



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

Evaluación morfológica y funcional a largo plazo del efecto neuroprotector de la melatonina contra el daño producido por hipoperfusión cerebral crónica en ratas

PRESENTA:

Química Farmacobióloga

Lizeth Flores Domínguez

**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

Julio 2016



En la escala de las magnitudes, el ser humano está situado a la mitad del camino entre el átomo y la estrella.

Alexis Carrel

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

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
Registro de becaria: 305213

El presente trabajo fue financiado por la Coordinación de Investigación Científica (CIC)
con número de registro: 108141 y 522386 y el Programa para el Desarrollo Profesional
Docente (PRODEP) con número de registro: 1768011.

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:

Química Farmacobióloga LIZETH FLORES DOMÍNGUEZ

Doctora en el Área de Física

Elisa López Loeza

Doctor en Ciencias Biomédicas

José Miguel Cervantes Alfaro

Doctora en Ciencias Fisiológicas

Bertha Fenton Navarro

Doctora en Ciencias Especialidad en Farmacología

Marcia Yvette Gauthereau Torres

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

Maestro en Ciencias de la Salud

Manuel López Rodríguez

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

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 Histopatología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Químico Farmacobiología donde recibí mi formación profesional.

De manera especial al Laboratorio de Neurociencias de La Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez; a mi directora de tesis DC. Graciela Letechipía Vallejo por compartir su conocimiento y aportar al mío, al DC. José Miguel Cervantes Alfaro por su buen sentido musical que aminoraba el estrés y el cansancio en días de cirugía. A mis compañeras Verónica Zamora Landa, Noemí Montoya Fraga y Lucia Cadena Salgado, sin ellas muchas cosas no hubieran sido posibles.

A mi comité tutorial por haber guiado a buen término el presente trabajo: DC. Bertha Fenton Navarro, DC. Elisa López Loeza, DC. Marcia Y. Gauthereau Torres, DC. José Miguel Cervantes Alfaro.

Al Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH, de manera particular al MC. Manuel López Rodríguez por su apoyo y hospitalidad.

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.

A mis compañeros de generación por haber compartido esta aventura.

DEDICATORIA

A mi familia, de manera muy especial a mi mamá Tomasa Flores por apoyar mis decisiones, por creer en mí, por ser mi todo. A mis hermanos mis compañeros de vida, de quienes he aprendido cosas que no se adquieren en los libros: Fernando, Carlos y Esmeralda. A mis abuelos, por ser creadores de lo que hoy soy.

A mi novio Héctor Montaña, por su amor y por todos los días buenos y sobre todo por soportar a mi lado los días malos. A su familia que siempre me ha arropado y me ha brindado su cariño.

A mis amigos que han permanecido en el paso de los años: Lucero Calderón, Alicia Arroyo, Héctor Arreaga, Guillermo Calixto.

Y sobre todo a esa fuerza espiritual que me ha permitido nunca desistir de mis metas, que logra vencer mis miedos y no dejar de creer que todo es posible.

ABREVIATURAS

AD: Enfermedad de Alzheimer

ATP: Adenosin trifosfato

CA1: Cuerno de Ammon, segmento 1

CCH: Hipoperfusión cerebral crónica

CBF: Flujo sanguíneo cerebral

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EEM: Error estándar de la media

GPx: Glutación peroxidasa

IL: Interleucina

LCR: Líquido cefalorraquídeo

ME: Memoria explícita

MI: Memoria implícita

MWM: Laberinto acuático de Morris

REDOX: Reacciones de óxido-reducción

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema Nervioso central

SOD: Superóxido dismutasa

SSI: Solución salina isotónica

VaD: Demencia vascular

WHO: Organización mundial de la salud

2VO: Oclusión bilateral de arterias carótidas comunes



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

RESUMEN



Evaluación morfológica y funcional a largo plazo del efecto neuroprotector de la melatonina contra el daño cerebral por hipoperfusión cerebral crónica en ratas

La hipoperfusión cerebral crónica (CCH), entre otros procesos fisiopatológicos, es un factor causal para el desarrollo de deterioro cognitivo y la demencia en la vejez. En consecuencia, la inhibición de diversas vías fisiopatológicas de daño neuronal es una estrategia neuroprotectora atractiva para el manejo clínico de esta alteración. La melatonina, protege al sistema nervioso contra diversas patologías a través de sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. **Objetivo.** Evaluación mediante pruebas funcionales y morfológicas del efecto neuroprotector de la melatonina en ratas Sprague-Dawley sometidas a CCH, mediante el modelo de oclusión de 2 vasos (2VO) con y sin tratamiento, en comparación con animales intactos. **Material y Métodos.** Se utilizó el modelo 2VO en ratas macho Sprague-Dawley, un modelo bien establecido para CCH. Melatonina 5 mg/ml se administró a las ratas (grupo 2VO + MEL) por infusión continua IV a través de una bomba osmótica implantada subcutáneamente, ALZET modelo 2ML1 (10 μ l / h., 7 días, 2 ml), o vehículo etanol 15% en solución salina (2VO + grupo VEH), iniciando un día después de 2VO. También se incluyó un grupo SHAM. Quince días después del tratamiento con melatonina o vehículo, el efecto neuroprotector de la melatonina, se evaluó mediante el desempeño en pruebas de aprendizaje espacial y memoria (Laberinto Acuático de Morris, MWM). Adicionalmente, la población de células piramidales del sector CA1 del hipocampo fue analizada al finalizar el periodo de pruebas conductuales. **Resultados.** No se observaron cambios significativos en el aprendizaje espacial en los 3 grupos experimentales, solo en la prueba de transferencia con $p < 0.05$ del grupo 2VO + VEH respecto a los grupos SHAM y 2VO + MEL. Una pérdida significativa de la población de neuronas piramidales CA1 en el segmento de hipocampo del grupo 2VO + VEH (28,4% menos que en el grupo SHAM). En contraste, 96 % de la población de neuronas piramidales del segmento de CA1 del hipocampo se mantuvo en el grupo 2VO + MEL. **Conclusión.** En general estos resultados ponen de relieve la eficacia de la melatonina en contrarrestar el proceso fisiopatológico inducida por hipoperfusión cerebral crónica.

Palabras clave: Neuroprotección, Melatonina, Hipoperfusión cerebral crónica, Demencia, Hipocampo



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS

“DR. IGNACIO CHÁVEZ”

ABSTRACT



Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of melatonin on brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats

Chronic cerebral hypoperfusion (CCH), among other pathophysiological process, is a causal factor accounting for the development of cognitive decline and dementia in the elderly. Consequently, inhibition of several pathophysiological pathways of neuronal damage is an attractive neuroprotective strategy for the clinical management of these disorder. Melatonin, protects the nervous system against several insults through its antioxidant and anti-inflammatory properties. **Objectives.** Evaluation by functional and morphological evidence of the neuroprotective effect of melatonin in Sprague-Dawley rats subjected to HCC, by occlusion model 2 vessels (2VO) with and without treatment, compared with intact animals. Sprague-Dawley rat with permanent bilateral common carotid artery occlusion (2VO), a well-established model of chronic cerebral hypoperfusion, were used. **Materials and Methods.** The 2VO model was used in Sprague-Dawley male rats, a model well established for HCC. Melatonin 5mg/ml was administered to rats (2VO + MEL group) by continuous IV from a subcutaneously implanted osmotic pump ALZET, model 2ML1 (10 μ l/h.,7 days, 2ml), or vehicle ethanol 15% in saline (2VO + VEH group), starting one day, after 2VO. A SHAM group was also included. Fifteen days after melatonin treatment, the neuroprotective effect of melatonin, was evaluated by means of spatial learning/memory tests performance (Morris Water Maze). In addition, the pyramidal neuron population of the CA1 segment of hippocampus was assessed at the end of the behavioral testing period. **Results:** No significant changes were observed in spatial learning in the 3 experimental groups, only the transfer test with $p < 0.05$ 2VO + VEH group compared to SHAM groups and 2VO + MEL. A significant loss of pyramidal neuron population in the CA1 segment of hippocampus (28.4% less than in the SHAM group) was observed in the 2VO + VEH group. By contrast, a 96 % pyramidal neuron population of the CA1 segment of hippocampus remained in the 2VO + MEL group. **Conclusion.** Overall these results emphasize the efficacy of melatonin in counteracting the pathophysiological process induced by chronic cerebral hypoperfusion.

Keywords: Neuroprotection, Melatonin, Hypoperfusion cerebral chronic, Dementia, Hippocampus

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
JUSTIFICACIÓN	25
HIPOTESIS	26
OBJETIVO	27
MATERIAL Y METODOS	28
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIÓN	44
PERSPECTIVAS	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

INTRODUCCIÓN

En la población mundial destaca la tendencia al aumento de la proporción de adultos mayores. Se estima que para el año 2050, cerca de 2 millones de personas tendrán la edad de 60 años o más. La transición a poblaciones envejecidas representa un reto para la sociedad de muchas formas. La salud en los ancianos será un determinante crucial para definir el balance entre costos y beneficios asociados al envejecimiento de la población⁽¹⁾.

El reto para los Sistemas de Salud es mantener una alta calidad de vida en el adulto mayor disminuyendo la morbilidad. La edad avanzada está asociada con el mayor riesgo a padecer demencia. El envejecimiento asociado a un deterioro cognitivo conlleva a una disminución de la calidad de vida. Aunque la demencia afecta principalmente a adultos mayores, no corresponde a un envejecimiento saludable del individuo. Sin embargo, la demencia es una de las principales causas de discapacidad y dependencia de las personas mayores en todo el mundo. Es una carga abrumadora, no sólo para el individuo que sufre demencia, sino también para sus cuidadores, familiares y la sociedad en su conjunto (1, 2).

