



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS
NEUROPROTECTORES DE LA MELATONINA
SOBRE EL DAÑO CEREBRAL RESULTANTE
DE ISQUEMIA CEREBRAL GLOBAL AGUDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en F.B. GRACIELA MARIA EUGENIA LETECHIPÍA
VALLEJO

DIRECTOR DE TESIS

D.en C. JOSÉ MIGUEL CERVANTES ALFARO

MÉXICO, D.F. 2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

PRESIDENTE: DR ALFONSO ESCOBAR IZQUIERDO
SECRETARIO: DR JOSE MIGUEL CERVANTES ALFARO
VOCAL: DRA. MARIA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
VOCAL: DRA GLORIA ACACIA BENITEZ KING
VOCAL: DR MAURICIO DIAZ MUNOZ
SUPLENTE: DR ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL
SUPLENTE: DR. FERNANDO ANTON TAY

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social en el Marco del Convenio de Colaboración Académica de esta Institución y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Doctor en Ciencias Biomédicas José Miguel Cervantes Alfaro.

***Yo no estimo tesoros ni riquezas,
y así, siempre me causa más contento
poner riquezas en mi entendimiento
que no mi entendimiento en las riqueza. . . .***

Sor Juana Inés de la Cruz

INDICE

ABSTRACT.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	5
Fisiopatología de la isquemia cerebral.....	7
Excitotoxicidad	8
Papel del Ca ²⁺ en el daño celular por isquemia.....	8
Radicales libres	10
Disfunción mitocondrial	12
Apoptosis	14
Neuroproteccion.....	14
ANTECEDENTES.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	24
RESULTADOS	31
DISCUSION y CONCLUSIONES.....	40
REFERENCIAS.....	44

ABSTRACT

Consensus on neuroprotection has pointed out the relevance of the long-term morphological and functional evaluation of the effectiveness of putative neuroprotective procedures.

In the present study, space learning (Morris water maze) and working memory (8-arm Olton radial maze) were evaluated in adult male rats 90 days after 15 min of global cerebral ischemia (4-vessel occlusion) followed by continuous iv infusion (10 mg/kg/h) of melatonin (Isch+Mel) or vehicle (Isch+Veh) for 6 h, and the pyramidal neuron population of the *cornu Ammoni* (CA) of the hippocampus and layers III and V of the medial prefrontal cortex was assessed at the end of the behavioral testing period (120 days after ischemia). Impairment of space learning, a significant delay in working memory acquisition, and a significant loss of pyramidal neurons in the Ammon's horn (CA1: 23%, CA2: 52% CA3: 73%, hilus: 64% remaining neurons), were observed in the Isch+Veh group. By contrast, a similar performance of the Isch+Mel group to that of the Intact and Sham groups, and better than that of the Isch+Veh group, besides a significant reduction of pyramidal neuron loss in the CA subfields (CA1: 79%, CA2: 88% CA3: 86%, hilus: 72% remaining neurons), documented that melatonin treatment led to a long-term preservation of both the neural substrate, and the capability for integration of spatial learning and memory, mainly dependent on a normal hippocampal functioning.

Overall results show a clear better long term outcome after ischemia mainly dependent on melatonin actions during a short but critical period possibly counteracting cellular mechanisms leading to brain damage, otherwise resulting from cerebral ischemia even though cerebral mechanisms of functional recovery may be also triggered by cerebral ischemia.

RESUMEN

En diversas reuniones de consenso acerca de los estudios preclínicos de neuroprotección, se ha destacado la importancia de la evaluación morfológica y funcional a largo plazo de la efectividad de procedimientos potencialmente neuroprotectores.

En el presente estudio se evaluaron el aprendizaje espacial (laberinto acuático de Morris) y la memoria de trabajo espacial (laberinto radial de 8 brazos de Olton) en ratas macho adultas, 90 días después de un episodio de isquemia cerebral global aguda de 15 minutos de duración (modelo de oclusión de los 4 vasos), seguido por la infusión continua iv (10 mg/kg/h) de melatonina (Isq + Mel) ó vehículo (Isq + Veh) durante 6 horas; así como la población de neuronas piramidales del cuerno de Ammón (CA) del hipocampo y de las capas III y V de la corteza prefrontal medial, al final de las evaluaciones conductuales (120 días después del episodio de isquemia).

La falla en el aprendizaje espacial, un retraso significativo en la adquisición de la memoria de trabajo espacial y la reducción significativa de la población de neuronas piramidales del cuerno de Amón (CA1: 23%, CA2: 52% CA3: 73%, *hilus*: 64% de neuronas remanentes), fueron los resultados más importantes en el grupo Isq + Veh. En cambio, en grupo Isq + Mel las características del aprendizaje espacial fueron similares a las de los grupos Intacto y Sham; además de una reducción significativa de la pérdida neuronal en los segmentos del cuerno de Amón (CA1: 79%, CA2: 88% CA3: 86%, *hilus*: 72% de neuronas remanentes), sustentan que el tratamiento con melatonina dio lugar a la preservación a largo plazo tanto del sustrato neural, como de la capacidad de integración del aprendizaje y la memoria espacial que dependen principalmente del funcionamiento del hipocampo.

En su conjunto, los resultados del presente estudio muestran una mejor preservación a largo plazo de las características morfológicas y funcionales cerebrales que depende principalmente de las acciones de la melatonina

durante un periodo corto y critico, siguiente a la isquemia, posiblemente actuando en contra de mecanismos celulares de daño cerebral postisquemia, que de otra manera darían por resultado daño cerebral y deficiencias funcionales a pesar de que la evolución de los fenómenos cerebrales postisquemia también puede incluir mecanismos de reparación y de recuperación funcional del sistema nervioso.

INTRODUCCION

Con el rápido cambio de las características de la pirámide poblacional a expensas principalmente del incremento del número de personas que superan los 65 años de edad, se ha observado un mayor riesgo de ocurrencia de enfermedades vasculares cerebrales. De acuerdo con datos estadísticos [1,2] los accidentes vasculares cerebrales (AVC) son una de las principales causas de muerte y discapacidad severa a largo plazo. Los datos estadísticos muestran que en los Estados Unidos los AVC afectan anualmente a más de 700,000 individuos (500,000 por primera ocasión y 200,000 de manera recurrente) ocasionando la muerte de 160,000 personas, por lo cual los AVC se han clasificado como la tercera causa de muerte después de los padecimientos cardiacos y el cáncer [3] con una proyección de 1136,000 individuos afectados para el año 2025 [4]. Asimismo se consideran de la mayor importancia las implicaciones económicas de estos padecimientos [5].

El sistema nervioso en condiciones normales utiliza la glucosa y el oxígeno, suministrados al través del flujo sanguíneo de las arterias carótidas y vertebrales (50 – 60 ml/ 100 g/ min), como sustratos para la síntesis de ATP y el aprovisionamiento energético necesarios para el funcionamiento celular. La mayor parte de esta energía (aproximadamente el 50%) se utiliza para el mantenimiento de la homeostasis iónica celular y en menor proporción (aproximadamente 20 %) en los procesos de neurotransmisión, comunicación celular y menos del 15 % en otros procesos metabólicos basales [6,7]. La continuidad del flujo sanguíneo (FSC) y del metabolismo cerebrales están estrechamente relacionados [8], de manera que la interrupción del FSC da lugar al agotamiento de las reservas de energía del cerebro en un tiempo no mayor a 120 segundos [6].

Por ello, el cerebro es extremadamente vulnerable a las alteraciones de riego sanguíneo. La isquemia puede, en pocos segundos, dar lugar a diversas alteraciones neurológicas, y en el término de minutos iniciar procesos

fisiopatológicos que pueden culminar en daño neuronal irreversible [7], como ocurre en situaciones fisiopatológicas que cursan con reducción severa del flujo sanguíneo cerebral (infarto cardiaco, la oclusión de arterias cerebrales, o periodos prolongados de hipotensión sistémica) y la consiguiente reducción del suministro de oxígeno y glucosa, así como la acumulación de metabolitos que en condiciones normales serían continuamente retirados del cerebro [9].

Los episodios de isquemia que ocurren en forma aguda, pueden afectar solo una parte del cerebro (isquemia focal) de manera permanente o transitoria o afectar al cerebro en su totalidad (isquemia global) de manera transitoria, seguidos de la restauración del flujo sanguíneo (reperfusión) de las regiones isquémicas.

En situaciones de isquemia cerebral global o parcial la disminución del FSC hasta valores de 16 – 18 ml /100g/ min provoca la supresión de la actividad eléctrica neuronal espontánea y evocada [10,11]; en tanto que la reducción del FSC hasta 10 - 12 ml /100 g/ min da lugar a la interrupción de diversos mecanismos involucrados en la homeostasis iónica celular y al inicio de mecanismos de muerte celular [10,12,13]. Además de su magnitud, la duración de la isquemia también es determinante de la presencia, extensión y reversibilidad del daño cerebral post-isquemia [14].

Por otra parte, se ha mostrado que en una misma estructura cerebral coexisten poblaciones neuronales con diferente vulnerabilidad ante la isquemia. Así, se han identificado como células muy susceptibles al daño por isquemia, a las células piramidales de la región CA1 e hilus del hipocampo y a las células de Purkinje del cerebelo; como células medianamente vulnerables a las células de tamaño medio y pequeño del cuerpo estriado y a las células piramidales ubicadas en las capas 3 y 5 de la corteza cerebral; y como células poco vulnerables a las células granulares del giro dentado y a las neuronas de las capas 2 y 4 de la corteza cerebral [15-17].

En condiciones de isquemia cerebral global aguda, el daño cerebral post-isquemia se relaciona con estas características de vulnerabilidad selectiva de diferentes tipos de neuronas. En cambio, la isquemia cerebral focal originada por

la oclusión permanente de una rama vascular (usualmente de la arteria cerebral media) da lugar a una zona de hipoperfusión severa (núcleo), rodeada de tejido viable, con flujo sanguíneo moderadamente disminuido, denominada “zona de penumbra”. Las células ubicadas en el núcleo isquémico mueren en pocos minutos, mientras que en las neuronas ubicadas en la zona periférica, adyacente al núcleo isquémico, se mantienen en condiciones metabólicas mínimas compatibles con la preservación de su integridad estructural durante algún tiempo, y con la posibilidad de su recuperación a partir de la restauración del flujo sanguíneo cerebral que permita un aporte normal de glucosa y oxígeno a la zona de penumbra isquémica.

