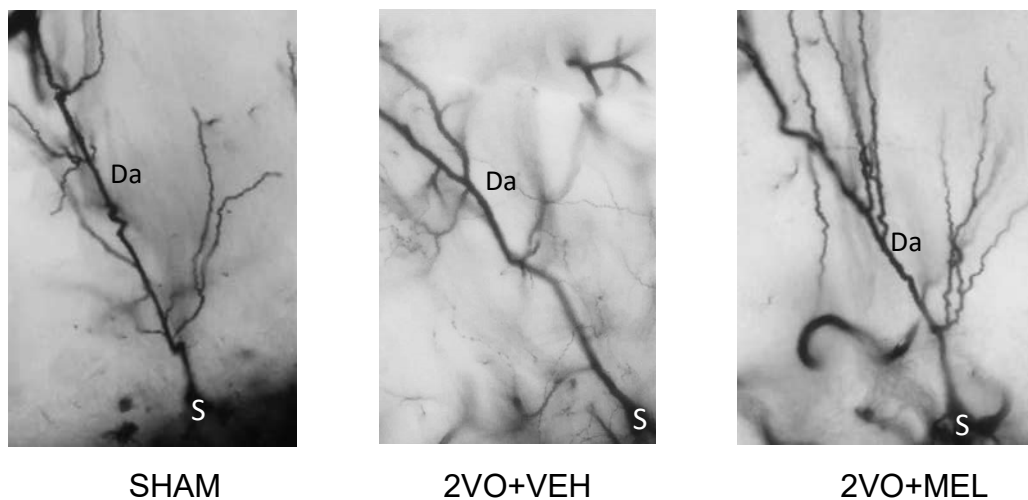


Figura 6. Micrografías representativas de los somas (S) y dendritas apicales (Da) de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo correspondientes a los grupos SHAM, 2VO+VEH y 2VO+MEL.

La CHH ocasionó una disminución significativa en la longitud de la dendrita apical en el grupo 2VO+VEH en comparación al grupo SHAM, mientras que el grupo 2VO+MEL no presenta diferencias significativas en comparación al grupo SHAM (figura 7).

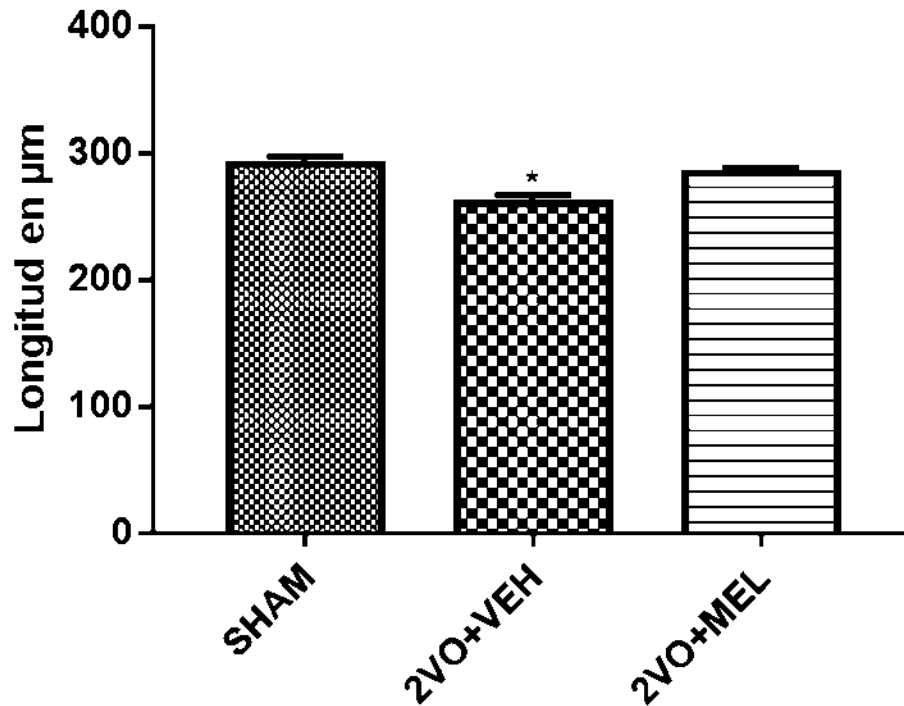


Figura 7. Longitud promedio en µm de las dendritas apicales de las neuronas piramidales del sector del CA1. Se observa una disminución significativa en la longitud de la dendrita apical en el grupo 2VO+VEH en relación al grupo SHAM. El grupo 2VO+MEL se mostró estadísticamente similar al grupo SHAM.