De acuerdo a la Primera Conferencia Ministerial de Acciones Globales contra la Demencia 2015 organizada por la Organización Mundial de la Salud (WHO), en ese año, más de 35 millones de personas padecían demencia. Cada año, se suman a las cifra casi 8 millones de nuevos casos de demencia es decir un nuevo caso cada cuatro segundos en algún lugar del mundo (1).

Las consecuencias médicas, psicosociales y económicas del daño cognitivo combinado con una población creciente de individuos mayores de 65 años requiere de soluciones multidisciplinarias. El envejecimiento está asociado a mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares, disfunción vascular y desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD), los cuales en conjunto afectan la función vascular y perfusión cerebral llevando a una atrofia cerebral. En el aspecto clínico, estos cambios, se manifiestan como una pérdida progresiva de las funciones cognitivas, neurodegeneración hasta el establecimiento de demencia (2).

1. DEMENCIA

El síndrome clínico de demencia, caracterizado por la dependencia funcional en base a la declinación progresiva de funciones cognitivas, puede deberse a una serie de procesos fisiopatológicos subyacentes. La demencia vascular (VaD) es la segunda causa de demencia (20%) después de AD, Figura 1. La mayor frecuencia de casos de VaD coincide con el envejecimiento de la población y se ve incrementado en aquellos pacientes con antecedentes de enfermedades cerebrovasculares. Los factores de riesgo para este padecimiento son: hipertensión, hiperlipidemia, diabetes mellitus y factores de conducta como obesidad y sedentarismo, Figura 2. La disfunción cerebrovascular y la alteración de la barrera hematoencefálica comprometen al microambiente cerebral y aumenta la vulnerabilidad de estructuras como la neocorteza, hipocampo, materia blanca subcortical entre otras, al daño por un proceso de isquemia – hipoxia que conllevan a disfunción neuronal y deficiencia cognitiva (3).

Para el diagnóstico de demencia la atención debe enfocarse hacia la presencia de alteraciones cognitivas en el paciente. Estas alteraciones se clasifican en cinco dominios principales: memoria, funciones ejecutivas, lenguaje, habilidades visoespaciales, personalidad y comportamiento (3, 4).

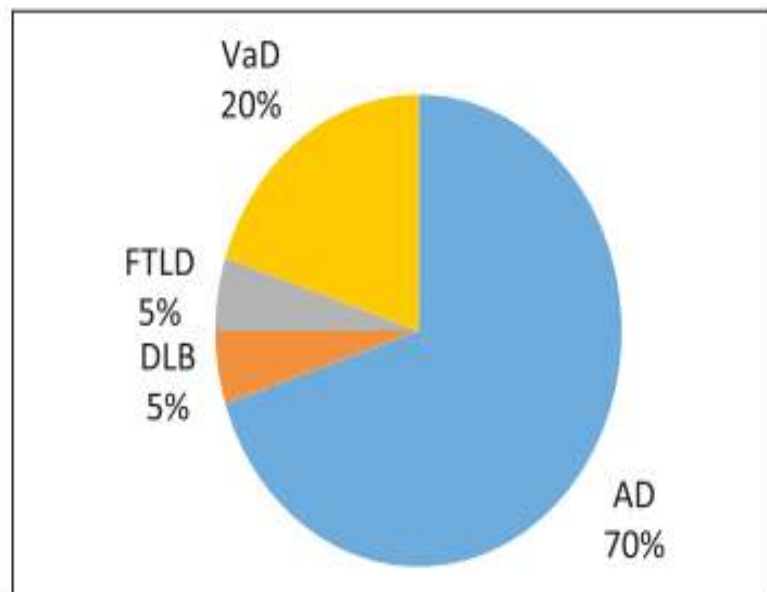


Fig. 1. Frecuencia estimada de demencia causada por diferentes enfermedades. Enfermedad de Alzheimer (AD), Demencia Vascular (VaD), Demencia Frontotemporal lobar (FTLD), Demencia con cuerpos de Lewy (DLB) (3).

Tabla No. 1. Criterios clínicos de diagnóstico para demencia.

Tipo de Demencia	Definición	Criterio de diagnóstico
Enfermedad de Alzheimer (AD)	Presencia de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares en áreas asociativas corticales que ocasionan deterioro cognitivo	Déficits de memoria + déficits en al menos otro dominio cognitivo
Demencia Vascular (VaD)	Trastornos cerebrales en los que el deterioro cognitivo es atribuible a patologías cerebrovasculares	Clara relación temporal entre el evento vascular y la aparición de déficits cognitivos.
Demencia con cuerpos de Lewy (DLB)	Presencia en las neuronas corticales de cuerpos de Lewy (inclusiones citoplasmáticas eosinófilas compuestas de α -sinucleína, ubiquitina y proteínas de neurofilamento) que ocasionan deterioro cognitivo y motor	Déficits de atención, disfunción ejecutiva, déficits visoespaciales, Cognición fluctuante, alucinaciones visuales, parkinsonismo, trastorno de conducta del sueño (REM).
Demencia Frontotemporal Lobar (FTLD)	Atrofia de las células nerviosas en lóbulos temporales lo que ocasiona déficits cognitivos (Cambios en personalidad y comportamiento, dificultades en lenguaje).	Desinhibición conductual, apatía o inercia. La pérdida de simpatía o empatía o comportamiento compulsivo. La disfunción ejecutiva con relativa conservación de la memoria episódica y habilidades visoespaciales.

Información tomado de (3, 5)

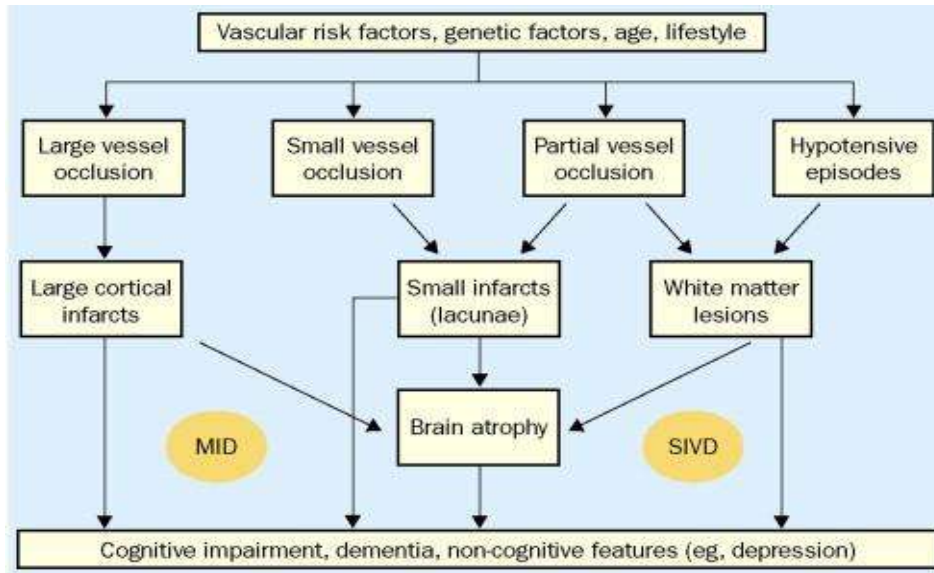


Fig. 2. Principales mecanismos fisiopatológicos en el deterioro cognitivo vascular. MID = demencia multi-infarto; SIVD = enfermedad vascular isquémica subcortical (4).

2. DEMENCIA VASCULAR

VaD forma parte de un grupo heterogéneo de trastornos cerebrales en los que el deterioro cognitivo es atribuible a patologías cerebrovasculares. Su diagnóstico debe basarse en 2 factores: demostración de la presencia de un trastorno cognitivo mediante pruebas neuropsicológicas con antecedentes de accidente cerebrovascular o presencia clínica de enfermedad vascular mediante técnicas de neuroimagen que sugiere una relación entre el desarrollo cognitivo y la enfermedad vascular (6-8).

2.1 Deterioro cognitivo en demencia vascular

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 (4, 9).

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 pueden afectar en grado variable y en combinaciones acorde al tamaño y localización de la lesión cerebrovascular (9).

3. METABOLISMO CEREBRAL

El cerebro es extremadamente vulnerable a las alteraciones de flujo sanguíneo, en condiciones normales utiliza glucosa y oxígeno que deben ser suministrados de manera continua a través del flujo sanguíneo de las arterias carótidas y vertebrales (50-60ml/100g/min), como sustratos para la síntesis de ATP necesario para el funcionamiento celular (10).

Teniendo en cuenta la importancia vital de la irrigación sanguínea cerebral para la integridad estructural y funcional del cerebro, no es sorprendente que las alteraciones en los vasos sanguíneos cerebrales tienen un profundo impacto sobre la función cognitiva. Las alteraciones vasculares que causa el deterioro cognitivo son diversas, e incluyen condiciones sistémicas que afectan a la perfusión cerebral global o alteraciones que implican los vasos sanguíneos cerebrales, más comúnmente arteriolas o vénulas (7).

4. FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPOPERFUSIÓN CEREBRAL CRÓNICA

La disfunción endotelial es considerada el primer paso en el desarrollo de aterosclerosis y da lugar a la sobreexpresión de citocinas pro inflamatorias favoreciendo la acumulación de monocitos en la placa aterosclerótica y la sobreproducción de radicales libres, resultado de una disfunción mitocondrial. En plasma de pacientes que padecen VaD se han encontrado concentraciones elevadas de citocinas pro inflamatorias (IL1,IL6, TNF α) así como citocinas antiinflamatorias (IL10) (11).