Fisiopatología de la Isquemia Cerebral

La isquemia cerebral da lugar a diversas alteraciones celulares que ocurren “en cascada” una vez iniciado el proceso de daño, que progresan gradualmente con el transcurso del tiempo (fenómeno de “maduración”) y culminan en la forma de daño neuronal irreversible [10,16].

La isquemia cerebral da lugar a la reducción o supresión de la fosforilación oxidativa y a sus consecuencias sobre diversos procesos fisiológicos celulares a partir del episodio de isquemia. La falla energética provoca la interrupción del funcionamiento de los procesos membranales de transporte activo que generan y mantienen los gradientes iónicos con el consiguiente desplazamiento masivo de Na^+ y Ca^{2+} hacia el citoplasma neuronal y “despolarización anóxica”. Estos cambios iónicos y eléctricos inducen a su vez, la activación de otros procesos celulares “perpetradores” [18] del daño neuronal, capaces de producir alteraciones irreversibles en diversas macromoléculas. Los fenómenos “perpetradores” del daño, entre los que se incluyen a la activación de proteasas, fosfolipasas, endonucleasas y a la producción y acumulación excesivas de radicales libres [18] tienen gran importancia como determinantes de daño y muerte celular.

Diversas alteraciones celulares secundarias a la isquemia ocurren después de que el flujo sanguíneo cerebral se ha reestablecido y paradójicamente amplifican

el daño de las estructuras nerviosas. Así, fenómenos tales como edema tisular, vasoespasmo, edema intracelular, y alteraciones adicionales de la homeostasis del calcio intracelular e intramitocondrial, alteraciones metabólicas y liberación de radicales libres, constituyen mecanismos celulares del “daño por reperfusión” que contribuyen al resultado final del daño neurológico provocado por la isquemia [19-21].

Excitotoxicidad.

La despolarización anóxica de la membrana neuronal da lugar a la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, al incremento adicional de la concentración intracelular de este ion y a la activación de mecanismos de liberación del neurotransmisor excitador glutamato. Además, la falla energética siguiente a la isquemia interfiere con la recaptura de glutamato lo que resulta en la acumulación anormal de este neurotransmisor en la sinapsis y la activación excesiva de sus receptores ionotrópicos NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α amino -3 -hidroxi -5-metil -4-isoxazolpropiónico) o Kainato. La activación sostenida de estos receptores da lugar al ingreso anormal de Na^+ y Ca^{2+} , al incremento anormal de la concentración intraneuronal de estos iones, a la despolarización membranal y apertura de canales de Ca^{2+} operados por voltaje, así como a procesos fisiopatológicos de daño y muerte neuronal cuya activación depende del incremento anormal de la concentración intracelular de Ca^{2+} ; que en su conjunto constituyen el fenómeno denominado excitotoxicidad [18,22].

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

El ingreso masivo de calcio da lugar a múltiples fenómenos celulares conducentes al daño neuronal. Este es el caso de la activación de varias enzimas y la alteración del funcionamiento mitocondrial.

Entre los fenómenos celulares de daño dependientes del incremento anormal de Ca^{2+} se consideran relevantes la activación de la fosfolipasa A_2 , la activación de fosfolipasa C- β , la activación de calpaínas, la activación de la proteína cinasa II

calcio calmodulina (CaMKII) y la activación de endonucleasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.

La activación de la fosfolipasa A_2 dependiente de calcio en condiciones de isquemia/reperfusión da lugar a la degradación de fosfolípidos de membrana y a la liberación de ácidos grasos como el ácido araquidónico, perjudicial de diferentes maneras. En primer lugar, la ruptura de los fosfolípidos de membrana modifica la estructura molecular de la membrana lipídica, con las consecuentes alteraciones de los mecanismos de permeabilidad selectiva y homeostasis iónica membranales [23-25]. En segundo lugar, el ácido araquidónico resultante de la hidrólisis de fosfolípidos puede ser convertido por acción de las enzimas ciclooxigenas o lipooxigenas en , prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos; todos ellos son compuestos que pueden causar, aumento del tono del músculo liso vascular y fenómenos pro-inflamatorios con la consiguiente alteración de la regulación del flujo sanguíneo en regiones cerebrales específicas [22,25,26]. Por otra parte, en el proceso de formación de estos eicosanoides se producen especies reactivas de oxígeno que contribuyen a la pérdida de la integridad de la membrana.

Así mismo, la activación de fosfolipasa C- β por Ca^{2+} , trae como consecuencia la liberación de inositol trifosfato (IP_3) y diacil glicerol (DAG) provenientes de los fosfolípidos de membrana. Ambas moléculas juegan papeles cruciales en la señalización celular. El IP_3 es una molécula hidrosoluble que se libera de la membrana plasmática y difunde rápidamente por todo el citoplasma. Al unirse a canales liberadores de Ca^{2+} sensibles a IP_3 situados en el retículo endoplásmico uno de los principales reservorios de este catión en la célula, ocasiona la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma celular.

El DAG además de ser precursor del ácido araquidónico y en forma secundaria de eicosanoides, es capaz de activar a una proteína cinasa C que fosforila varias proteínas de la célula. La proteína cinasa C activa una cascada de fosforilaciones mediante la cual ocasiona la activación de una serie de moléculas de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Asimismo

la activación de la proteína cinasa C conduce a la fosforilación de I κ -B, la cual, libera a la proteína reguladora de genes NF- κ B (factor nuclear κ B) que forman parte de mecanismos celulares proapoptóticos.

La activación anormal de calpaínas por Ca^{2+} induce la segmentación anormal de proteínas importantes (espectrina, fodrina, Ca^{2+} - ATPasa, proteína cinasa C y factor nuclear kappa B, NF- κ B) para el funcionamiento celular, la remodelación dendrítica, el transporte membranal, la modulación de la expresión génica y la degeneración neuronal [22].

La activación de la proteína cinasa II dependiente del complejo calcio/calmodulina (CaMKII), por el Ca^{2+} que ingresa a las células nerviosas al través de canales operados por el receptor NMDA, se ha observado en neuronas de la corteza cerebral e hipocampo luego de isquemia cerebral. De este modo, a partir de la activación de CaMKII, pueden ser activadas una serie de moléculas de la familia de proteínas cinasas MAPKs entre ellas se destaca la participación de las cinasas reguladas por señales extracelulares ERK (p42 o ERK1 y p44 o ERK2), proteína cinasa C -Jun-terminal (JNK)/ proteína cinasas activadas por estrés (SAPKs) y p38, las cuales una vez activadas, p38 y SAPK actúan como mediadores en la ejecución del programa de apoptosis neuronal [22].

Asimismo, la activación de CaMKII por el Ca^{2+} puede originar el desarreglo estructural del citoesqueleto y favorecer de esta manera el daño neuronal [27].

La activación de endonucleasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, da lugar a la fragmentación internucleosomal del DNA en segmentos formados por pares de bases en números múltiplos de 200 [22].

Radicales libres

La participación de los radicales libres, derivados tanto de oxígeno (ROS) como de nitrógeno (RNS) en procesos de daño por isquemia en el sistema nervioso central ha sido extensamente estudiada [21,28,29]

En condiciones normales, la reducción escalonada del O_2 ocurre a través de varios metabolitos intermediarios ($\text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^{\cdot}$) denominados especies reactivas de oxígeno. Esta reacción procesa el O_2 que ingresa a la mitocondria

hasta la formación de agua, excepto una fracción del orden del 1-2 % del oxígeno que se transforman en ROS, los cuales parecen ser parte de las señales involucradas en el control del balance de los procesos celulares de óxido-reducción [30].

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

De aquí la importancia de la operación de los mecanismos celulares, enzimáticos y no enzimáticos, involucrados normalmente en el control de la producción y manejo de ROS. [28,30-32]. De esta manera, diversas enzimas antioxidantes que incluyen superóxido dismutasas (SOD) SOD- $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ localizada en el citoplasma y SOD- Mn^{3+} en la mitocondria, catalasas y peroxidasas. En el cerebro la glutathion peroxidasa (GPx) es considerada más importante que la catalasa debido a la baja actividad de esta última enzima en la mayoría de las regiones cerebrales [33]. Estas enzimas antioxidantes participan en la conversión inmediata de ROS en compuestos tales como peróxido de hidrógeno, oxígeno molecular y agua [30,34]. Por otro lado, la presencia de compuestos antioxidantes exógenos o endógenos de ROS tales como las vitaminas E (alfa-tocoferol), A (beta- carotenos) y C (ascorbato), glutathion en su forma reducida (GSH), o melatonina, también forman parte de los mecanismos celulares antioxidantes [33,34].

Los radicales libres forman parte importante de los mecanismos fisiopatológicos de daño en condiciones de isquemia / reperfusión cerebral. Se ha descrito que la restauración del suministro de oxígeno y glucosa durante la reperfusión de las regiones cerebrales expuestas a la isquemia global o focal, puede rebasar la capacidad de manejo metabólico mitocondrial del oxígeno y llevar a la activación de reacciones enzimáticas generadoras de ROS (xantina deshidrogenasa \rightarrow xantina oxidasa) por lo que la producción anormal de radicales libres puede dar lugar a la insuficiencia de los mecanismos celulares antioxidantes y dejar

expuestos diversos constituyentes de la célula, (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) a las acciones citotóxicas de ROS [28,34].