*P <0.05 2VO+VEH vs SHAM

La CHH ocasionó una disminución significativa en el número de bifurcaciones de la primera oblicua de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en el grupo 2VO+VEH y 2VO+MEL en comparación al grupo SHAM. Mientras que los grupos 2VO+VEH y 2VO+MEL no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos (figura 8).

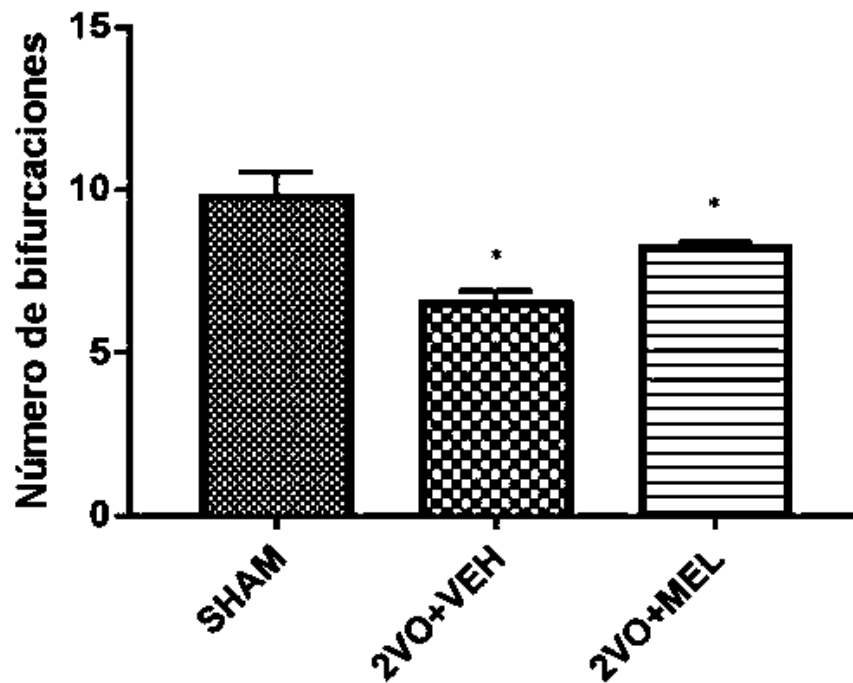


Figura 8. Número promedio de bifurcaciones de la primera dendrita apical de las neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo. Existe una disminución significativa en el número de bifurcaciones de la primera oblicua de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en el grupo 2VO+VEH y 2VO+MEL en comparación al grupo SHAM. Mientras que los grupos 2VO+VEH y 2VO+MEL no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

*p <0.05 vs SHAM

Efectos de la melatonina en el número y forma de espinas dendríticas en neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo en ratas sometidas a CHH.

La Tabla 1 muestra los resultados de la densidad de espinas de la rama oblicua proveniente de la dendrita apical. El número total de espinas dendríticas en el grupo 2VO+VEH fue significativamente menor en relación al grupo SHAM, en tanto que la densidad de espinas en el grupo 2VO+MEL fue estadísticamente similar al grupo SHAM.

Tabla 1. Densidad de los diferentes tipos de espinas de los segmentos oblicuos (20µm) de la dendrita apical provenientes de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Puede observarse reducción significativa de la densidad de todos los tipos de espinas, con excepción de las bifurcadas, así como el total de espinas en el grupo 2VO+VEH en comparación con el grupo SHAM. Mientras que la densidad de espinas de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en el grupo 2VO+MEL no mostró diferencias significativas en relación al grupo SHAM.