El Sistema nervioso central (SNC) requiere del suministro continuo de glucosa y oxígeno. Cualquier reducción en el flujo sanguíneo cerebral (CBF) altera la función neuronal y ocasiona daño cerebral. Los mecanismos de control cerebrovascular aseguran un suministro acorde a las demandas energéticas de las diferentes estructuras que conforman el Sistema nervioso. Diversos factores de riesgo como hipertensión, aterosclerosis, Diabetes mellitus entre otras patologías o estilos de vida no saludables como el sedentarismo y la obesidad alteran de manera progresiva estos mecanismos reguladores del CBF ocasionando una disminución en el suministro de sangre al cerebro (6).

La VaD es el resultado de una amplia variedad de enfermedades cerebrovasculares que derivan en la neurodegeneración y se manifiestan como alteraciones cognitivas o funcionales en el sujeto. La reducción en un 40 a 50 % del flujo sanguíneo está relacionado con la disfunción cognitiva. Múltiples evidencias, indican que las neuronas, glía y células de los vasos sanguíneos, actúan como una unidad integrada participando en la regulación del flujo sanguíneo cerebral (unidad neurovascular). La actividad neuronal induce la liberación de mediadores vasoactivos tales como óxido nítrico (NO), prostanoïdes, monóxido de carbono, iones como H⁺ y K⁺ que actúan en la vasculatura cerebral para mediar los cambios hemodinámicos resultado de alteraciones en el CBF (12, 13).

Cambios en el funcionamiento de la unidad neurovascular ponen en riesgo la función cerebral alterando la regulación del flujo sanguíneo, la función normal de la barrera hematoencefalica y reduciendo el potencial de reparación del cerebro dañado (6) .

Además del daño a la materia gris, también se presenta alteraciones en la materia blanca lo que ocasiona un efecto profundo en la calidad de la transferencia de información, actividad fundamental en la función cerebral (6, 13).

Los tractos mielinizados son responsables para la conectividad, sincronización interhemisférica así como mecanismos de plasticidad y transporte axonal. La hipoperfusión cerebral ocasiona lesiones en la materia blanca (leucoaraiosis), provocando pérdida de la conectividad, neuroplasticidad y pérdida de habilidades motoras entre otras alteraciones (12).

La disminución del aporte de oxígeno y glucosa causada por la isquemia en el tejido cerebral resulta en alteraciones de la homeostasis, ocasionando cambios patológicos y deficiencias cognitivas, que abarcan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inflamación, disfunción mitocondrial y de la neurotransmisión, alteración del metabolismo de los lípidos y de los factores de crecimiento (6).

4.1 Enfermedades neurodegenerativas: Envejecimiento y Demencia Vascular

La homeostasis del estado REDOX es un mecanismo complejo que puede resumirse como el mantenimiento del balance entre la generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS, principalmente originadas en la mitocondria como subproductos del metabolismo incluyen los radicales libres (ion superóxido, ion hidroxilo) y no radicales como el peróxido de hidrogeno. Si bien los ROS tienen un papel fundamental en procesos fisiológicos y de señalización celular, son especies muy reactivas que pueden dañar

proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico con alteraciones críticas para el funcionamiento celular. Los sistemas antioxidantes de defensa compuestos por antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos (glutación, superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutación peroxidasa (GPx) protegen a la célula de los daños relacionados con ROS. Si la homeostasis del estado REDOX falla, los sistemas antioxidantes no son suficientes para contrarrestar la elevada producción de ROS, lo que conlleva a el establecimiento de estrés oxidativo. El balance entre oxidantes y antioxidantes no es una condición estática y un gran número de estímulos puede interferir en el estado REDOX. La participación de estrés oxidativo y sus efectos nocivos en el funcionamiento celular están presentes en el envejecimiento, así como en una variedad de enfermedades; como diabetes, aterosclerosis, deterioro cognitivo leve, enfermedad de Parkinson, y otras enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Huntington y esclerosis lateral amiotrófica. Adicionalmente, el estrés oxidativo está relacionado con las dos principales tipos de demencia: la enfermedad de Alzheimer (AD) y la demencia vascular (VaD). La participación del estrés oxidativo en múltiples enfermedades neurodegenerativas resulta de la elevada susceptibilidad del encéfalo a la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a:

- 1.- Es un tejido rico en ácidos grasos, sensibles a la peroxidación.
- 2.- Es un tejido con actividad antioxidante moderada.
- 3.- Es un tejido que por su actividad metabólica consume una elevada cantidad de oxígeno, lo que lo expone a una acumulación de radicales libres.

Concentraciones elevadas de marcadores periféricos de estrés oxidativo y una capacidad antioxidante baja se han reportado en pacientes deterioro cognitivo leve, AD de inicio tardío y DaV, estos tres desordenes comparten una patología común de relacionada con estrés oxidativo (12, 14).

5. APRENDIZAJE Y MEMORIA

El aprendizaje y la memoria son el medio principal de adaptación de los seres vivos a las modificaciones de su medio ambiente (15, 16).

El aprendizaje es el proceso mediante el cual se adquieren nuevos conocimientos acerca del mundo que nos rodea. Es el medio más importante en que los sucesos ambientales modelan la conducta (17, 18), de esta manera las experiencias producen cambios en el SNC, que pueden ser duraderos y se manifiestan en el comportamiento de los organismos (15).

La memoria es el proceso a través del cual la información aprendida es almacenada y posteriormente recuperada, es la capacidad de retener y de evocar eventos del pasado, mediante procesos de almacenamiento y recuperación de información que ocurren el SNC. Consta de tres fases temporales: una memoria inmediata, relacionada con los registros sensoriales; en respuesta a estímulos internos (sensaciones, emociones, pensamientos) y externos (visuales, espaciales, motores); una memoria a corto plazo o mediata (se basa en cambios efímeros, eléctricos o moleculares en las redes neuronales implicadas), es decir, la información almacenada inicialmente de forma hábil y transitoria, que puede convertirse en una memoria de larga duración (basada en cambios estructurales persistentes, por

ejemplo, formación de nuevas espinas dendríticas), también llamada memoria diferida. Si no se consolida la memoria, la información se pierde (19, 20).

El establecimiento de la memoria está integrado por tres procesos básicos: codificación de la información; almacenamiento de la información, y evocación o recuperación de la información. La memoria se ha clasificado también con respecto a si su adquisición y recuerdo involucran la conciencia del individuo en: memoria implícita (MI) y memoria explícita (ME). La MI, también llamada memoria de procedimiento, es la información que nos permite ejercer hábitos cognoscitivos y motores. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica. Se manifiesta en forma inconsciente y es difícil de explicar con palabras o mediante escritura. La ME, es el almacenamiento de conceptos referidos a objetos (memoria semántica) y a eventos (memoria episódica), se adquiere en uno o en pocos ensayos, y puede expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original, se manifiesta conscientemente y es fácil de declarar verbalmente o por escrito. Este tipo de memoria, resulta del aprendizaje de relación, que consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información. El procesamiento de éste tipo de información está relacionado con el hipocampo (15, 19).

6. HIPOCAMPO

La formación hipocampal es una estructura cerebral bilateral, subcortical presente en todos los mamíferos, compuesta de seis regiones citoarquitectónicas distintas que incluyen el giro dentado, el hipocampo, subículo, presubículo, parasubículo y corteza Entorrinal (21).

El hipocampo también es conocido como *Cornu Ammonis* (CA) de acuerdo a la nomenclatura anatómica antigua. La terminología del cuerno de Ammón origina la denominación de las cuatro regiones en que se divide el hipocampo: sectores CA1, CA2, CA3 e hillus. El 90% de las neuronas presentes en las regiones CA son de tipo piramidal. Toda la información que llega al hipocampo lo hace vía las cortezas perirrinal y entorrinal (cortezas de asociación); áreas corticales anatómicamente inmediatas al hipocampo en el lóbulo temporal (21, 22).

Esta estructura cerebral recibe información procedente de todas las áreas asociativas corticales a través de la vía perforante originada en la corteza entorrinal. La vía perforante proveniente de la corteza entorrinal hace sinapsis con las células granulares del giro dentado (GD). Las células granulares, a su vez proyectan un haz de fibras llamadas musgosas hacia las células piramidales de la región CA3. La base del soma de las células piramidales de CA3 da origen al axón el cual se bifurca en una rama colateral de Schaffer que hace sinapsis con las células piramidales del sector CA1 del hipocampo y otra rama que, después de cursar por el estrato oriens pasa al fornix que constituye la principal vía eferente del hipocampo (18, 21).

El hipocampo es una estructura esencial para los procesos de aprendizaje y memoria. La lesión del hipocampo, así como cualquiera de sus aferentes principales produce deficiencia cognoscitiva (23).

Los resultados de diversos estudios en animales de experimentación y en humanos han demostrado la participación del hipocampo en procesos de memoria y aprendizaje. En conjunto con la neocorteza el hipocampo es una estructura clave en la fijación de los trazos de memoria y la selección de información. Los diferentes sectores del hipocampo se involucran en el desarrollo de procesos de adquisición y consolidación de memoria, con la participación de diferentes sistemas de neurotransmisión (23, 24).

Los trastornos cognitivos son fenómenos complejos que alteran muchas estructuras cerebrales asociadas entre ellas con funciones mentales. Las alteraciones conductuales están invariablemente acompañadas por cambios neurodegenerativos en los sectores de CA1-hilus y el giro dentado del hipocampo (17, 24).

7. MODELO DE HIPOPERFUSIÓN CEREBRAL CRÓNICA (CCH)

La oclusión permanente y bilateral de las arterias carótidas comunes de ratas (oclusión de 2 vasos -2VO-) es ampliamente aceptada como un procedimiento experimental adecuado para modelar CCH, como ocurre en el envejecimiento humano y estadios de demencia (25). Esta hipoperfusión mantiene un estado crónico de hipoglucemia moderada, una condición fisiopatológica muy parecidas a CCH presente en el envejecimiento humano y la demencia (26).