Las características bioquímicas del sistema nervioso, lo hacen particularmente susceptible al daño mediado por ROS [35]. El consumo de oxígeno por el cerebro es mayor que el de otros órganos. Aunque al cerebro corresponde aproximadamente el 2% del peso corporal, requiere para su funcionamiento el 20% del suministro total de oxígeno; por tal motivo, su potencialidad para la producción de ROS es mayor [35]. Esta característica aunada a las concentraciones celulares elevadas de hierro no unido al grupo hemo y a la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados cuyos dobles enlaces son notablemente susceptibles al daño por radicales libres, contribuyen a su mayor vulnerabilidad al daño post-isquemia [35].

Asimismo, el óxido nítrico (NO^\bullet) es sintetizado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y por la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), ambas enzimas constitutivas y dependientes de calcio y calmodulina; y por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), no dependiente de calcio y calmodulina. La nNOS es activada por el complejo calcio-calmodulina después de que se produce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , resultado de la excitotoxicidad. El NO^\bullet , una vez sintetizado, tiene la posibilidad de formar RNS, especialmente peroxinitrito (ONOO^-) al reaccionar con el radical superóxido. Esto, le confieren importancia al NO^\bullet , entre los posibles mecanismos de daño neuronal post-isquemia (nitricación de ADN y proteínas), dependientes de la formación y la actividad de radicales libres [7,22,36,37].

Disfunción mitocondrial.

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

entonces usada para impulsar la síntesis de ATP por el complejo V (ATP Sintasa) [30].

Las consecuencias de la isquemia cerebral y la reperfusión sobre la estructura y el funcionamiento mitocondrial de las células nerviosas incluyen alteraciones metabólicas, estrés oxidativo, alteración de los mecanismos mitocondriales de control de la concentración de Ca^{2+} , e inducción de mecanismos pro-apoptóticos. De hecho, se han mostrado evidencias de muerte neuronal por apoptosis luego de isquemia global o focal en diversos tipos neuronales vulnerables que forman parte de estructuras cerebrales específicas [38-41].

En condiciones normales el calcio citoplásmico que ingresa normalmente a la mitocondria mediante un sistema de transporte unidireccional, favorecido por el potencial de membrana negativo ($\Delta\psi_m$) de la mitocondria, tiene un papel importante para las características del funcionamiento mitocondrial al participar en la activación alostérica de diversas enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa, tales como piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa y ATP sintasa [42,43].

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

Por otra parte, el incremento anormal del Ca^{2+} intramitocondrial y las acciones de ROS promueven la apertura de poros de permeabilidad transitoria (PT), la liberación y translocación del citocromo c desde la membrana interna de la mitocondria hacia el citoplasma con la consiguiente formación de apoptosomas y activación de moléculas pro-apoptóticas [30,44-46]. A su vez, el citocromo c liberado de la mitocondria, puede favorecer la liberación de Ca^{2+} proveniente del retículo endoplásmico, mediante su interacción con los receptores a 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3R) [30]

La disminución de la síntesis de ATP resultante de la disfunción mitocondrial inducida por la isquemia interfiere con la operación de aquellos sistemas de transporte activo de Ca^{2+} dependientes de ATP, intensificando la acumulación

de Ca^{2+} y propiciando el daño y la muerte celular al través de mecanismos dependientes de Ca^{2+} .

Se ha considerado a la integridad estructural y funcional de la mitocondria como factores de la mayor importancia para la ejecución de las funciones celulares en condiciones normales; así como a las alteraciones del funcionamiento mitocondrial como elementos clave para el daño y la muerte neuronal, en el curso de diversas situaciones fisiopatológicas cerebrales [30,42,47].

Apoptosis.

Las causas de muerte posterior a isquemia pueden ser apoptosis o necrosis. La apoptosis es responsable del más del 50% de la muerte celular por isquemia. Se han identificado tanto señales intracelulares como extracelulares que inician este proceso. No hay duda, que la disfunción mitocondrial origina las señales intracelulares para apoptosis mientras que las señales extracelulares involucran la activación de la familia de receptores TNF. Los mecanismos que llevan a la muerte celular por apoptosis son complejos e implican la participación de diferentes vías como la del factor nuclear kappa B (NFkB), la vía dependiente de p53, y la activación de diversos genes proapoptóticos. La inducción de estos factores lleva a la formación de caspasas, las cuales están presentes en las células como proenzimas y son segmentadas a su forma activa por otras caspasas. La vía de las caspasas requiere de la liberación de citocromo c de la mitocondria y la activación de la procaspasa 9. A partir de este punto, se activa una serie de caspasas en cascada, que culmina con la caspasa 3 efectora. Esta última, activa enzimas que cortan el ADN (endonucleasas) y enzimas de reparación del ADN como PARP (poliADP-ribosa polimerasa), llevando al final al rompimiento de ADN y muerte celular [48].

NEUROPROTECCION.

Conforme se han acumulado las evidencias acerca de las características y el curso temporal de los procesos fisiopatológicos celulares, inducidos por la isquemia, que dan lugar a la muerte de neuronas vulnerables, por necrosis y/o

apoptosis, al daño irreversible de estructuras cerebrales y a las alteraciones funcionales correspondientes, se ha consolidado la propuesta de la existencia de una “ventana de oportunidad terapéutica” [49] de la mayor importancia para las posibilidades de éxito de los procedimientos de neuroprotección.

En éstos se incluyen procedimientos farmacológicos y no farmacológicos capaces de prevenir o reducir el daño resultante de la exposición de las células nerviosas que forman parte del SNC a condiciones tales como la isquemia, el trauma o la hemorragia [50,51]; condiciones que en los seres humanos dan lugar de manera inmediata o en muy corto tiempo a lesiones neurológicas permanentes, de naturaleza y magnitud diversas. Así mismo, se ha considerado importante a la potencialidad de la neuroprotección como parte del manejo clínico-terapéutico de las enfermedades neurológicas crónico-degenerativas (enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la corea de Huntington, entre otras) y de las alteraciones cerebrales asociadas al envejecimiento [42,52-54].

En efecto, en procesos fisiopatológicos agudos, como la isquemia global o focal, el trauma o la hemorragia cerebrales, la “ventana de oportunidad terapéutica”, es un periodo (usualmente unas cuantas horas) comprendido desde el inicio de la [55] exposición de las estructuras del SNC a estas condiciones y el establecimiento del daño neuronal irreversible que antecede de manera inmediata a la muerte neuronal; e incluye el tiempo durante el cual se desencadenan y permanecen activos los diversos mecanismos celulares conducentes a muerte neuronal. Cada uno de éstos puede adquirir en un momento dado diferente relevancia por su naturaleza y por su curso temporal en función de su capacidad para dar lugar al daño neuronal inmediato (minutos a horas), mediato (horas a días) o tardío (días a semanas); así como en función de la posibilidad de ser contrarrestados mediante procedimientos neuroprotectores con la consiguiente reducción del daño neuronal correspondiente [51,52,56].

Sin embargo, se ha identificado una problemática a resolver en función de la eficacia y seguridad de la neuroprotección, que incluye: la multiplicidad de procesos celulares que deberían ser contrarrestados para prevenir o reducir el

daño cerebral; la relación temporal de la implementación del procedimiento neuroprotector con la “ventana de oportunidad terapéutica” correspondiente a uno o varios mecanismos de daño cerebral (minutos a horas para necrosis, días a semanas para apoptosis). De la mayor importancia en esta problemática son la eficacia y la seguridad de las dosis y esquemas de administración de los fármacos neuroprotectores; que se establecen primeramente con base en evidencias obtenidas en modelos experimentales [48], para posteriormente sustentar su posible aplicación futura en seres humanos.

Las estrategias que se han seguido para la investigación experimental de los efectos neuroprotectores de diversos fármacos han tomado en cuenta estas consideraciones. De esta manera, la relación de oposición entre los mecanismos de acción farmacológica y la naturaleza de los procesos fisiopatológicos celulares conducentes al daño irreversible de las estructuras cerebrales vulnerables ha dado lugar a grupos de fármacos neuroprotectores: antagonistas de receptores glutamatérgicos [55,57], calcio-antagonistas [58], antioxidantes [59,60], anti-inflamatorios [52], antiapoptóticos [61], etc., entre otros. En este sentido se ha considerado relevante como parte de la estrategia de neuroprotección, a los fármacos que pueden contrarrestar varios mecanismos fisiopatológicos de daño mediante múltiples mecanismos de acción, como es el caso de algunos esteroides neuroactivos [62,63], la melatonina [35,64] y la Acetil-l-carnitina [65]

De ahí la sustentación de las propuestas para ensayos clínicos de neuroprotección basados en la administración de diferentes fármacos [66,67].

ANTECEDENTES

Se ha propuesto que el estrés oxidativo, consecuencia de la elevada producción de radicales libres, esencialmente durante el estado de reperfusión postisquémica, tiene gran relevancia para el daño cerebral provocado por la isquemia [34,68].

Ante las evidencias de la participación de los radicales libres generados durante la isquemia transitoria y la reperfusión en la destrucción neuronal, la identificación de compuestos capaces de contrarrestar de una u otra forma los efectos nocivos de estos agentes oxidantes ha sido uno de los objetivos de la investigación en este campo. Para ello se han estudiado compuestos químicos identificados originalmente por su participación en procesos fisiológicos relevantes en los seres vivos [35,54,63,69]; así como compuestos químicos de origen sintético [51,70,71], con el propósito de sustentar experimentalmente su eficacia y seguridad como neuroprotectores, lo mismo que sus características farmacocinéticas compatibles con su distribución en el sistema nervioso central. En general, estos estudios han confirmado experimentalmente la eficacia del uso de compuestos antioxidantes en la reducción del daño neuronal en condiciones de isquemia cerebral y reperfusión.

La melatonina (N-acetil-5-metoxi-triptamina. Fig. 1), que es sintetizada en la glándula pineal, tiene un patrón circádico de secreción relacionado estrechamente con los ciclos luz /oscuridad. Así, las concentraciones plasmáticas de la melatonina en individuos jóvenes son mínimas durante el día y alcanzan un máximo durante la noche (rata macho Wistar, 3 meses de edad: 35 pg/ml a las 16:00 h; 198 pg/ml a las 02:00 h. Seres humanos: 10.0 pg/ml a las 16:00 h; 200 pg/ml a las 02:00 h) [72,73].