	Delgadas	Hongo	Anchas	Bifurcadas	Total
SHAM	9.57 ± 1.81	6.73 ± 0.98	3.00 ± 0.72	0.37 ± 0.17	19.67 ± 3.01
2VO+VEH	1.20 ± 0.84*	3.97 ± 1.52*	5.43 ± 1.67*	0.07 ± 0.11	10.67 ± 2.76*
2VO+MEL	10.13 ± 1.26	7.93 ± 0.71	3.07 ± 0.17	0.20 ± 0.14	21.33 ± 1.75

*p <0.05 2VO+VEH vs SHAM

El segmento de la primera oblicua de la dendrita apical del grupo 2VO+VEH posee una menor cantidad de espinas dendríticas MEL, además de poseer la estructura de la dendrita apical más delgada en comparación con los grupos SHAM y 2VO+ (figura 9).

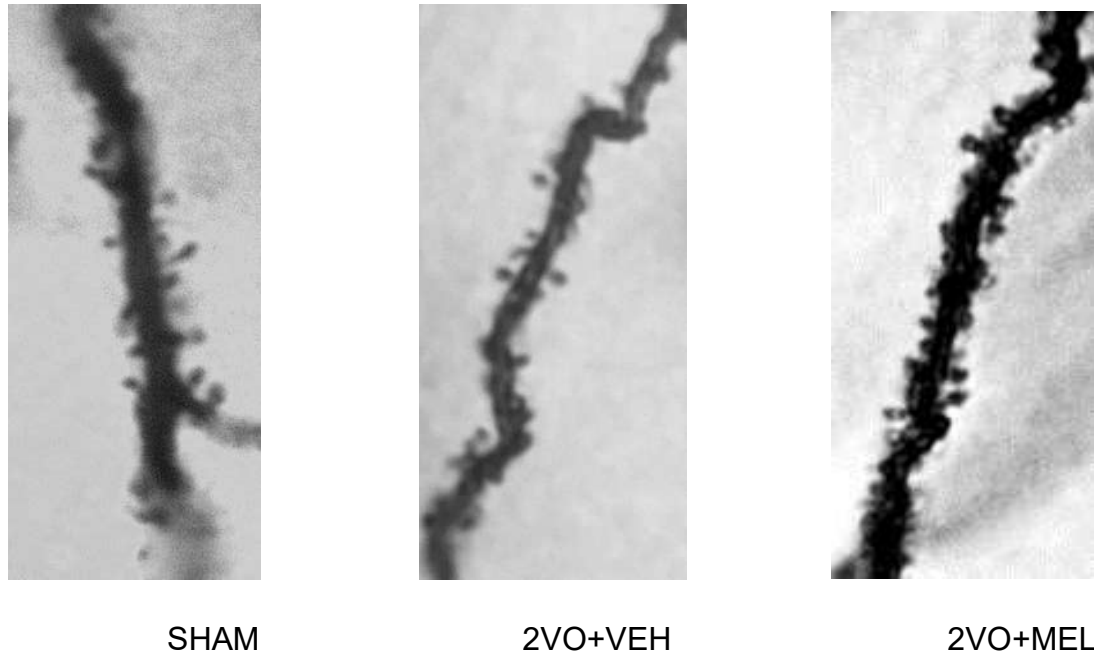


Figura 9. Micrografías representativas de segmentos de la primera oblicua proveniente de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo correspondientes a grupo SHAM, 2VO+VEH y 2VO+MEL. Se puede observar una menor cantidad de espinas y una estructura más delgada en el grupo 2VO+VEH en comparación con los grupos SHAM y 2VO+MEL.

El número de espinas dendríticas en todas sus formas, con excepción de las bifurcadas, fueron significativamente menores ($p < 0.05$) en el grupo 2VO+VEH en comparación con el grupo SHAM (figura 4 y tabla 1). Así mismo en el grupo SHAM y en el grupo 2VO+MEL predominaron las espinas delgadas y en forma de hongo, sin tener diferencia significativa entre ellos, mientras que en el grupo 2VO+VEH las espinas anchas y en forma de hongo fueron las más comunes en comparación con los otros tipos de espinas (figura 10).