En estas condiciones se han observado diversas alteraciones progresivas del funcionamiento cerebral que incluyen: la pérdida neuronal de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo, deterioro de las funciones cognoscitivas de aprendizaje y memoria espacial y memoria de trabajo, la reducción de la actividad de la acetilcolin-transferasa en el hipocampo (27, 28).

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 (25, 29).

La rata es una especie de roedor adecuado para el modelo de 2VO debido a que el círculo de Willis proporciona un incesante (reducido) flujo de sangre después de la oclusión de 2VO en comparación con otras especies, con buena tasa de recuperación de la cirugía, supervivencia, costos bajos y aceptación ética. En dicho modelo los métodos quirúrgicos, la ligadura permanente de las arterias carótidas, los factores que se agravan (hipotensión o hipoxia) y los animales de experimentación (ratas) son bastante tolerables por lo cual es considerado desde el punto de vista técnico viable (25, 28, 29).

Existen varias razones que justifican la elección del hipocampo como una estructura cerebral para el estudio de la neurodegeneración inducida por el modelo de CCH. El hipocampo, es una de las estructuras que presenta el daño neuropatológico característico

en demencia y AD. El hipocampo es una estructura relacionada directamente con el aprendizaje espacial, habilidad que puede ser valorada experimentalmente con el empleo del Laberinto Acuático de Morris (MWM). Por este motivo, el daño neuronal en el hipocampo y la alteración del aprendizaje espacial están relacionados. Adicionalmente, el sector CA1 del hipocampo, constituido por neuronas piramidales, es una de las regiones cerebrales más sensibles a la isquemia, con una estructura laminar que facilita su estudio (25, 30).

8. NEUROPROTECCIÓN

Puede definirse como cualquier estrategia, o una combinación de estrategias, que antagoniza, interrumpe o retrasa la secuencia de eventos bioquímicos y moleculares perjudiciales que, si no se controla, podría conducir en lesión isquémica irreversible. Se ha consolidado la propuesta de la existencia de una “ventana de oportunidad terapéutica” importante para las posibilidades de éxito de los procedimientos de neuroprotección (31).

Así, los procedimientos de neuroprotección se sustentan en la relación de oposición entre los mecanismos fisiopatológicos de daño celular y la característica del mecanismo de acción del fármaco neuroprotector (31, 32).

ANTECEDENTES

Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina) es 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 el fotoperiodo tales como ritmos circadianos o estacionales (33).

La melatonina se sintetiza a partir de la serotonina a través de dos reacciones catalizadas por enzimas. Una vez formada, difunde hacia los capilares sanguíneos y líquido cefalorraquídeo (LCR), llegando en primer lugar al tercer ventrículo seguido de los ventrículos laterales. Ya que la melatonina logra atravesar con facilidad las membranas biológicas, en el tejido nervioso alcanzara concentraciones mayores que en otros tejidos del organismo (34). De hecho, la concentración de melatonina en el LCR es 5 a 10 veces mayor que la concentración sanguínea de manera simultánea (35).

La melatonina participa en una amplia variedad de funciones como: la regulación circadiana y estacional, regulación del sueño, sistema inmune, inhibición del crecimiento tumoral, regulador de la presión arterial y atrapador de radicales libres (35).

La melatonina participa en muchos de estas acciones a través de mecanismos mediados por receptores de membrana como MT_1 y MT_2 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 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 proteína cinasa C (34). De acuerdo a lo investigado, en la acción antioxidante de la melatonina no participan ninguno de los receptores mencionados (36).

La mayor parte del oxígeno tomado por la célula es rápidamente convertido a agua durante la respiración mitocondrial. Sin embargo 3-5% es convertido a especies reactivas de oxígeno (ROS) que facilitan la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) a partir de óxido nítrico (ON). La cadena de transporte de electrones es la principal fuente de ROS en la célula en particular los complejo I y II (37).

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 (38). La administración de 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 sugiere que la melatonina interactúa con los complejos de la cadena de electrones donando electrones y como un intermediario oxidado, aceptar electrones, ambas acciones favorecen el flujo de electrones (39, 40).

Adicionalmente, un efecto antioxidante indirecto de la melatonina, es el aumento de la concentración de glutatión reducido (GSH) y disminución de la concentración de glutatión oxidado (GSSG) en la mitocondria así como la disminución de hidroperóxidos. Existen evidencias respecto a que la melatonina previene la lipoperoxidación de los lípidos

de membrana, previene la oxidación del DNA mitocondrial y nuclear inducidos por estrés oxidativo y ha mostrado en diversos sistemas experimentales propiedades antiapoptóticas (40-42).

Harman propuso a inicio del 1981 (43), que la mitocondria es el sitio principal del ataque por radicales libres y esto conlleva al envejecimiento. El exceso de producción de ROS y la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial es el factor principal para el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. La expresión de genes del DNA mitocondrial dañado dan origen a la síntesis de subunidades proteicas alteradas, que formaran parte de las enzimas de la cadena respiratoria. El funcionamiento irregular de la cadena de transporte de electrones no solo disminuye la síntesis de ATP sino aumenta la generación de más ROS que participaran en el daño oxidativo de macromoléculas. Este ciclo vicioso causa una declinación de las funciones bioenergéticas llevando al desarrollo de cambios degenerativos asociados a la edad. Elevadas concentraciones de ROS y RNS inducen apoptosis ya sea por alteración del flujo de electrones, con la modificación del potencial de protones y la apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria, o por cambio de las capacidades celulares del mantenimiento del equilibrio de óxido- reducción y por lo tanto el desgaste de glutatión reducido, disminución en la concentración de ATP, y de las coenzimas NADH y NADPH (44). La acción de la melatonina en el restablecimiento normal de la actividad del complejo I es una acción preventiva en los cambios degenerativos asociados al envejecimiento (45).

Las neuronas son células selectivamente vulnerables a daño o muerte debido a su elevada demanda de energía y su composición química que las caracteriza. La muerte o daño

neuronal a menudo se manifiesta en el individuo como una alteración en la conducta o procesos fisiológicos críticos para la vida. Muchos eventos agudos tales como hipoxia, isquemia focal, traumatismo físico, hipoglicemia, neurotoxicidad por fármacos, virus, radiación o estímulos dañinos, son suficientes para producir daño neuronal. Mecanismos similares al parecer están involucrados en alteraciones neurodegenerativas, un grupo de enfermedades crónicas y progresivas que se caracterizan por la pérdida selectiva y simétrica de neuronas pertenecientes a sistemas motores, sensoriales o cognitivos. Ejemplos clínicos relevantes de estos padecimientos son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y corea de Huntington entre otras (39). Aunque el origen de las enfermedades neurodegenerativas no es preciso, tres procesos frecuentemente interrelacionados, están presentes: excitotoxicidad por glutamato, daño neuronal con la participación de radicales libres y disfunción mitocondrial (46). 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 antiexcitatorias y en dosis suficientes, efectos sedantes (47, 48), así que la melatonina tiene un efecto neuroprotector relacionado con el sistema GABAérgico, mostrado en estudios de neuroprotección donde la melatonina protege a las neuronas de la toxicidad del péptido β -amiloide a través de la activación de receptores GABA(49).

Estudios empleando Kainato, agonista de los receptores inotrópicos del glutamato, dan apoyo a esta hipótesis de que la melatonina previene la muerte neuronal inducida por glutamato (50). Además se ha reportado en diversos estudios que la administración de

melatonina reduce el daño de neuronas del segmento CA1 del hipocampo causada por isquemia cerebral focal (51-53) e isquemia cerebral global (53-55).

Como apoyo a estos estudios, animales sometidos a isquemia cerebral focal o convulsiones por excitotoxicidad y deficientes en melatonina, presentaron daño cerebral más severo y neurodegeneración, sugiriendo que la carencia de melatonina potencia el daño neuronal (56).

En el contexto del estrés oxidativo, el cerebro es particularmente vulnerable al daño ya que su composición abundante en fosfolípidos y proteínas lábiles a daño oxidativo y no posee concentraciones elevadas de enzimas antioxidantes. La melatonina protege contra el daño por isquemia cerebral focal o global a través de sus potentes efectos como antioxidante directo atrapando ROS y RNS o indirecto mejorando la eficacia de la cadena de transporte de electrones, reduciendo el daño oxidativo mitocondrial, aumenta la síntesis de ATP y modula el metabolismo energético mitocondrial (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 persisten en dichos metabolitos. Tal es el caso de la forma cíclica, 3 hidroximelatonina AFMK y AMK. De tal manera que la interacción de la melatonina con los radicales libres inicia una cascada antioxidante (57).

La muerte por apoptosis requiere de la síntesis de RNA y proteínas. Los factores neurotróficos rescatan a las neuronas de este tipo de muerte por la activación vía celular

de componentes antiapoptóticos como Bcl-2 (proteína del protooncogen del linfoma de células B). En el sistema nervioso central, la función neuroprotectora de Bcl-2 está demostrada en estudios que de manera natural o inducida promueven la muerte neuronal, la cual es prevenida por la sobreexpresión de Bcl-2. Bcl-2 es capaz de suprimir la vía apoptótica a través de la supresión de la formación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (mtPTP) y de esa manera evitar la liberación de la enzima mitocondrial Citocromo C, cuya salida representa la señal final para la iniciación de la apoptosis. Estudios in vitro muestran que la melatonina favorece la expresión de Bcl-2y previniendo así la apoptosis (57, 58).