Se ha observado que los valores de secreción máxima nocturna se reducen progresivamente con la edad (40.0 pg/ml a los 51-55 años; 20 pg/ml a los 82-86 años) [31].

La melatonina posee propiedades antioxidantes [64,74-77], las cuales han generado un interés particular en el estudio de sus efectos neuroprotectores debido a sus características fisicoquímicas favorables para su ubicación en los compartimentos intracelulares y extracelulares en el SNC [78-80]; así como por sus efectos en contra del daño cerebral por estrés oxidativo [34,64,74,77], incluyendo el resultante de la isquemia cerebral [35,81-83].

La eficacia de la melatonina como neuroprotector, tanto en concentraciones fisiológicas [84-86] como en concentraciones suprafisiológicas, ha sido sustentada por evidencias obtenidas en modelos experimentales de isquemia focal [35,54,83,87,88] y en modelos experimentales de isquemia global [81,82,87] y se ha explicado como debida principalmente a la actividad de la melatonina como atrapador de radicales libres, a la activación de enzimas que reducen la producción y la acumulación anormal de ROS [35,73,77,89-91] y a la preservación de la eficiencia de los procesos mitocondriales que operan en contra del estrés oxidativo y de los mecanismos pro-apoptóticos [92-94].

En estos estudios es clara la potencialidad de melatonina como antioxidante para actuar en contra de una parte importante de los procesos de daño cerebral inducido por isquemia que dependen de los efectos perjudiciales de los radicales libres sobre diversos componentes estructurales y funcionales de las células nerviosas y que pueden sustentar asimismo sus posibles efectos neuroprotectores.

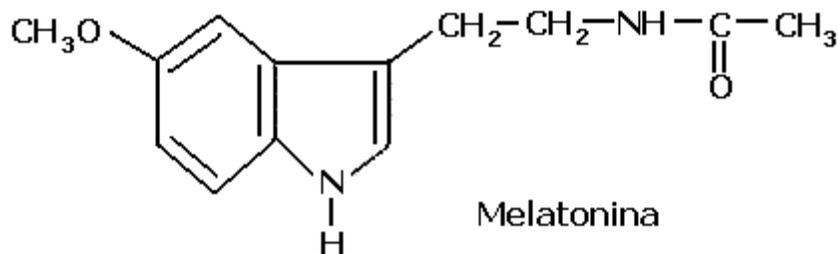


Figura 1. Estructura molecular de N-acetil-5-metoxi-triptamina, comúnmente conocida como melatonina.

La melatonina, lo mismo que otros derivados del indol y metabolitos del triptofano posee propiedades de oxidorreducción debido a la presencia de un sistema aromático rico en electrones que permite a la indolamina funcionar como molécula donadora de electrones. Adicionalmente la presencia de radicales metoxy y N-acetilo le confieren características de molécula anfifílica. Se ha sugerido que estas propiedades son las bases moleculares que sustentan la capacidad antioxidante de la melatonina en los diferentes compartimentos subcelulares [95]

De esta manera la molécula de melatonina, así como las de varios de sus metabolitos, son capaces de atrapar una variedad de radicales libres tales como H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$, ONOO^- , HOCl y oxígeno singlete; así, cada molécula de melatonina es capaz de atrapar dos radicales $\text{HO}\cdot$ y los compuestos resultantes de la reacción de la melatonina con ROS, tales como N1-acetil-N2-formil-5 metoxi kinuramina (AFMK) y N-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) funcionan subsecuentemente como atrapadores de radicales libres “en cascada” [33,73,95-98]. puede inducir una regulación a la baja de la actividad de la óxido nítrico sintasa neuronal y endotelial con la consiguiente reducción de RNS [33,95,97]; así como regulación a la alza de la síntesis y la actividad de diversas enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa [77], lo que incrementa la capacidad antioxidante neuronal [89-91]. Asimismo, se ha dado gran importancia, como mecanismos de neuroprotección, a las acciones de la melatonina en la mitocondria, donde activa los complejos I (deshidrogenasa de NADH) y IV (oxidasa de citocromo c) de la cadena de transporte de electrones [92,99], favoreciendo la normalización del manejo de radicales libres en condiciones de isquemia, en contra de la liberación anormal de citocromo c y la activación de mecanismos celulares pro-apotóticos [73,93].

También se han propuesto como mecanismos de neuroprotección de la melatonina al antagonismo para la formación de complejos calcio-calmodulina involucrados en el proceso del desarreglo estructural del citoesqueleto neuronal inducido por la isquemia [100,101]. Asimismo, se ha observado que la

melatonina reduce los fenómenos pro-inflamatorios inducidos por la isquemia mediante el incremento anormal de la concentración y la actividad de la Cox2, así como la acumulación de polimorfonucleares y sus acciones enzimáticas oxidantes en estructuras cerebrales expuestas a la isquemia [102].

Diversas investigaciones han abordado el estudio de los efectos neuroprotectores de la melatonina contra el daño neuronal inducido por isquemia cerebral focal o global en estructuras cerebrales vulnerables, principalmente a través de la evaluación de parámetros morfológicos y funcionales a corto plazo [87,88,103]. La evidencia experimental de los efectos neuroprotectores de la melatonina contra el daño provocado por isquemia cerebral focal aguda incluyen: la reducción del volumen del infarto y de la zona de penumbra isquémica resultantes de la oclusión de la arteria cerebral media [86,104-108], la reducción de la despoblación neuronal en estructuras cerebrales vulnerables afectadas por la isquemia [109,110], la disminución de la generación de radicales libres y de la lipoperoxidación subsecuente [106,111,112], la reducción de la expresión y la síntesis de compuestos químicos involucrados en los procesos celulares de apoptosis [110,113], así como la reducción significativa de las alteraciones neurológicas post-isquemia [106].

De la misma manera existen algunas evidencias obtenidas a corto plazo (horas a días) en modelos de isquemia cerebral global aguda que sustentan el efecto neuroprotector de melatonina contra el daño inducido por la isquemia en estructuras cerebrales muy vulnerables. Así, se ha mostrado que el tratamiento con dosis altas de melatonina (10mg/ kg) administrado inmediatamente antes o inmediatamente después del episodio de isquemia, en dosis única, dosis múltiple o en infusión continua, reduce significativamente la producción de radicales libres y la lipoperoxidación consecuente, la muerte de las neuronas piramidales del cuerno de Ammon del hipocampo especialmente de la región CA1; así como las alteraciones neurológicas y conductuales post-isquemia [81,82].

En particular, se ha sugerido que el tratamiento con melatonina, 10 mg/ kg/ h, en forma de infusión continua intravenosa (iv) durante las 6 h inmediatas siguientes

a un período de 15 a 19 min de isquemia cerebral global aguda inducida por paro cardiorrespiratorio en gatos, coincide con una ventana de oportunidad terapéutica durante la cual la melatonina ejercería, durante un período crítico para el daño cerebral post-isquemia, diversas acciones en contra de mecanismos fisiopatológicos relevantes para el daño cerebral [82]. En este estudio, la evidencia del efecto neuroprotector del tratamiento con melatonina consistió en la preservación de más del 80% de las neuronas piramidales en los diferentes sectores del cuerno de Ammon y un déficit neurológico global significativamente menor, en contraste con un porcentaje de neuronas remanentes inferior al 30 % y mayor deterioro neurológico en ausencia de tratamiento, observados hasta 7 días post-isquemia. Sin embargo, la magnitud progresivamente decreciente de las alteraciones neurológicas, tanto en presencia como en ausencia del tratamiento con melatonina, sugirió la importancia de evaluar a largo plazo, mediante parámetros morfológicos y funcionales, el efecto neuroprotector de la melatonina en modelos de isquemia cerebral global aguda, como ha sido establecido en función de la mejor interpretación de los resultados de los estudios preclínicos de neuroprotección [114-116].

A este respecto, se sabe que las mismas condiciones que dan lugar a la muerte neuronal pueden activar mecanismos de reparación y reorganización de los circuitos neuronales afectados y a la recuperación funcional a largo plazo aun en ausencia de tratamiento neuroprotector efectivo [52]. De hecho, se ha descrito que a partir de un episodio de isquemia cerebral ocurren, entre otros fenómenos, cambios en las características de las arborizaciones dendríticas, de la sinaptogénesis [117-125] y la activación de una variedad de procesos promotores del crecimiento neuronal, en las neuronas remanentes de las estructuras vulnerables a la isquemia, probablemente como cambios adaptativos que contribuyen al establecimiento de condiciones que favorecen la plasticidad sináptica y la recuperación funcional.

También se ha observado que las acciones de fármacos presumiblemente neuroprotectores pueden solamente retardar el curso temporal de los procesos

celulares conducentes a la muerte neuronal sin impedir que ocurra esta aunque de manera tardía [114], por lo que la magnitud del daño neuronal y las alteraciones funcionales inducidas por la isquemia podrían ser diferentes cuando los fármacos neuroprotectores son evaluados a corto o a largo plazo.

Por otra parte, dado que las estructuras cerebrales más vulnerables a la isquemia cerebral global aguda, (hipocampo, neocorteza , cuerpo estriado – núcleo caudado, putamen, estriado ventral - y cerebelo) participan de manera importante en la integración de las funciones cognoscitivas, las características de diversas modalidades de aprendizaje y memoria han sido utilizadas como indicadores de la lesión y/o alteración funcional de las estructuras cerebrales involucradas [126,127]. Se sabe que un gran porcentaje de pacientes que sobreviven a un paro cardíaco y a la isquemia cerebral consecutiva han presentado alteraciones del aprendizaje y de la memoria para eventos ocurridos después del episodio isquémico [128,129], que pueden relacionarse con el daño severo del hipocampo, especialmente en la región CA1, observado en estudios post mortem en este tipo de pacientes [130,131]. Cabe señalar que las neuronas piramidales ubicadas en los segmentos del cuerno de Ammon del hipocampo y en las capas III y V de la corteza cerebral están incluidas entre las neuronas más vulnerables a la isquemia, tanto en seres humanos como en animales de experimentación [126-132].