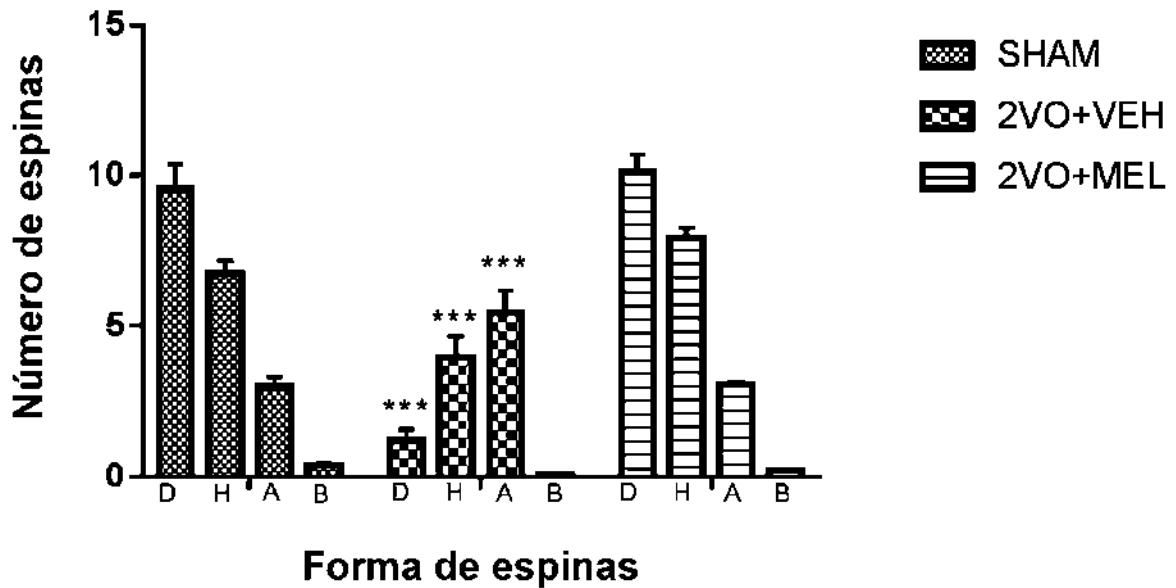


Figura 10. Proporción de los diferentes tipos de espinas por segmento provenientes de la primera oblicua de la dendrita apical de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. La densidad de espinas dendríticas en todas sus formas, con excepción de las bifurcadas, fueron significativamente menores en el grupo 2VO+VEH en comparación con el grupo SHAM. En el grupo SHAM y en el grupo 2VO+MEL predominaron las espinas delgadas y en forma de hongo, sin tener diferencia significativa entre ellos, mientras que en el grupo 2VO+VEH las espinas anchas y en forma de hongo fueron las más comunes en comparación con los otros tipos de espinas D: delgadas; H: hongo; A: anchas; B: bifurcadas.

****p <0.05 2VO+VEH vs SHAM

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que los animales sometidos a CHH por un periodo de 15 días mostraron alteraciones en los diferentes parámetros de la citoarquitectura de las neuronas de la región CA1 del hipocampo que se analizaron. El número de espinas dendríticas disminuyó drásticamente en comparación al grupo SHAM, predominando la forma ancha. Estos resultados son consistentes con la declinación del aprendizaje y memoria espaciales evaluados en el laberinto Acuático de Morris, donde hubo una muerte de aproximadamente el 30% de las neuronas (58, 59). Las espinas dendríticas son los principales sitios postsinápticos, su plasticidad morfológica refleja cambios en la fuerza sináptica y facilita la respuesta de la neurona a cambios en la actividad neuronal. En este estudio, los cambios en la morfológica dendrítica y la reducción en la densidad de las espinas dendríticas observada mediante el método de Golgi supone una disminución en las conexiones sinápticas, alteración del flujo de información entre hipocampo y corteza prefrontal, llevando a una alteración en el aprendizaje y memoria. El hipocampo y la corteza prefrontal son estructuras cerebrales vinculadas con el aprendizaje y la memoria, así como otras funciones cognitivas. Asimismo, ambas estructuras se destacan por su alta vulnerabilidad a procesos de isquemia (19). Estudios anatómicos muestran que existe un circuito mono sináptico entre el sector CA1 del hipocampo y la corteza prefrontal (vía hipocampo- corteza prefrontal). Este circuito coordina e intercambia información relevante entre estas dos regiones cerebrales durante la cognición(59).