Por lo anterior, la melatonina puede prevenir tres de los procesos principales de daño neuronal: excitotoxicidad por glutamato, daño mediado por radicales libres y apoptosis. Por lo cual la melatonina es un agente cronobiótico y citoprotector (59).

La mayor incidencia de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica o procesos de isquemia cerebral, presentan estrés oxidativo, como parte de los mecanismos fisiopatológicos que las caracterizan. El daño oxidativo causados por la presencia de radicales libres en moléculas como proteínas, DNA, lípidos y carbohidratos de las neuronas conforme avanza la edad resulta en el desencadenamiento de varias enfermedades neurodegenerativas dependiendo de la región cerebral específica donde la generación de radicales libres sea mayor (46, 60).

El sistema nervioso central es altamente susceptible a el estrés oxidativo debido a su alta tasa de consumo de oxígeno (el cerebro emplea cerca del 20% del oxígeno total) lo que favorece una generación de radicales libres mayor. Adicionalmente se caracteriza por su elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados, factor que favorece el daño oxidativo (59).

La prevención de enfermedades neurodegenerativas se ha convertido en un problema prioritario de salud. La recomendación del consumo regular de vitaminas E y C por los adultos mayores como una medida preventiva de la aparición de enfermedades neurodegenerativas. En este aspecto, la melatonina es importante ya que es una molécula que se sintetiza de manera endógena y su síntesis disminuye gradualmente con la edad, siendo una causa primaria del aumento de estrés oxidativo durante el envejecimiento con una mayor incidencia de enfermedades neurodegenerativas comunes en este periodo de la vida (61, 62). Diversos estudios en modelos experimentales han mostrado que la deficiencia de melatonina favorece las alteraciones neurodegenerativas mientras que la administración de melatonina previene el daño (59).

El envejecimiento se ha asociado con una disminución en la síntesis de melatonina. La alteración del ritmo de secreción de melatonina puede ser un factor que contribuye a mayores niveles de estrés oxidativo y los cambios degenerativos asociados a la vejez (63).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en las evidencias que señalen el papel del estrés oxidativo, la inflamación y mecanismos apoptóticos como parte de la fisiopatología de la DaV y en resultados experimentales que sustentan el efecto de la melatonina como captador de radicales libres y coadyuvante en la activación de enzimas antioxidantes, existe la posibilidad de que este compuesto pueda prevenir el daño dependiente de los radicales libres en las estructuras cerebrales del sistema nervioso vulnerables luego de una hipoperfusión cerebral crónica (CCH).

JUSTIFICACIÓN

La disminución moderada pero persistente del flujo sanguíneo cerebral (hipoperfusión) conlleva a alteraciones del aprendizaje y memoria y contribuye al desarrollo de demencias progresivas.

Hay evidencia que sustenta el papel de la melatonina como un potente antioxidante, antiinflamatorio y antiapoptótico.

No existe antecedente de un modelo experimental de oclusión de en ratas para el estudio de la respuesta neuroprotectora con melatonina en dicho modelo al someter a ratas a hipoperfusión cerebral crónica.

No existe antecedente de la administración de melatonina vía intravenosa por medio de bombas osmóticas ALZET 2ML1 en dicho modelo experimental.

HIPÓTESIS

Existe un efecto neuroprotector de la melatonina en ratas sometidas a un modelo de hipoperfusión cerebral crónica (CCH) por oclusión bilateral de las arterias carótidas comunes (2VO).

OBJETIVO

General: Evaluar a largo plazo, el efecto neuroprotector de la melatonina en animales de experimentación sometidos a CCH por el modelo 2VO con y sin tratamiento neuroprotector con melatonina en comparación con animales intactos.

Específicos:

1. Implementar un procedimiento de administración de melatonina por infusión intravenosa continua mediante el empleo de bombas osmóticas Alzet 2ML1, durante 7 días.
2. Evaluar la eficiencia del aprendizaje espacial en el Laberinto Acuático de Morris a largo plazo luego de la hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento neuroprotector con melatonina.
3. Evaluación histológica del conteo neuronal de las células piramidales del hipocampo del sector CA1 del cuerno de Ammón, luego de la hipoperfusión cerebral crónica y tratamiento neuroprotector con melatonina, en los 3 grupos experimentales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratas macho Sprague–Dawley adultas, con un peso corporal entre 400– 600g, de seis meses de edad aproximadamente, alimentadas *Ad libitum* y conservadas en condiciones controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) e iluminación (ciclo de 12h luz/ 12h oscuridad) que fueron sometidas a una de las siguientes condiciones experimentales y a los procedimientos que se describen a continuación:

SHAM (n=8): Animales sometidos a las maniobras simuladas del modelo modificado de CCH por el modelo 2VO, sin interrumpir el flujo sanguíneo cerebral.

2VO + VEH(n=8): Animales sometidos a CCH por el modelo modificado de 2VO sin tratamiento con melatonina.

2VO + MEL(n=8): Animales sometidos a CCH mediante el modelo modificado de 2VO con administración de melatonina.

2. Modelo modificado de hipoperfusión cerebral crónica mediante la oclusión de las arterias carótidas comunes.

El episodio de CCH fue provocado siguiendo el procedimiento previamente descrito por otros autores (64) e implementado en el laboratorio. Bajo anestesia con Xilacina (10 mg/kg, i.m.) y Ketamina (90 mg/kg, i.m.) a través de una incisión en la línea media ventral del cuello, se localizaron las arterias carótidas comunes y se separaron del nervio vago. La arteria carótida derecha fue ocluida con una doble ligadura (65), se cortó la arteria entre

las dos ligaduras y se suturó la herida. Una semana después se realizó una nueva incisión y el mismo procedimiento fue realizado a la arteria carótida izquierda (64–66). Posterior a la cirugía los animales se hidrataron con solución salina isotónica (SSI) sc y se administró i.m. antibiótico y antiinflamatorio. Se mantuvo su temperatura corporal a $37.5 \pm 0,5$ °C, mediante manta de calentamiento para permitir su recuperación total.

3. Administración crónica por vía intravenosa mediante Bombas Alzet.

Melatonina (sigma, ST Louis. Mo, USA), 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 µL/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.

3.1 Preparación e implantación de las bombas ALZET 2 ML1

De acuerdo a las indicaciones del proveedor, cada bomba se llenó con la solución estéril de melatonina o vehículo utilizando una jeringa. Las bombas fueron incubadas por 4 horas en solución salina isotónica estéril en un baño María a 37 °C. Las bombas osmóticas Alzet fueron implantadas subcutáneamente en los animales de la siguiente manera:

- a) Se anestesió la rata y mediante procedimiento quirúrgico se localizó y disecó la vena yugular derecha. Se hizo una incisión en la vena a través de la cual se insertó un catéter (Cly Adams, PE-50. Bectom Dickison and Company, Sparks, MD, USA. Heparina en salina 100 U/mL) y se fijó mediante sutura. El extremo libre del catéter se dirigió subcutáneamente a la altura de la nuca.
- b) En el dorso de la rata se realizó una incisión y se disecó el tejido celular subcutáneo en la región intraescapular hasta formar una bolsa que albergó la bomba durante 7 días.
- c) El extremo libre de la cánula proveniente de la vena yugular se unió a la bomba y ésta se colocó y fijó en el tejido disecado previamente. Se suturaron las heridas. Se administró antiinflamatorio, analgésico y antibiótico i.m. a todos los animales.

4. Evaluación funcional del hipocampo. Pruebas de aprendizaje y memoria espaciales.

Se utilizó el MWM (67) que consiste en una tina circular de 140 cm y 50 cm de altura llena 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 el cuadrante NE. A los 15 días post-2VO, cada rata fue sometida a 2 ensayos diarios durante 7 días que consistieron en lo siguiente: 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 s luego de los cuales la rata fue guiada hacia la plataforma donde se le permitió permanecer por 10 s. Al término del ensayo, la rata fue retirada de la plataforma y colocada en su caja de mantenimiento por 20 min antes del segundo ensayo. El punto de inicio de la prueba para cada animal en los siete días fue diferente y elegido al azar y la posición de la plataforma permaneció constante. Los objetos del cuarto de experimentación y 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, y a partir de las grabaciones que fueron analizadas por el programa Sciwork, se obtuvieron las imágenes de las trayectorias de nado y los valores de latencia de escape (tiempo que tarda el animal en localizar la plataforma), para evaluar el aprendizaje espacial. Las latencias de escape (s) fueron determinadas para cada ensayo y los datos de ambos ensayos de cada día fueron promediados. Con estos datos, se calculó la mediana de las latencias de escape de cada día, para cada condición experimental.

Al día siguiente (día 8) se realizó la prueba de transferencia en la que se retiró la plataforma y el animal debió nadar durante 30 s. Se registró la trayectoria de nado del animal y a partir de ella, el tiempo de permanencia de la rata en el sitio previamente ocupado por la plataforma, para evaluar la memoria espacial.

5. Evaluación de la población neuronal del hipocampo. Técnica de Nissl.

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 post- fijados por inmersión en formaldehído al 4% amortiguado por un mínimo de 24h.

Se realizaron cortes coronales que comprendían al hipocampo. La porción obtenida (4 mm de grosor) fue sometida a un proceso de deshidratación y finalmente incluida en parafina. Se obtuvieron cortes de 7µm los cuales fueron teñidos empleando violeta de cresilo al 0,5%, pH 3,9. De cada cerebro se tomaron cortes de hipocampo dorsal localizados entre -3.14mm y -4.52mm a partir de bregma, de acuerdo a las consideraciones estereotáxicas de Paxinos (68). Para el análisis histológico, se seleccionaron 2 por cada 5 cortes hasta terminar el bloque. Las láminas se examinaron al microscopio óptico, a 400X. Empleando el analizador de imágenes de la marca Leica (LAS V4.6). Se contó el número de neuronas piramidales, 4 cortes por rata en una longitud de área de 500 µm de la región CA1 del cuerno de Ammón del hipocampo, únicamente se contaron las neuronas piramidales que mostraban características morfológicas normales (membranas citoplasmáticas y nuclear distinguibles y nucléolo visible). Los conteos del hipocampo de los 4 cortes se promediaron para tener un solo valor por cada animal. Así mismo, se tomaron microfotografías de algunos cortes representativos de cada grupo.