La evidencia acerca de la participación del hipocampo en la formación de representaciones mentales de la información espacial y su capacidad de almacenarla en forma de mapas cognoscitivos aloécnicos o egocéntricos [133] sustenta el hecho de que la lesión del hipocampo y de estructuras relacionadas funcionalmente (fórnix, septum, corteza entorrinal, subículo y postsubículo) da lugar a deficiencias permanentes en una variedad de habilidades espaciales [134], en cuya integración tienen asimismo gran relevancia las conexiones del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo y el subículo con la corteza prefrontal medial ipsilateral [135-139], así como las aferencias glutamatérgicas, dopaminérgicas y colinérgicas a esta estructura [140,141].

En vista de estos antecedentes parece importante investigar si la preservación significativa de la población neuronal del hipocampo observada 7 días después de un episodio de isquemia cerebral global aguda y tratamiento con melatonina durante las 6 horas siguientes post-isquemia [82], se mantiene a largo plazo y se asocia con la preservación de funciones que dependen fundamentalmente del flujo y la integración adecuada de la información al través del circuito trisináptico del hipocampo y sus repercusiones sobre la integración de funciones cognoscitivas.

En el presente estudio se ha planteado como hipótesis de trabajo que: el tratamiento con melatonina durante las 6 horas siguientes a un episodio de isquemia cerebral global aguda tendrá repercusiones a largo plazo reduciendo significativamente la pérdida de neuronas piramidales del cuerno de Ammon y de las capas 3 y 5 de la corteza cerebral y reduciendo significativamente las alteraciones del aprendizaje y la memoria espacial en comparación con estas alteraciones observadas en ratas isquémicas sin tratamiento.

El objetivo general del presente estudio fue la evaluación a largo plazo del efecto neuroprotector de la melatonina mediante parámetros morfológicos y funcionales de la integridad de estructuras cerebrales vulnerables de ratas sometidas a isquemia cerebral global aguda. Los objetivos específicos fueron la evaluación de las poblaciones de células piramidales remanentes en los diferentes segmentos del cuerno de Ammon del hipocampo y en las capas III y V de la corteza pre-frontal medial; así como la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial y de la memoria de trabajo espacial susceptibles de ser alterados por la lesión del hipocampo y/o de la corteza prefrontal medial [142,143].

MATERIALES Y METODOS

Animales y compuestos químicos

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

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

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

Modelo experimental de isquemia cerebral global.

Se utilizo el modelo de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los 4 vasos (4VO) [144,145]. Bajo anestesia con clorhidrato de xilacina (10 mg/kg i.m.) y ketamina (90 mg/kg, i.m.) las arterias vertebrales se ocluyeron permanentemente mediante electrocauterización a través del foramen alar de la primera vértebra cervical. Las arterias carótidas comunes se aislaron y se dejaron referidas con hilo quirúrgico de seda de calibre tres ceros (000). Adicionalmente, un hilo quirúrgico de seda de calibre (0) de 15 cm de longitud se colocó a través de la región cervical de la rata por delante de los músculos cervicales y paravertebrales y detrás de la tráquea, esófago, venas yugulares

externas, arterias carótidas y nervios vagos. Este hilo quedó colocado por debajo de la piel de la nuca, rodeando los músculos cervicales y paravertebrales. Un catéter de 10 cm de longitud (Clay Adams, PE-50) lleno con heparina en solución salina (100 U/ml), se insertó en la vena yugular interna derecha, el extremo libre se extrajo por la nuca. Inmediatamente después de la cirugía, a cada rata se le suministró solución salina fisiológica (2ml/100g de peso corporal, s.c.) para proporcionar hidratación posquirúrgica, y se colocaron en jaulas individuales para su recuperación. Cuarenta y ocho horas después, bajo anestesia con halotano (halotano al 2% en oxígeno), se expusieron ambas arterias carótidas y se hizo tracción del hilo de seda cervical 1-0 con el propósito de interrumpir el flujo sanguíneo colateral proveniente de los músculos del cuello. Se interrumpió la anestesia y las arterias carótidas comunes se ocluyeron por un periodo de 15 minutos mediante clips quirúrgicos microvasculares. La interrupción del flujo sanguíneo de las arterias carótidas se verificó bajo un microscopio de cirugía. La temperatura corporal se registró y mantuvo a $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por medio de un cojín eléctrico. A continuación, se dio por terminada la compresión de los músculos cervicales al suspender la tracción del hilo de seda cervical y los clips quirúrgicos fueron retirados de las arterias carótidas, las cuales fueron revisadas bajo el microscopio para verificar la restauración del flujo sanguíneo. El estado de conciencia de las ratas fue evaluado mediante la presencia del reflejo de enderezamiento. Sólo aquellas ratas que se mantuvieron inconscientes durante la oclusión de las carótidas y por lo menos 20 minutos posteriores a la remoción de los clips quirúrgicos microvasculares de las carótidas se incluyeron en el estudio.

Grupos y tratamiento.

Las ratas se asignaron al azar a los siguientes grupos. Grupo 1: Intacto (n=8), Grupo 2: "Sham" (n=8), animales sometidos a procedimientos anestésicos y quirúrgicos sin la interrupción del flujo sanguíneo cerebral; Grupo 3: Isquemia + Vehículo (n=8), animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 min mediante 4VO y administración del vehículo de melatonina (solución 10%

etanol en NaCl 0.9% iv), 3.0 ml/kg/h por un periodo de 6 h, a partir de los 30 minutos luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas; Grupo 4: Isquemia + Melatonina (n=8), animales sometidos a isquemia cerebral global aguda durante 15 min mediante 4VO y administración de melatonina 10 mg /kg/h en etanol al 10% en NaCl 0.9% iv, por un periodo de 6 h, a partir de los 30 minutos luego de la remoción de los clips de las arterias carótidas.

Una vez recuperadas las ratas, 90 días después de la isquemia se sometieron a las siguientes pruebas conductuales.

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

El aprendizaje espacial fue evaluado mediante el laberinto acuático de Morris [146]. Se utilizó una tina circular de color negro (140 cm. de diámetro, 50 cm. de altura) que se llenó con agua teñida de color azul oscuro hasta una profundidad de 25 cm, a una temperatura de 26°C. La tina se colocó en un espacio donde pudieran identificarse una variedad de señales externas alrededor del laberinto (investigador, puerta, ventana, etc.) útiles para la orientación espacial del animal. El laberinto se dividió conceptualmente en cuatro cuadrantes del mismo tamaño referidos a los puntos cardinales y en tres círculos concéntricos equidistantes. Una plataforma de escape transparente (13 x 13 cm) sumergida 2 cm por debajo de la superficie del agua, se colocó en una posición fija en el centro de uno de los cuatro cuadrantes, a 28 cm de distancia de la pared del laberinto. La plataforma se mantuvo en el mismo cuadrante a lo largo del experimento. En el laberinto, se permitió a las ratas la búsqueda de la plataforma de escape usando solamente las referencias espaciales del ambiente, las cuales se conservaron constantes a través de los días de prueba. Cada rata ejecutó 2 ensayos diarios con un intervalo de 20 minutos, durante 7 días. Para cada ensayo, la rata se introdujo al agua, de cara a la pared de la tina, en uno de los cuatro cuadrantes alrededor del perímetro de la tina, el cual varió cada día de manera semi-aleatoria, pero fue el mismo en cada día de ensayo para todas las ratas. El ensayo finalizó cuando la rata encontró la

plataforma antes de 60 segundos (latencia de escape); de lo contrario la rata era conducida hasta la plataforma por el experimentador donde era colocada durante 15 seg y se le asignaba un valor de latencia de escape de 60 segundos. El desempeño de la rata en cada ensayo se grabó mediante una video cámara (Sony Handy Cam CCD-TR490, Tokio) ubicada sobre el laberinto. Los valores de latencia de escape (seg), la distancia de nado (m) recorrida en la búsqueda de la plataforma, la velocidad de nado (cm/seg), así como el predominio del nado en las zonas delimitadas por los dos círculos internos o entre el círculo externo y la pared del laberinto (índice interno/externo) obtenidos de cada rata durante los dos ensayos diarios fueron promediados y analizados.

Prueba de transferencia.

Al término de los siete días de ensayos, cada rata se sometió a una prueba de transferencia (30 seg) para evaluar la memoria espacial, en la que se permitió a cada rata la búsqueda de la plataforma, que había sido previamente retirada del laberinto. El tiempo transcurrido en el cuadrante donde originalmente estuvo colocada la plataforma; así como el número de cruces por el sitio correspondiente a la ubicación original de la plataforma, fueron registrados y analizados.

Evaluación de la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial de ocho brazos (Olton).

Después de una semana de restricción parcial de alimento a fin de mantener a las ratas en el 80% de su peso corporal, se evaluó su memoria de trabajo mediante el laberinto de 8 brazos, [147] durante diez días. El aparato consistió de una plataforma central octagonal (30 cm de ancho) y ocho brazos (66 cm de longitud, 10 cm de ancho y 6.0 cm de altura) dispuestos de manera radial, con una cavidad (5 x 5 cm, 1 cm de profundidad) en su extremo distal; todo elevado a 70 cm del piso. El laberinto se colocó en un espacio rodeado de una variedad de señales externas para la orientación espacial del animal, las cuales permanecieron constantes durante todos los ensayos. Las ratas se adaptaron al

laberinto durante tres días, antes de iniciar los ensayos de prueba. En el primer día, a cada rata se le permitió explorar el laberinto individualmente durante 10 min; en este periodo, se esparcieron pequeñas porciones de alimento (trozos de cereal de frutas, aproximadamente 3 mg) sobre toda la superficie del piso del laberinto. En los días 2 y 3, se colocó un trocito de alimento en la cavidad ubicada en el extremo distal de cada brazo y se permitió que cada rata explorara laberinto por 10 min. Para los ensayos experimentales, cada rata fue colocada en la plataforma central del laberinto y se le permitió que hiciera la selección de cada brazo, entrara y comiera el alimento en los 8 brazos en un tiempo límite de 10 min. Para cada ensayo se registró el tiempo empleado en localizar y consumir los 8 trocitos de alimento. El ingreso a los brazos con alimento se registró como aciertos. El reingreso a los brazos que habían sido previamente visitados durante el ensayo se registró como error de memoria de trabajo. Las ratas se sometieron a un total de 10 ensayos en 2 semanas. Después del último ensayo, la restricción de alimento se suspendió y se permitió que las ratas recuperaran su peso.