En el presente estudio la CCH mediante el empleo del modelo 2VO, ocasiono una disminución del flujo sanguíneo en el hipocampo estimada en un 66% de acuerdo a Farkas en el 2007 (40). Esta disminución experimental en el flujo sanguíneo, se considera similar a la hipoperfusión cerebral crónica presente en el anciano, por lo cual este modelo ampliamente empleado en el estudio del daño cognitivo inducido por la CCH.

En diferentes enfermedades cerebrovasculares como aterosclerosis, VaD, enfermedad de Alzheimer y malformaciones arteriovenosas, entre otras, se caracterizan por la disminución del flujo sanguíneo cerebral llevando a una CCH lo cual desencadena estrés oxidativo, respuesta inflamatoria e incremento de calcio intracelular. La materia blanca periventricular, los ganglios basales y el hipocampo son altamente susceptibles a las lesiones originadas por hipoperfusión (5). Los radicales libres son capaces de despolarizar los microtúbulos, lo que lleva a una pérdida de la polarización e inducción de la señalización apoptótica. El estrés oxidativo es un factor importante que causa una organización citoesquelética aberrante (24)

Los mecanismos relacionados con la dinámica de las espinas dendríticas son complejos y aun no aclarados por completo. La isquemia crónica es un estado con aumento en los aminoácidos excitatorios, daño cerebral, presencia excesiva de radicales libres, otros procesos patológicos (40) y aumento de Ca^{2+} de intracelular. La activación de receptores NMDA por la elevación postsináptica de la concentración de Ca^{2+} determina la plasticidad sináptica (60). El aumento excesivo de calcio intracelular, propio de la CCH, es un elemento esencial para la contracción y eliminación de las espinas (59).

La pérdida progresiva de la polaridad neuronal es un evento histopatológico conocido en trastornos neuropsiquiátricos relacionados al estrés oxidativo. Este evento es caracterizado por colapso citoesquelético que es ocasionado por la pérdida de la polaridad estructural y se conoce que es precedida por muerte neuronal y desaparición de conectividad sináptica (50).

Por otro lado, el grupo de animales con CHH y tratamiento con melatonina dosis (1.4mg/día) iv por un periodo de siete días preservó la longitud, arborización así como la densidad y morfología de las espinas dendríticas de las neuronas

piramidales remanentes de la región CA1 del hipocampo en comparación al grupo de animales que no fueron tratados con melatonina.

La melatonina tiene tres mecanismos de acción a través de la interacción con sus receptores: a) la melatonina se une a receptores membranales acoplados a las vías de señalamiento de la adenilato ciclasa y de la fosfolipasa C; b) unión a receptores nucleares de la familia de los retinoidales; c) la melatonina se une y modula la actividad de la calmodulina (CaM) y de la proteína cinasa C (PKC). Existen evidencias que apoyan que mediante este último mecanismo que la melatonina modula la organización de los principales componentes del citoesqueleto; microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios (61).

Se ha demostrado en varios casos que la melatonina actúa como un antioxidante neuronal y mejora el resultado en los casos donde el citoesqueleto se ve alterado, como en modelos experimentales de Alzheimer, desórdenes del sueño asociados a Parkinson y enfermedad de Huntington. Además, los niveles incrementados de MAP2 se han encontrado en células expuestas a melatonina, proveyendo un posible mecanismo de incremento de la polimerización microtubular y estabilización de la acción dendrítica ocasionada por esta hormona (24)

Por otro lado, la melatonina, por su carácter anfifílico, es un atrapador de radicales libres directo y un antioxidante indirecto que actúa favoreciendo la actividad de importantes enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (62). El estrés oxidativo influye en el estado de fosforilación de la proteína tau(46-48). En un estudio se mostró que la calmodulina A, inhibidor selectivo de la protein fosfatasa de PP-2A y PP-1, induce una activación específica de la GSK-3 vía estrés oxidativo(35) Es posible, por lo tanto, que la prevención de la fosforilación de la proteína tau por la melatonina se deba a su actividad antioxidante (63).