6. Análisis estadístico

Uno de los parámetros conductuales, que no siguen una distribución normal, evaluados en el Laberinto Acuático de Morris, las latencias de escape fueron analizados por pruebas no paramétricas. Las diferencias intragrupalas del primero hasta el día séptimo de la prueba se utilizó la prueba ANOVA de Friedman seguida Wilcoxon de los rangos con signo de muestras relacionadas. Las diferencias intergrupales fueron analizadas por la prueba de U de Mann Whitney.

Los datos mostraron una distribución normal, de modo que se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM) para cada condición experimental. Para la comparación entre grupos se utilizó un ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey. La diferencia se consideró significativa cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efectos de la melatonina sobre las alteraciones del aprendizaje y memoria espacial resultante de la hipoperfusión cerebral crónica.

Aprendizaje espacial

En los 3 grupos experimentales se observó una reducción progresiva de las latencias de escape en los días de prueba (Fig. 3) con valores significativos ($p < 0.05$) desde el día 2 hasta el último día de prueba. Sin embargo en el grupo 2VO + VEH los datos mostraron mayor dispersión de los tiempos de latencia. Solo hubo diferencia significativa intergrupala ($p < 0.05$) en el día 3 del grupo 2VO + VEH vs grupo SHAM y del día 7 vs 2VO + MEL ($p < 0.05$) (Tabla 2).

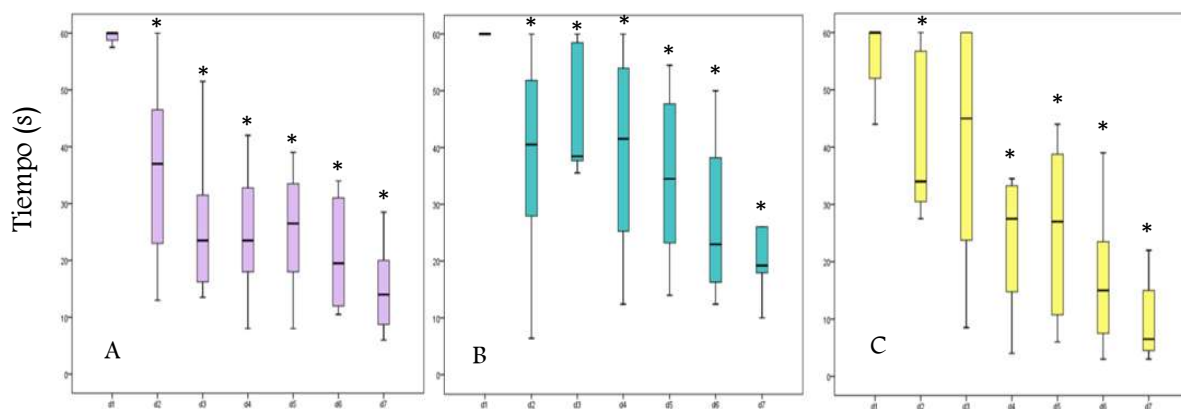


Fig. 3. Latencias de escape intragrupal en el transcurso de 7 días realizados en Laberinto Acuático de Morris (Mediana \pm Rango) 15 días después de la cirugía 2VO, * $p < 0.05$. (Grupo SHAM: A; 2VO + VEH: B; 2VO + MEL: C).

Tabla No. 2. Latencias de escape intergrupar en el transcurso de 7 días realizados en Laberinto Acuático de Morris.

GRUPO	DÍA 1 Tiempo (s)	DÍA 2 Tiempo (s)	DÍA 3 Tiempo (s)	DÍA 4 Tiempo (s)	DÍA 5 Tiempo (s)	DÍA 6 Tiempo (s)	DÍA 7 Tiempo (s)
SHAM	60 (60-57.5)	37 (60-13)	23.5 (51.5-13.5)	23.5 (42-8)	26.5 (39-8)	24 (34-10.5)	10 (28.5-6)
2VO + VEH	60 (60-60)	40.5 (60-6.5)	38.5* (60-35.5)	41.5 (60-12.5)	34.5 (54.5-14)	23 (50-12.5)	19.5[#] (25.5-10)
2VO + MEL	60 (60-43.5)	34 (60-27.5)	45 (60-8.5)	12.5 (34.5-4)	27 (44-6)	15 (39-3)	6.5 (38-3)

Los valores están expresados Mediana ± Rango. Diferencia significativa $p < 0.05$ * en el día 3 2VO + VEH vs SHAM; 2VO + VEH vs 2VO + MEL día 7.

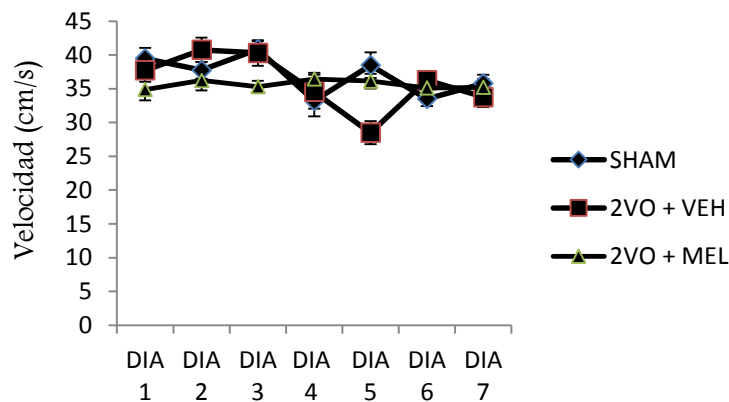


Fig. 4. Velocidad de nado (cm/s) en el transcurso de 7 días realizados en Laberinto Acuático de Morris (Media ± EEM). Sin diferencia significativa entre los grupos analizados.

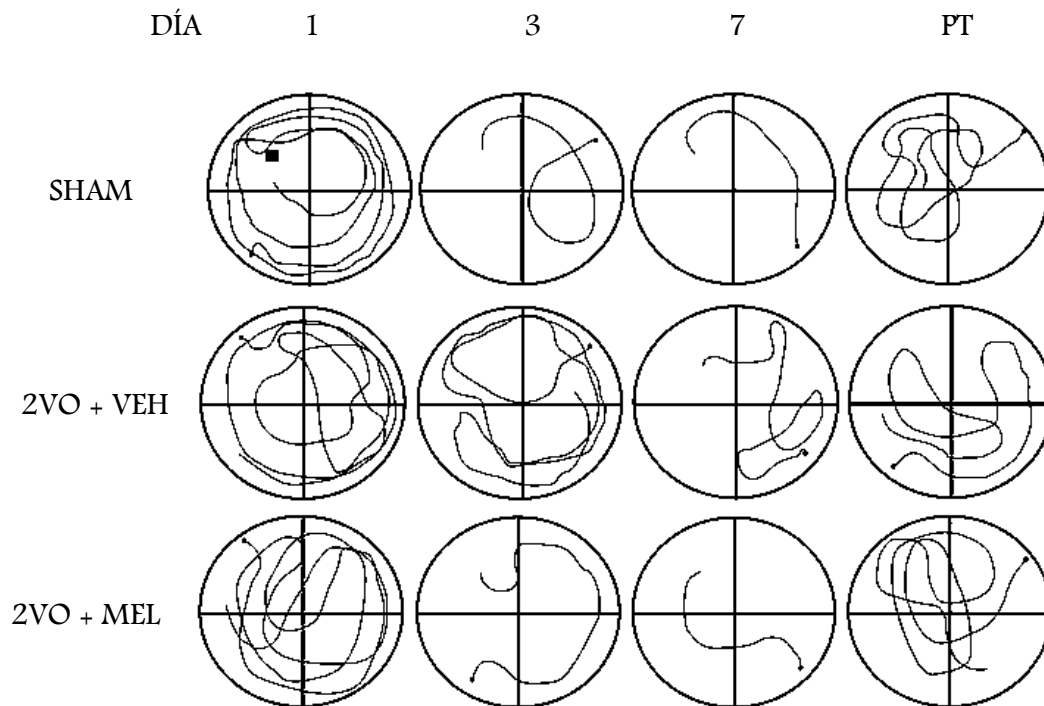


Fig. 5. Trayectorias de nado representativas de los grupos experimentales en el Laberinto Acuático de Morris los días 1, 3 y 7 de prueba, seguido por la prueba de transferencia (PT). Se observa como el grupo 2VO + VEH reduce su distancia hasta el día 7 igual al de los grupos SHAM y 2VO + MEL.

Memoria espacial

En la prueba de transferencia, los animales del grupo 2VO + VEH permanecieron menos tiempo en el cuadrante donde se localizó la plataforma de escape en los días anteriores de la prueba el cual fue significativo ($p < 0.05$) en relación al grupo SHAM, en tanto que las ratas del grupo 2VO + MEL tuvieron un mayor tiempo de permanencia en dicho cuadrante con una significancia mayor ($p < 0.05$) al del grupo 2VO + VEH, sin diferencia significativa respecto al del grupo SHAM.