Análisis histológico

Al terminar las evaluaciones de aprendizaje y memoria y la recuperación del peso corporal (4 meses después del episodio de isquemia) las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (35mg/kg) y perfundidas por vía intracardiaca con solución salina seguida por una solución de formol al 10% en amortiguador de fosfatos. Se extrajeron los cerebros y se dejaron en inmersión en el mismo fijador por lo menos 2 días antes del procesamiento histológico. Mediante cortes coronales de cada cerebro se obtuvieron rebanadas de tejido cerebral de 3.0 mm de grosor que contenían el hipocampo dorsal y la corteza prefrontal dorsomedial, las cuales se deshidrataron y incluyeron en parafina. De estas muestras se obtuvieron cortes coronales de 10 μ m de grosor que se tiñeron con violeta de cresilo [148]. De cada cerebro se obtuvieron cinco cortes de la parte del hipocampo dorsal localizada entre las coordenadas esterotáticas -3.14mm y -4.52 mm a partir de Bregma [149] y cinco cortes de la parte de la

corteza prefrontal dorsomedial localizada entre las coordenadas esterotáticas +2.7mm y -0.26mm a partir de Bregma [149], para el conteo de las neuronas piramidales de las regiones CA1, CA2, CA3 e *hilus* del cuerno de Ammon del hipocampo y de las capas III y V de la corteza prefrontal. La evaluación de las poblaciones de neuronas piramidales en estas regiones fue realizada en forma ciega por un observador, bajo microscopía de luz, a una amplificación de 400X. Se contó el número de neuronas presentes en un área de 15,000 μm^2 de las diferentes regiones del cuerno de Ammón y en un área de 30,000 μm^2 de las capas III y V de la corteza prefrontal. Únicamente se contaron las neuronas piramidales que mostraron una morfología normal, con nucleolo visible y definición clara del citoplasma y del núcleo.

Análisis Estadístico.

Los parámetros de desempeño en el laberinto acuático de Morris se analizaron de la siguiente manera: ANOVA de Friedman seguido por prueba de Wilcoxon, ANOVA de Kruskal- Wallis seguida por prueba de U Mann- Whitney, se utilizaron para el análisis de diferencias intra- e intergrupales respectivamente, en latencia de escape. Los datos de distancia de nado, velocidad de nado e índice interno/externo se compararon entre los grupos mediante una ANOVA de medidas repetidas seguida por una prueba de Tukey. El número de cruces y el tiempo de permanencia en el cuadrante seleccionado se analizaron por ANOVA seguido por prueba de Tukey [150,151].

Los parámetros de desempeño en el laberinto de Olton de ocho brazos se analizaron de la siguiente manera: Los datos de errores de memoria de trabajo se compararon entre los grupos mediante una ANOVA de medidas repetidas seguido por una prueba de Tukey. Para analizar los datos del tiempo empleado en el consumo de los 8 trocitos de alimento, se emplearon ANOVA de Friedman seguido por prueba de Wilcoxon y ANOVA de Kruskal-Wallis seguida por la prueba U de Mann – Whitney para el análisis de las diferencias intra- e intergrupales, respectivamente [150,151].

La comparación estadística del número promedio de neuronas piramidales contadas en los segmentos del cuerno de Ammon y las capas III y V de la corteza cerebral se realizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey [150,151].

RESULTADOS

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

Las latencias de escape y la longitud de las trayectorias de nado registradas en los grupos Intacto y "Sham" durante el período de 7 días de prueba mostraron una reducción progresiva en los días de prueba sucesivos, de tal manera que los valores de estos parámetros fueron significativamente menores al tercer día de prueba en comparación con aquellos observados el primer día de prueba; en estas condiciones, los valores de latencia de escape (Fig. 2) y la longitud de las trayectorias de nado requeridas para encontrar la plataforma alcanzaron su valores más bajos el tercer día de prueba (de 8.55 m a 2.87 m en el grupo Intacto; de 10.31 m a 2.28 m en el grupo "Sham"), sin cambios significativos durante los cuatro días de prueba restantes.

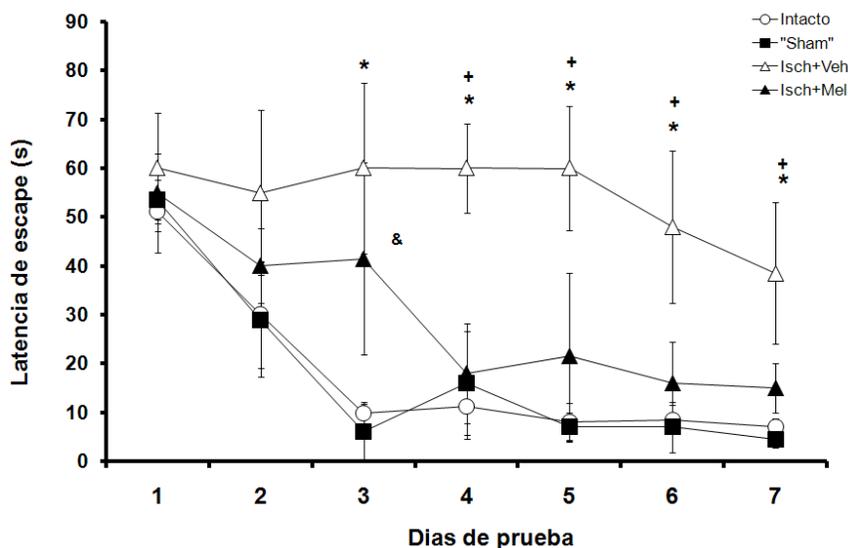


Figura 2. Aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris durante 7 días de prueba, 90 días después del episodio de isquemia cerebral global aguda, o el período equivalente en los diferentes grupos experimentales (n=8). Las latencias de escape (mediana \pm EE) adquirieron sus valores mínimos al tercer día de prueba en los grupos Intacto y "Sham" y al cuarto día de prueba en el grupo isquémico tratado con melatonina; mientras que las latencias de escape no mostraron reducción significativa durante el período de prueba en el grupo isquémico tratado con vehículo. * $p < 0.05$ Isq + Veh Vs. Intacto ó "Sham"; + $p < 0.05$ Isq + Veh Vs. Isq + Mel; & $p < 0.05$ Isq + Mel Vs. Intacto ó "Sham".

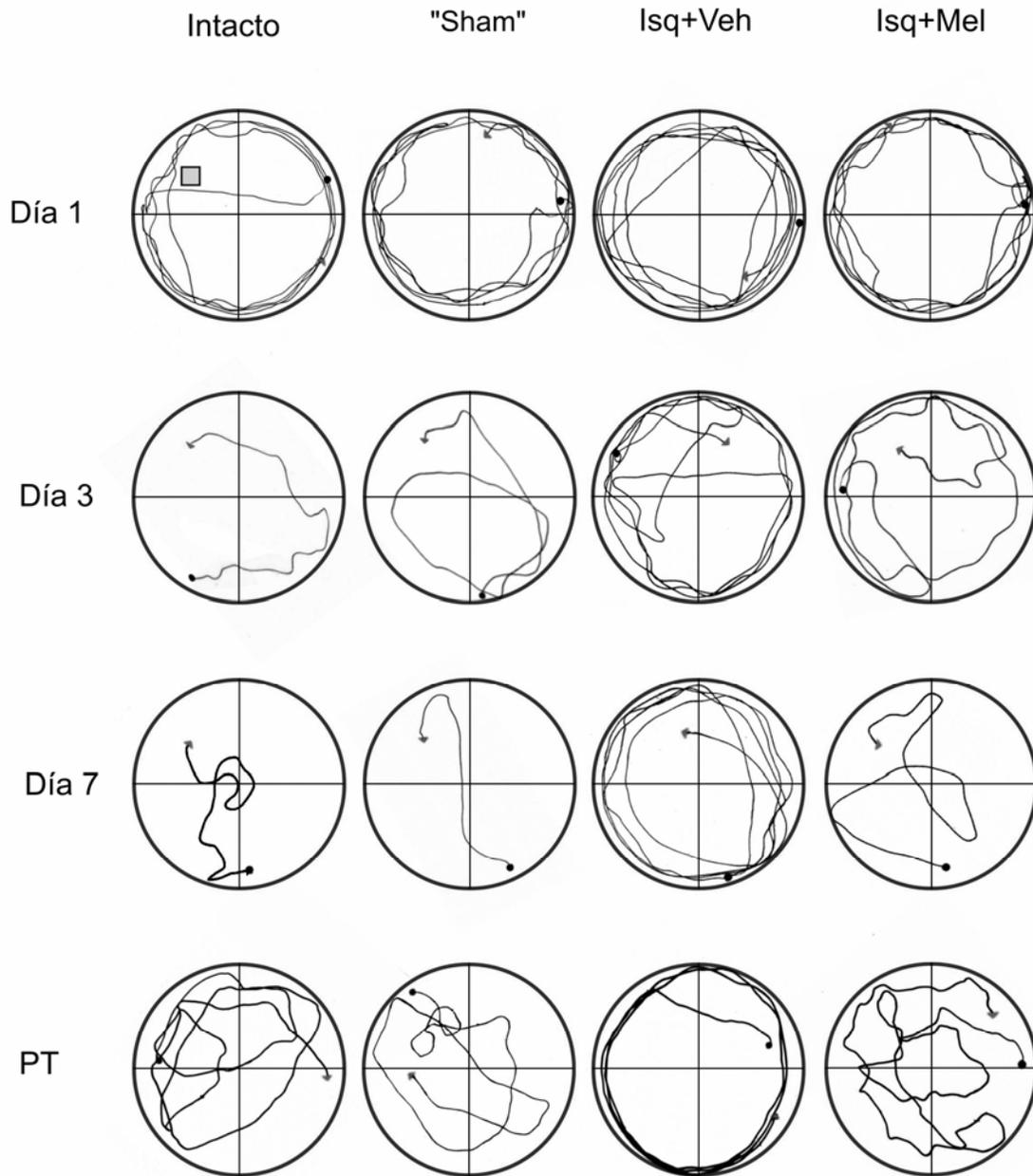


Figura 3. Trayectorias representativas del nado de los diferentes grupos experimentales en el laberinto acuático de Morris en los días de prueba 1, 3 y 7 y en la prueba de transferencia. Las trayectorias de nado circulares cerca de la pared de la tina (tigmotaxis) que se observan en todos los grupos el día 1, cambia a trayectorias orientadas hacia la parte interna del laberinto y el sitio de ubicación de la plataforma sumergida en los grupos Intacto, "Sham" e Isquemico tratado con melatonina (Isq + Mel), en tanto que en el grupo isquémico tratado con vehículo (Isq + Veh) se observaron tigmotaxis persistentes.