Se propone que, adicional a sus propiedades antioxidantes, la melatonina actué como un modulador de enzimas. Diversas evidencias vinculan a la melatonina como

reguladora de protein-cinasas como PKA, PKC, Cinasa II dependiente del complejo Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) y la familia de protein- cinasa activadas por mitogenos (MAPK). La correlación documentada entre la melatonina y el cAMP indica que la melatonina puede inhibir la actividad de PKA a través de el efecto inhibidor de la adenilato ciclasa mediado por receptor y disminución del cAMP. Aunque no existe una evidencia directa en relación a melatonina y la actividad de GSK-3, un estudio reciente mostro que el tratamiento de melatonina lleva a una fosforilacion elevada de Akt, un regulador corriente arriba de GSK-3. Es posible que la melatonina inhiba GSK-3 al menos parcialmente, mediante la estimulación de la fosfatidil-inositol 3 cinasa de la via de señalización (PI-3K)/Akt. Considerando la regulación de la actividad de GSK-3 por otras cinasas, se propone a la melatonina como inductora de la activación de cinasas de las familias PKC y MAPK. Basados en evidencias de diversos grupos de investigación, es posible que la melatonina puede funcionar como un modulador corriente arriba de la extensa familia de protein cinasas y protein fosfatasas, y la cinasa GSK-3 es una de las más señaladas como el blanco de la melatonina (63).

Por lo tanto, una hipótesis actualmente aceptada es que la desregulación de la dinámica citoesquelética Rhodependiente en las espinas dendríticas contribuye a varios trastornos mediante la disrupción de la morfología dendrítica, previniendo una apropiada función sináptica y plasticidad (32). La pérdida progresiva de la polaridad neuronal es un evento histopatológico conocido en trastornos neuropsiquiátricos relacionados al estrés oxidativo. Este evento es caracterizado por colapso citoesquelético que es ocasionado por la pérdida de la polaridad estructural y se conoce que es precedida por muerte neuronal y desaparición de conectividad sináptica.

Considerando que la indolamida exhibe las propiedades para modular la organización del citoesqueleto y prevenir la apoptosis, la melatonina es importante

para el restablecimiento de conectividad neuronal en el encéfalo, específicamente en áreas importantes para las funciones cognitivas, como el hipocampo (50).

CONCLUSIÓN

El modelo de hipoperfusión cerebral crónica en ratas se evaluó a través de pruebas funcionales (MWM), además del análisis de las células piramidales de la región CA1 del hipocampo particularmente sensibles a alteraciones del flujo sanguíneo cerebral. Los resultados de manera global mostraron que la CHH disminuyó en un 30 % la población de neuronas ocasionando deficiencias en el aprendizaje y memoria espacial evaluado en el MWM (58). En cuanto a la citoarquitectura, las neuronas remanentes presentaron alteraciones en la forma de las dendritas así como de la densidad y forma de las mismas.

Por otro lado, en los animales sometidos a CHH y tratamiento con melatonina, se preservó la población de neuronas piramidales del hipocampo, mostraron un aprendizaje y memoria espacial similar al grupo de ratas intactas. El análisis de diversos parámetros de la citoarquitectura de las neuronas piramidales dio por resultado datos similares a grupo intacto. Estos resultados se relacionan con observaciones anteriores tanto en el grupo de trabajo como en otros grupos de investigación enfocados en el efecto neuroprotector de la melatonina.

Estos hallazgos, proponen a la melatonina como un agente neuroprotector con un potencial uso clínico como estrategia terapéutica en patologías como VaD y otras enfermedades neurodegenerativas que comparten mecanismos fisiopatológicos similares de daño neuronal. Sus múltiples propiedades de esta molécula como antioxidante, antiinflamatorio, regulador de enzimas y adicionalmente, su habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica y no causar efectos secundarios hacen a la melatonina un agente neuroprotector prometedor.