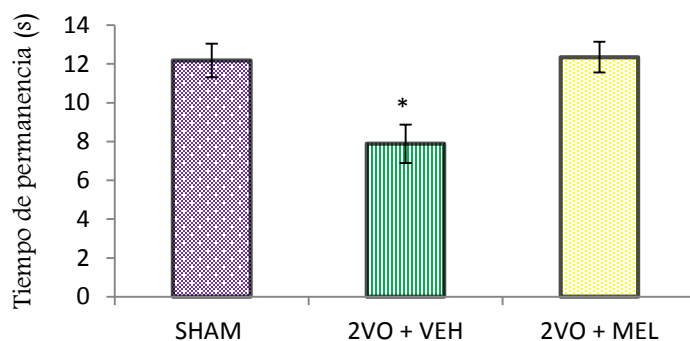


Figura 6. Prueba de transferencia (Media \pm EEM) tiempo de permanencia (s) en el cuadrante donde se localizó la plataforma de escape. La hipoperfusión cerebral crónica alteró la memoria espacial, obteniendo el grupo 2VO + VEH un menor tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo en comparación con el grupo SHAM. El tratamiento con melatonina previno esta alteración, de modo que el grupo 2VO + MEL mostró un mayor tiempo de permanencia en el cuadrante, igual al del grupo SHAM. 2VO + VEH vs SHAM $p < 0.05$; 2VO + VEH vs 2VO+ MEL $p < 0.05$, sin diferencia significativa 2VO+ MEL vs SHAM.

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

La hipoperfusión cerebral crónica ocasionó una pérdida neuronal en el sector CA1 del hipocampo, en el grupo 2VO + VEH a los 24 días post-cirugía (Fig. 7: C, D) con un número de neuronas remanentes (Fig. 8. Media \pm EEM; 115.3 ± 3.1) significativamente menor ($p < 0.05$) en comparación con la población neuronal de las ratas del grupo SHAM (Fig. 8. 161.1 ± 2.9)(Fig. 7: A, B). El tratamiento con melatonina del grupo 2VO + MEL redujó la pérdida neuronal de CA1 (Fig. 7: E, F) de modo que el número de neuronas piramidales (Fig. 8. 155.3 ± 3.2) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el grupo 2VO + VEH, y sin diferencia significativa respecto al grupo SHAM .

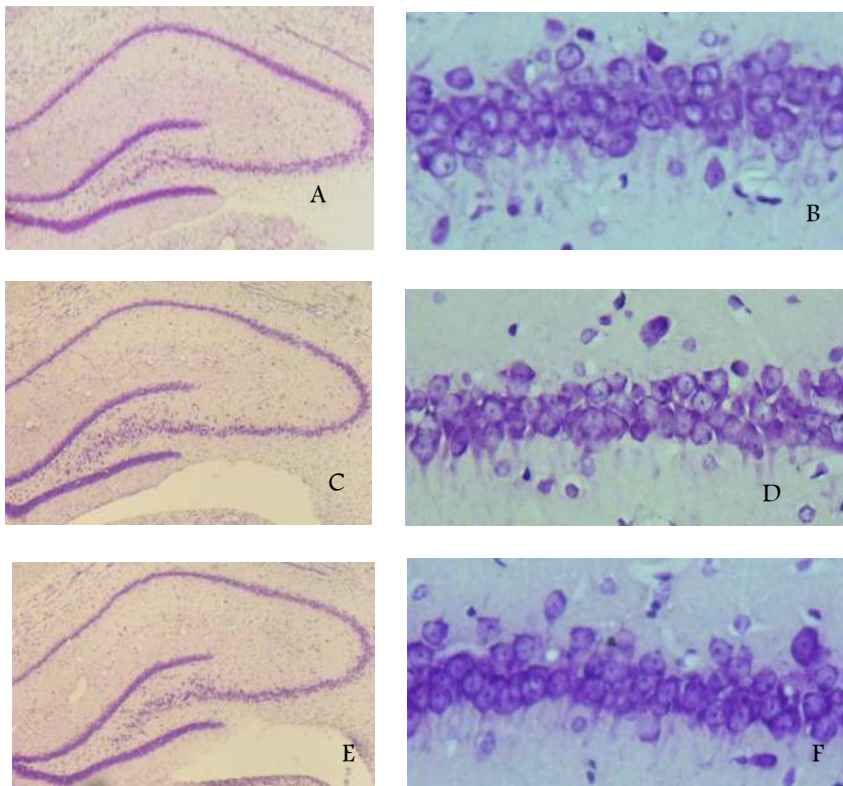


Fig. 7. Fotomicrografías representativa de cortes coronales del hipocampo de cerebro de rata, en imagen panorámica (4X) y en área del segmento CA1 a mayor amplificación (40X), de animales del grupo Sham (A,B), grupo 2VO+VEH (C,D) Y grupo 2VO+MEL (E,F).

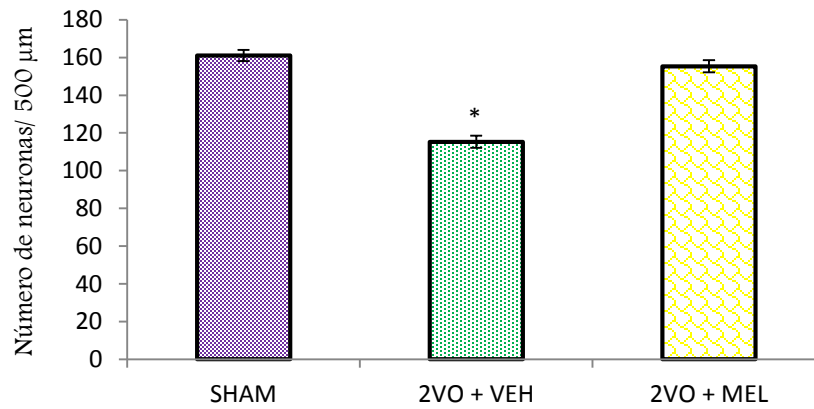


Fig. 8. Número de neuronas piramidales (Media \pm EEM) en un área longitudinal de 500 μ m en el estrato piramidal de CA1 del hipocampo bajo las tres condiciones experimentales. 2VO + VEH vs SHAM $p < 0.05$; 2VO + VEH vs 2VO + MEL $p < 0.05$; sin diferencia significativa 2VO + MEL vs SHAM.

DISCUSIÓN:

Los datos experimentales del presente estudio muestran que el tratamiento crónico con melatonina durante los 7 días posteriores al establecimiento de la hipoperfusión cerebral crónica resultó en una preservación de la población neuronal del sector CA1 del hipocampo, así como un mejor desempeño en las pruebas de aprendizaje espacial. Las evidencias apoyan el efecto neuroprotector de la melatonina contra los mecanismos fisiopatológicos de daño causados por la hipoperfusión cerebral crónica.

La pérdida significativa de neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo ha sido un hallazgo consistente en modelos experimentales de CCH (25-29). Esto es debido a la elevada vulnerabilidad de estas neuronas como consecuencia de alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral. Así, la preservación de la población neuronal del hipocampo dorsal se ha empleado como indicador del efecto neuroprotector de diferentes fármacos, neutralizando el daño iniciado por CCH (64-66).

La hipoperfusión cerebral crónica ocasionó una pérdida neuronal significativa en el sector CA1 del hipocampo (28.4 %) en el grupo 2VO + VEH a los 24 días post-cirugía en comparación con la población neuronal de las ratas del grupo SHAM. En el grupo 2VO + MEL, el tratamiento con melatonina previno la muerte neuronal hasta en un 96% de la población de neuronas piramidales del sector CA1 del hipocampo, sin diferencia significativa respecto al grupo SHAM. De acuerdo a estos datos, la melatonina tuvo un efecto neuroprotector ya que redujo significativamente la pérdida neuronal cuando la melatonina se aplicó por vía intravenosa de forma crónica (7 días) mediante bombas

osmóticas ALZET 2ML1 a una dosis alta (5mg/ml) de melatonina, 24 horas después de la implementación experimental de CCH. Se asume que el tiempo de la administración de melatonina en el presente estudio coincide con la ventana de oportunidad terapéutica para su efecto neuroprotector, y bajo estas condiciones, la acción de la melatonina (31, 32) es exitosa en la prevención de la muerte neuronal, como en estudios previos en varios modelos experimentales de isquemia global y focal (51-55), y conservo las condiciones de sobrevivencia para las neuronas piramidales del hipocampo.

Las acciones antioxidantes de la melatonina incluyendo su capacidad atrapadora de radicales libres y activación de enzimas antioxidantes son las acciones celulares, entre otras, más frecuentemente mencionadas en relación al efecto neuroprotector de la melatonina contra daño isquémico. Así, bajo estas condiciones la melatonina neutraliza la sobreproducción de radicales libres (57-60) y su desfavorable consecuencia en el funcionamiento mitocondrial, previniendo la activación de mecanismos proapoptóticos (40-42), lo cual se agrega a los mecanismos fisiopatológicos que conducen al daño cerebral. Adicionalmente el efecto neuroprotector de la melatonina se atribuye a la preservación del citoesqueleto del daño causado por radicales libres (69) así como en reportes recientes (70) la melatonina favorece la neurogénesis en el hipocampo.