En estos grupos se observó un patrón de nado circular con trayectorias cercanas a la pared de la tina (tigmotaxis) los primeros días de prueba; el cual cambió a otro con trayectorias orientadas hacia el centro de la tina, preferentemente hacia el sitio de ubicación de la plataforma, conforme las latencias de escape y la longitud de las trayectorias se redujeron al mínimo (Fig. 3). De hecho, los animales de estos grupos se desplazaron en la zona interior del laberinto, cerca del sitio donde estuvo ubicada la plataforma, durante la búsqueda de la plataforma durante la prueba de transferencia (Fig. 3).

A diferencia de lo observado en los grupos Intacto y "Sham", las ratas de grupo Isq + Veh no mostraron reducción de las latencias de escape y de la longitud de las trayectorias de nado requeridas para alcanzar la plataforma durante los días de prueba sucesivos en el laberinto acuático de Morris; de hecho los valores de esos parámetros obtenidos en cada prueba diaria, no difirieron significativamente de los observados el primer día de prueba. Estas características de ejecución de las pruebas se asociaron con tigmotaxis persistente, no obstante que las ratas nadaron sobre la plataforma sumergida durante los días de prueba o que cruzaran por el cuadrante y el sitio donde estuvo colocada la plataforma, durante la prueba de transferencia (Fig. 3). De esta manera, sus latencias de escape (Fig. 2), y la longitud de las trayectorias de nado (de 11.23 m a 9.09 m) fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) del día 3 al día 7 de prueba, en comparación con los grupos Intacto y "Sham".

Por otra parte, los animales del grupo Isq + Mel mostraron un patrón de nado semejante al ejecutado por los animales de los grupos Intacto y "Sham", en función de la búsqueda y localización de la plataforma sumergida (Fig. 3), lo que dio lugar a la reducción significativa ($p < 0.05$) de las latencias de escape (Fig. 2) y de la longitud de las trayectorias de nado hasta valores mínimos a partir del cuarto día de prueba en comparación con el primer día de prueba (de 11.43 m a 5.03 m). Los valores de dichos parámetros fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los observados en el grupo Isq + Veh (11.23 m a 9.09 m), y no

fueron diferentes de los observados en los grupos Intacto y “Sham”, en las pruebas efectuadas del cuarto al séptimo día del período de prueba.

Conforme la estrategia de búsqueda de la plataforma sumergida se orientó hacia la zona interna del laberinto acuático, los índices de las trayectorias de nado en el interior y en el exterior del laberinto (inner/outer index) aumentaron progresivamente en los grupos Intacto, “Sham”, e Isq + Mel; en tanto que la persistencia de valores pequeños de este índice en el grupo Isq + Veh, dio por resultado diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los grupos Intacto y “Sham” los días de prueba 4 a 7, y con respecto al grupo Isq + Mel los días de prueba 5 a 7 (Fig. 4).

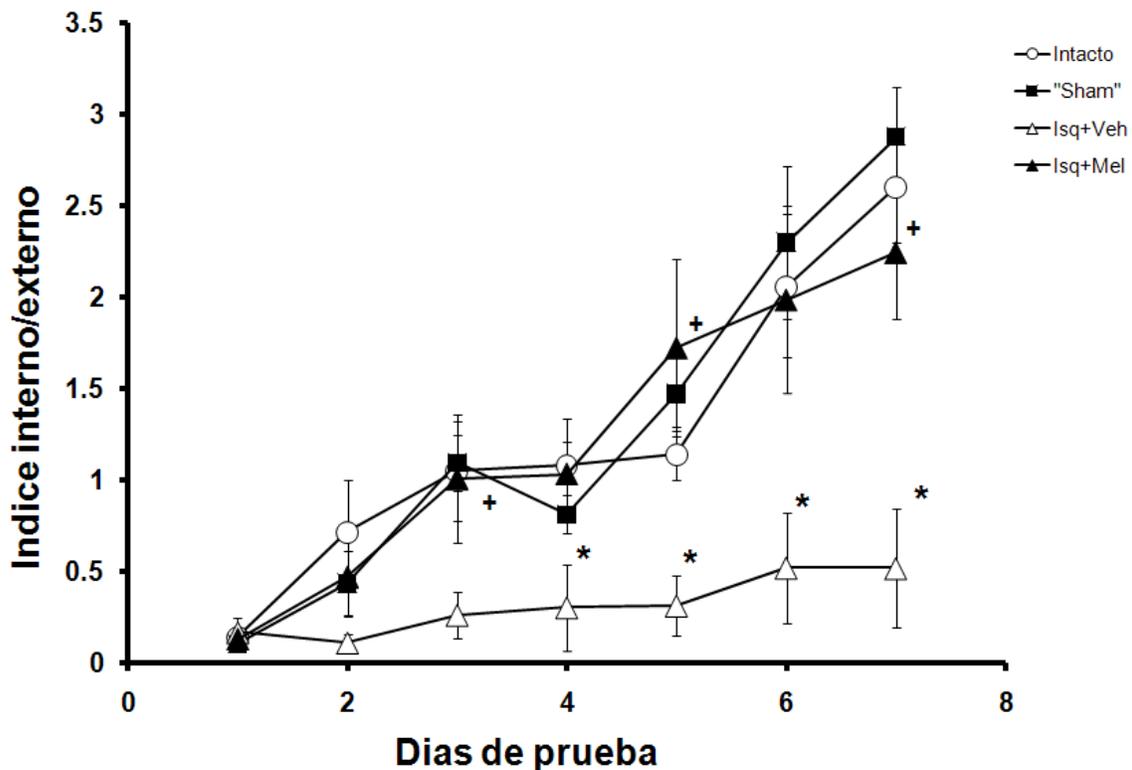


Figura 4. Índices de nado interno/externo (mediana \pm EE) de los diferentes grupos experimentales ($n=8$) durante el período de 7 días de prueba. El grupo isquémico tratado con vehículo (Isq+Veh) nadó significativamente menos en la parte interna del laberinto lo que dio por resultado índices de nado significativamente menores que los de los otros grupos experimentales. * $p < 0.05$: Isch + Veh vs grupos Intacto o “Sham”.+ $p < 0.05$ Isch + Mel Vs Isch + Veh.

El tiempo de permanencia de las ratas del grupo Isq + Veh en el cuadrante donde originalmente estuvo ubicada la plataforma, durante la prueba de transferencia, fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el tiempo de permanencia de las ratas de los grupos Intacto, "Sham" e Isq + Mel (Fig. 5). Se obtuvieron resultados similares del análisis comparativo del número de cruces sobre el sitio de ubicación original de la plataforma (Media \pm SD; Intacto, 5.1 ± 0.9 ; "Sham", 4.8 ± 0.8 ; Isq + Veh, 1.9 ± 0.5 ; Isq + Mel, 3.2 ± 0.8). La velocidad de nado no mostró diferencias significativas en las diversas condiciones experimentales.

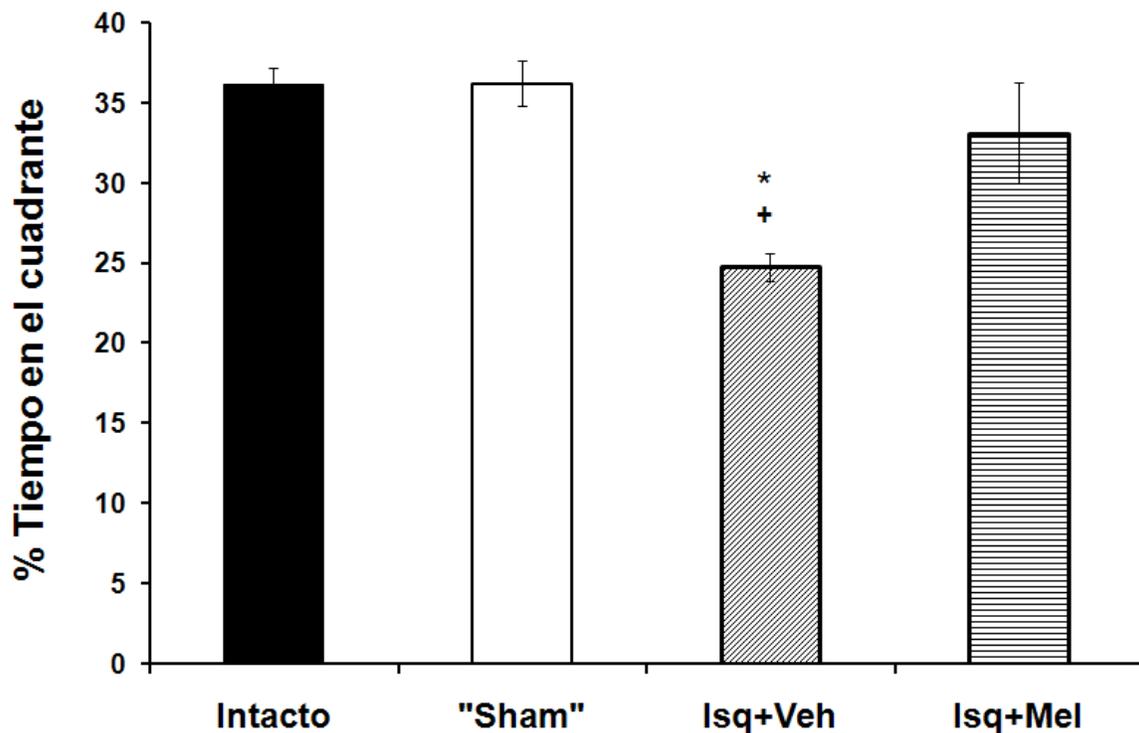


Figura 5. Permanencia en el cuadrante donde originalmente estuvo situada la plataforma, durante la prueba de transferencia (porcentaje de la duración total de la prueba). El grupo isquémico tratado con vehículo (Isq + Veh) permaneció significativamente menos tiempo que los otros grupos. * $p < 0.05$: Isq + Veh vs grupos Intacto o "Sham", + $p < 0.05$: Isq + Mel vs Isq + Veh.