REFERENCIAS

1. Farkas E, Luiten PGM. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 2001;64:575-611.
2. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, BA F. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:1620-4.
3. World Health Organization. First WHO Ministerial Conference on Global Action Against Dementia. *Dementia: Where do we stand?: World Health Organization;* 2015. p. 1-4
4. Barnes JN. Exercise, cognitive function, and aging. *Adv Physiol Educ.* 2015;39:55-62.
5. Venkat P, Chopp M, Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia. *Experimental Neurology* 2015;272:97-108.
6. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, DeCarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2011;42:2672 - 713.
7. Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron.* 2013;80:844 -66.
8. OMS. Demencia 2017 [cited 2018 April 16]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>.
9. Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke.* 2009;40:S111-4.
10. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnecki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 2003;50:1129-46.
11. Tütüncüler F, Eskiocak S, Başaran UN, Ekuklu G, Ayvaz S, U V. The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatr Int.* 2005;47:434-9.
12. Bondy SC, Sharman EH. Melatonin and the aging brain. *Neurochemistry International.* 2007;50:571 -80.
13. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006;40:1-9.
14. Letechipía-Vallejo G, González-Burgos I, Cervantes M. Neuroprotective Effect of Melatonin on Brain Damage Induced by Acute Global Cerebral Ischemia in Cats. *Archives of Medical Research.* 2001;32:186-92.
15. Barinagarrementería F, C C. *Enfermedad Vascolar Cerebral.* 1st ed: McGraw-Hill Interamericana; 1998.
16. Jin-Moo L, Margaret CG, Gregory JZ, WC D. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest.* 2000;106:723-31.
17. Wang X, EK M. Selective Neuronal Vulnerability to Oxidative Stress in the Brain. *Front Aging Neurosci.* 2010;2.
18. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79:1431-568.
19. Pulsinelli W A. Selective Neuronal Vulnerability: Morphological and Molecular Characteristics. *Progress in Brain Research.* 1985;63:29-36.

20. Luca M, Luca A, Calandra C. The Role of Oxidative Damage in the Pathogenesis and Progression of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:1-8.
21. Graves AR, Moore SJ, Bloss EB, Mensh BD, Kath WL, N S. Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron*. 2012;76:776-89.
22. Wible C. Hippocampal Physiology, Structure and Function and the Neuroscience of Schizophrenia: A Unified Account of Declarative Memory Deficits, Working Memory Deficits and Schizophrenic Symptoms. *Behav Sci (Basel)*. 2013;3:298-315.
23. Scheuss V, T B. Function of dendritic spines on hippocampal inhibitory neurons. *Cereb Cortex*. 2014;24:3142-53.
24. Marchisella F, Coffey ET, Hollos P. Microtubule and Microtubule Associated Protein Anomalies in Psychiatric Disease. *Cytoskeleton*. 2016;73:596-611.
25. González-Burgos I, Tapia-Arizmendi G, A F-V. Golgi Method without Osmium Tetroxide for the Study of the Central Nervous System. *J Biotechnic & Histochemistry*. 1992;67:288-96.
26. Zhang S, J W, L W. Structural plasticity of dendritic spines. *Frontiers in Biology*. 2010;5:48-58.
27. Risher WC, Ustunkaya T, Alvarado JS, Eroglu C. Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLoS ONE*. 2014;9:1 - 8.
28. Hui Qiao, Ming-Xing Li, Chang Xu, Hui-Bin Chen, Shu-Cheng An, Ma X-M. Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plasticity*. 2016;2016:1-26.
29. Hsueh Y-P. Neuron-specific regulation on F-actin cytoskeletons Communicative & Integrative Biology. 2012;5:334-6
30. Yoshihara Y, De Roo M, Muller D. Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion in Neurobiology*. 2009;19:146-53.
31. Sekino Y, Kojima N, Shirao T. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*. 2007;51:92-104.
32. Blanpied TA, Ehlers MD. Microanatomy of Dendritic Spines: Emerging Principles of Synaptic Pathology in Psychiatric and Neurological Disease. *BIOL PSYCHIATRY*. 2004;55:1121-7.
33. Kulkarni VA, BL. F. The dendritic tree and brain disorders. *Mol Cell Neurosci*. 2012;50:10-20.
34. Rodríguez-García PL, Rodríguez-García D. Diagnosis of vascular cognitive impairment and its main categories. *Neurologia*. 2015;30:223 - 39.
35. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, Roman G, Sawada T, Pantoni L, et al. Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurol*. 2003;2:89 -98.
36. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, JC A. Patología estructural y funcional. 8 ed. Cotran Ry, editor: Elsevier Saunders; 2010.
37. Sugawara T, Fujimura M, Noshita M, Kim GW, Saito A, Hayashi T, et al. Neuronal Death/Survival Signaling Pathways in Cerebral Ischemia. *NeuroRx*. 2004;1:17-25.
38. Kaminogo M, Suyama K, Ichikura A, Onizuka M, S S. Anoxic depolarization determines ischemic brain injury. *Neurol Res*. 1998;20:343-8.
39. Pappas BA, de la Torre JC, Davidson CM, Keyes MT, Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*. 1996;708:50-8.
40. Farkas E, PG. L, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*. 2007;54:162- 80.

41. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:266 - 72.
42. Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 1997;79:1039 - 50.
43. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, JH7 Z. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci*. 2015;16:22368-401.
44. Guerrero J M, Carrillo-Vico A, J LP. La Melatonina. *Investigación y ciencia*. 2007:30-8.
45. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, W B. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res*. 2008;44:157-64.
46. Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res*. 2001;30:65-74.
47. Alonso-Alconada D, Álvarez A, Arteaga O, Martínez-Ibargüen A, E H. Neuroprotective Effect of Melatonin: A Novel Therapy against Perinatal Hypoxia-Ischemia. *Int J Mol Sci*. 2013;14:9379-95.
48. Cervantes M, Morali G, Letechipia-Vallejo G. Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res*. 2008;45:1-7.
49. Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Espinoza-González V, González-Burgos I, Olvera-Cortés ME, Morali G, et al. Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res*. 2007;42:139-46.
50. Benítez-King G, Domínguez-Alonso A, Ramírez-Rodríguez G. Neurocytoskeletal Protective Effect of Melatonin: Importance for Morphofunctional Neuronal Polarization. *The Open Neuroendocrinology Journal*. 2010;3:105-11.
51. Rodríguez D, Broglio C, Durán E, Gómez A, Ocaña F M, Jiménez-Moya F, et al. *Fundamentos de Neurociencia, Manual de Laboratorio*: McGraw Hill; 2006.
52. OMS. Demencia 2017 [December 7th 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es>.
53. Cechetti F, Worm PV, Pereira LO, Siqueira IR, Netto CA. 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*. 2010;43:1178 - 83.
54. Azzubaidi MS, Saxena AK, Talib NA, Ahmed QU, Dogarai BB. Protective effect of treatment with black cumin oil on spatial cognitive functions of rats that suffered global cerebrovascular hypoperfusion. *Acta Neurobiol Exp*. 2012;72:154 - 65.
55. Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, Ben J, da Costa MS, et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain Res Bull*. 2012;87:109 - 16.
56. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47 - 60.
57. Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*. 1953(87):387-406.
58. Domínguez LF. Evaluación morfológica y funcional a largo plazo del efecto neuroprotector de la melatonina contra el daño producido por hipoperfusión cerebral crónica en ratas Morelia, Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2016.

59. Jia H, Zhang XM, Zhang BA. Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex and hippocampus in 2VO rats. *Neurol Sci.* 2012;33:1063-70.
60. Rochefort NL, A. K. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *European Molecular Biology Organization.* 2012;13:699–708;.
61. Benitez-King G. El papel de la melatonina como modulador de la organización del citoesqueleto. *Salud Mental.* 2000;23(1):18-22.
62. Balmik AA, Chinnathambi S. Multi-Faceted Role of Melatonin in Neuroprotection and Amelioration of Tau Aggregates in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2018.
63. Wang J-z, Wang Z-f. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2006;27(1):41-9.