La pérdida neuronal en estructuras cerebrales vulnerables a CCH da lugar a déficits permanentes en el aprendizaje y memoria espacial evaluado a través de MWM. La hipoperfusión cerebral crónica altera el aprendizaje espacial, con latencias de escape mayores en el grupo 2VO + VEH. Los 3 grupos experimentales mostraron una reducción progresiva de las latencias de escape en los 7 días de prueba de manera similar a lo

reportado por otros autores (26, 28, 61, 71) que han empleado el modelo de hipoperfusión cerebral crónica y evaluado mediante la aplicación del MWM. Sin embargo, el comportamiento del grupo 2VO + VEH, fue poco uniforme. Los valores de mediana durante los 6 días de prueba fueron superiores a la de los otros grupos. Por otro lado, los grupos SHAM y 2VO + MEL mostraron un comportamiento similar en la resolución del laberinto tanto en el análisis de las latencias de escape como en las trayectoria de nado. Respecto a la prueba de transferencia, indicadora de memoria espacial, el grupo 2VO + VEH mostro una reducción significativa en su permanencia en el cuadrante de la plataforma. En cambio, en forma similar al grupo SHAM, el grupo 2VO + MEL mostro una búsqueda persistente de la plataforma en el cuadrante, que en los días previos la albergo. La hipoperfusión cerebral crónica altero la memoria espacial mientras que el tratamiento con melatonina previno esta alteración, de modo que el grupo 2VO + MEL mostro un periodo de permanencia en el cuadrante objetivo, similar al del grupo SHAM. Los datos obtenidos en el grupo de animales experimentales tratados con melatonina sugieren que la capacidad de integración neuronal para el aprendizaje y la memoria espacial fueron preservadas por la melatonina.

El estrés oxidativo es un factor clave que contribuye a la neurodegeneración característica de diversas patologías del SNC entre ellas la Demencia Vascular. Por esta razón, la búsqueda de terapias antioxidantes es una estrategia terapéutica novedosa (72).

La melatonina es un potente atrapador de radicales libres, los cuales participan alterando estructuras vitales, su daño acumulativo con la edad toma un significado relevante, no solo para el envejecimiento saludable sino para otras patologías relacionadas con el envejecimiento. En el envejecimiento saludable la secreción de melatonina por la glándula pineal disminuye (61), alterando funciones circadianas como el sueño. En un estudio clínico en adultos mayores con síntomas de demencia, la concentración de melatonina en plasma, es aún menor (73).

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio enfatizan la eficacia de la melatonina en neutralizar los mecanismos fisiopatológicos causados por la hipoperfusión cerebral previniendo el daño progresivo y severo de funciones relacionadas a estructuras vulnerables que en conjunto pueden resultar en demencia vascular y pérdidas de funciones ejecutivas.

Los hallazgos del efecto neuroprotector de la melatonina en un modelo experimental de hipoperfusión cerebral son relevantes para continuar la investigación sobre esta molécula, en vista de su potencial uso clínico como agente terapéutico en patologías del sistema nervioso central relacionadas con accidentes cerebrovasculares y de manera natural más comunes por la tendencia al envejecimiento en la población.

PERSPECTIVAS

Considerando que la CCH altera estructuras cerebrales como el hipocampo y la corteza prefrontal entre otras, se sugiere evaluar la memoria de trabajo en los animales de experimentación, así como el análisis histológico y de la citoarquitectura de dicha estructura.

Evaluar la concentración sérica y en orina de los metabolitos de la melatonina durante el tratamiento.

Realizar el procedimiento experimental con ratas viejas (18 meses) para tratar de simular lo más posible la etapa de vejez en los humanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA

1. World Health Organization. First WHO Ministerial Conference on Global Action Against Dementia. Dementia: Where do we stand?: World Health Organization; 2015. p. 1-4
2. Barnes JN. Exercise, cognitive function, and aging. *Adv Physiol Educ.* 2015;39:55-62.
3. Cunningham EL, McGuinness B, Herron B, AP P. Dementia. *Ulster Med J.* 2015;84:79 -87.
4. O'Brien JT, Erkinjuntti T, Reisberg B, Roman G, Sawada T, Pantoni L, et al. Vascular cognitive impairment. *Lancet Neurol.* 2003;2:89 -98.
5. Jodouin KA, O'Connell ME, DA. M. RBANS memory percentage retention: No evidence of incremental validity beyond RBANS score for diagnostics classification of mild cognitive imparment and dementia and for prediction of daily function *Appl Neuropsychol Adult* 2016;9:1-9.
6. Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron.* 2013;80:844 -66.
7. Jellinger KA. Pathology and pathogenesis of vascular cognitive impairment-a critical update. *Front Aging Neurosci.* 2013;5:1-19.
8. O'Brien JT, Thomas A. Vascular dementia. *Lancet.* 2015;386:1698- 706.
9. Rodríguez-García PL, Rodríguez-García D. Diagnosis of vascular cognitive impairment and its main categories. *Neurologia.* 2015;30:223 - 39.
10. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007;54:34 -66.
11. Enciu AM, Constantinescu SN, Popescu LM, Mureşanu DF, Popescu BO. Neurobiology of Vascular Dementia. *J Aging Res.* 2011;2011:1-11.
12. 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.
13. Iadecola C. Hypertension and Dementia. *Hypertension.* 2014;64:3-5.
14. 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.
15. Morgado I. The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. *Rev Neurol.* 2005;40:289- 97.
16. Almaguer-Melian W, Bergado-Rosado JA. Interactions between the hippocampus and the amygdala in synaptic plasticity process. A key to understand the relations between motivation and memory. *Rev Neurol.* 2002;35:586 - 93.
17. Sweatt JD. The Basics of Psychological Learning and Memory Theory. *Mechanisms of Memory: Elsevier, Academic Press;* 2003 p. 3-27.
18. Sweatt JD. The Hippocampus Serves a Role in Multimodal Information Processing, and Memory Consolidation. . In: Elsevier AP, editor. *Mechanisms of memory*2003. p. 61-90.
19. Kandel ER SJ, Jessell TM. Aprendizaje y Memoria. *Principios de Neurociencia: McGraw-Hill;* 2001. p. 1227-46.
20. Etchepareborda MC, Abad-Mas L. Working memory in basic learning processes. *Rev Neurol.* 2005;40:579-83.
21. McDonald RJ, White NM. Hippocampal and nonhippocampal contributions to place learning in rats. *Behav Neurosci.* 1995:579-93.
22. O'Keefe J LN, editor. *The hippocampus as a cognitive map: Clarendon Press. ; 1978.*
23. Balderas I, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. Memory-linked morphological changes. *Rev Neurol.* 2004;38:944-8.

24. Shapiro ML, Eichenbaum H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus*. 1999;9:365-84.
25. 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.
26. 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.
27. Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci*. 2002;203-204:263 - 6.
28. 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.
29. 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.
30. Farkas E, Luiten PGM. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology* 2001;64:575-611.
31. Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synaptic overview. *Stroke*. 2009;40:S111-4.
32. Wiendl H, Elger C, Förstl H, Hartung HP, Oertel W, Reichmann H, et al. Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ("Neuroprotection"). *Neurotherapeutics*. 2015;12:449-54.
33. Cardinali DP, Pévet P. Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*. 1998;2:175-90.
34. Reiter RJ, Tan DX. Role of CSF in the transport of melatonin. *J Pineal Res*. 2002;33:61.
35. Tricoire H, Locatelli A, Chemineau P, Malpoux B. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology*. 2002;143:84-90.
36. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, Andersen LP, Zhou Z, Galano A, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res* 2015;59:403-19.
37. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 2001;52:159- 64.
38. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res*. 1993;15:59-69.
39. Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med*. 1999;340:1970-80.
40. Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, et al. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res*. 2000;28:242-8.
41. Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J*. 2000;14:1677 -9.
42. Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:348-57.
43. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:124-8.

44. Lee HC, Wei YH. Mitochondria and Aging. In: Giardina RSPBB, editor. *Advances in Mitochondrial Medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology*. 942. NY Springer; 2012. p. 311-27.
45. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003;278:8516-25.
46. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*. 1998;56:359-84.
47. Golombek DA, Pévet P, Cardinali DP. Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996;20:403-12.
48. Johnson K, Page A, Williams H, Wassemer E, Whitehouse W. The use of melatonin as an alternative to sedation in uncooperative children undergoing an MRI examination. *Clin Radiol*. 2002;57:502-6.
49. Paula-Lima AC, Louzada PR, De Mello FG, Ferreira ST. Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptors involved?. *Neurotox Res*. 2003;5:323-7.
50. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M, Manev H. Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J*. 1996;10:891-6.
51. Kilic E, Kilic U, Reiter RJ, Bassetti CL, Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. *J Pineal Res*. 2004;37:247-51.
52. Macleod MR, O'Collins T, Horky LL, Howells DW, Donnan GA. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. *J Pineal Res*. 2005;38:35-41.
53. Cervantes M, Morali G, Letechipia-Vallejo G. Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J Pineal Res*. 2008;45:1-7. eng.
54. 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.
55. 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.
56. Manev H, Uz T, Kharlamov A, Joo JY. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. *FASEB J*. 1996;10:1546-51.
57. Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev* 2002;123:1007 -19.
58. 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.
59. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*. 2003;50:1129-46.
60. Rüdiger H. Melatonin Metabolism in the Central Nervous System. *Current Neuropharmacology*. 2010;8:168-81.
61. Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol*. 2004;39:1723-9.
62. Macchia MM, Bruceb JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2004;25:177 -95.

63. Bondy SC, Sharman EH. Melatonin and the aging brain. *Neurochemistry International*. 2007;50:571 -80.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984;11:47 - 60.
68. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. San Diego, CA, USA: Elsevier Inc. ; 2009.
69. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*. 2006;40:1-9.
70. Ramírez-Rodríguez G, Benítez-King G, Kempermann G. Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: neurogenesis *Salud Mental*. 2007;30:12-9.
71. de Wilde MC FE, Gerrits M, Kiliaan AJ, Luiten PG. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res*. 2002;947:166-73.
72. Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga AM. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1-14.
73. Magri F, Sarra S, Cinchetti W, Guazzoni V, Fioravanti M, Cravello L, et al. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians. *J Pineal Res*. 2004;36:256 - 61.