Los resultados de la evaluación de la memoria de trabajo en los diferentes grupos y condiciones experimentales en el laberinto de 8 brazos de Olton, se muestran en la figura 6, utilizando como parámetro el número de errores de memoria de trabajo. Luego de un período de tres días de entrenamiento, el número de errores de memoria de trabajo en el grupo Isq + Veh fue significativamente mayor que en los grupos Intacto y "Sham" los días de prueba 1 a 6, no obstante la reducción progresiva del número de errores de trabajo observada en estos tres grupos (Intacto, "Sham", Isq + Veh), lo que dio por resultado valores similares de errores de memoria de trabajo los días de prueba 7 a 10. Los errores de memoria de trabajo en el grupo Isq + Mel tuvieron valores intermedios entre los grupos Intacto y "Sham" y el grupo Isq + Veh durante todo el período de prueba, y solo difirieron el día 3 de prueba con respecto a los del grupo Intacto y el día 6 de prueba con respecto a los del grupo "Sham"; así como el día 2 de prueba con respecto a los del grupo Isch + Veh.

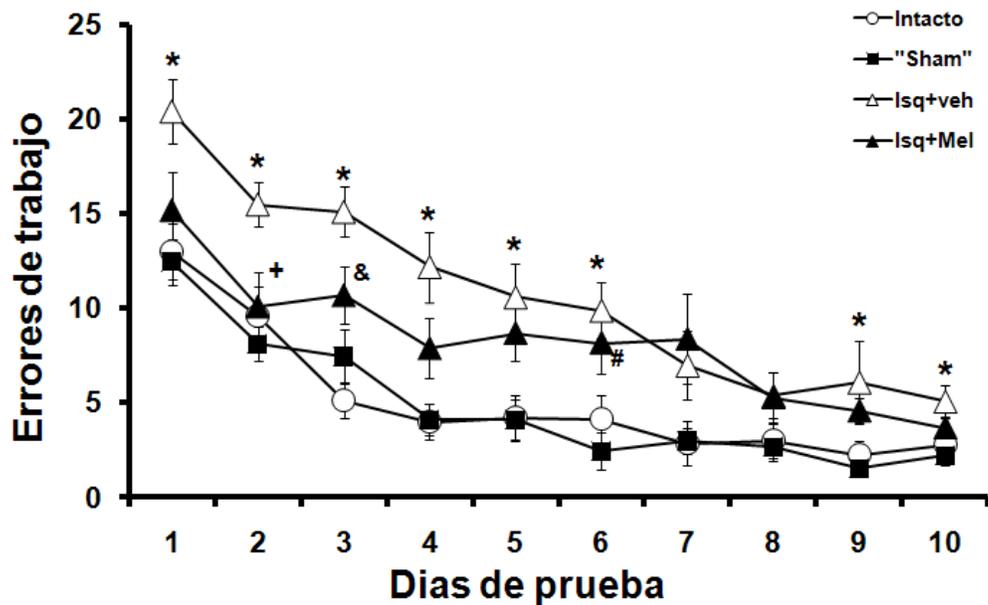


Figura 6. Número de errores de memoria de trabajo (mediana \pm EE) de los diferentes grupos experimentales (n=8) en el laberinto de 8 brazos de Olton durante el período de 10 días de prueba. El número de errores de memoria de trabajo en el grupo isquémico tratado con vehículo (Isq+Veh) y en el grupo isquémico tratado con melatonina (Isq+Mel) fue significativamente mayor, en comparación con los grupos Intacto y "Sham". $p < 0.05$: * Isq+Veh Vs Intacto o "Sham", + Isq+Mel Vs Isq+Veh, & Isq+Mel Vs Intacto, # Isq+Mel Vs "Sham".

El tiempo para encontrar las ocho porciones de comida también mostró una reducción progresiva conforme disminuyó el número de errores de memoria de trabajo durante el período de prueba, con algunas diferencias entre los grupos. Así, estos valores variaron entre 9 a 10 min en el primer día de prueba en todos los grupos, sin embargo, los grupos Intacto y "Sham" acortaron el tiempo para encontrar las ocho porciones de comida a 2 min los días 5 a 10 de prueba, en tanto que el tiempo requerido para completar la prueba en los mismos días fue significativamente mayor ($p < 0.05$; 8min el día 5, 6 min los días 8-10) en el grupo Isq + Veh. El grupo Isq + Mel empleó en promedio entre 5 y 6 min para consumir las 8 porciones de comida entre los días 5 a 10, sin diferencias significativas con los grupos Intacto, "Sham" e Isq + Veh.

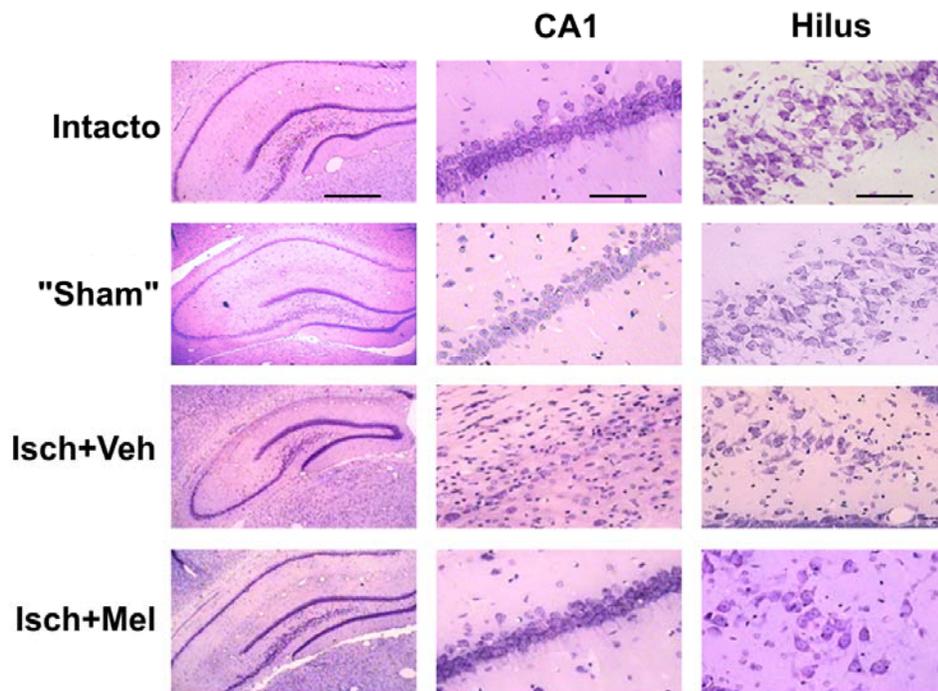


Figura 7. Cortes coronales representativos de las características morfológicas del hipocampo de las ratas de los grupos Intacto, "Sham", isquémico tratado con vehículo (Isq+Veh), isquémico tratado con melatonina (Isq+Mel). Las imágenes del lado izquierdo muestran las diferentes regiones del hipocampo (escala = 1 mm), seguidas por imágenes de CA1 y del *hilus* a mayor amplificación (escala = 100 μ m). Son evidentes, la disminución de la población neuronal, principalmente en CA1 y la preservación de una gran proporción de la población neuronal del cuerno de Ammon 120 días después del episodio de isquemia y tratamiento con melatonina.

Las ratas del grupo Isq + Veh mostraron una reducción significativa de la población de neuronas piramidales de los diferentes segmentos del cuerno de Ammón del hipocampo, en comparación con la población neuronal de dicha estructura en los animales de los grupos Intacto o “Sham” (Fig. 7, Tabla 1). La mayor pérdida neuronal se observó en las regiones CA1 y CA2 (23% y 51% de neuronas remanentes en relación con el grupo Intacto, respectivamente), en tanto que el segmento CA3 y el *hilus* tuvieron una pérdida de neuronas menos severa (73.3% y 64.2 % de neuronas remanentes, respectivamente). Asimismo, la desaparición de las diferentes proporciones de los componentes neuronales de la capa piramidal del cuerno de Ammón se asoció con una intensa reacción astrocítica y microglial (Fig. 7).

El tratamiento con melatonina previno la pérdida de una proporción importante de neuronas piramidales de los segmentos CA1 y CA2 del cuerno de Ammón (78.7% y 88.1% de neuronas remanentes, respectivamente); en estas condiciones no se observaron diferencias significativas en la población de neuronas piramidales del cuerno de Ammón entre los grupos Intacto, “Sham” e Isq + Mel.

Tabla 1. Numero de neuronas (media \pm EE) y porcentajes en relación a el grupo intacto (100%) en áreas de 15 000 μm^2 en los segmentos CA1, CA2, CA3 e hilus de el hipocampo dorsal de los grupos Intacto, “Sham”, Isq + Veh e Isq + Mel.

Grupos	CA1	%	CA2	%	CA3	%	Hilus	%
Intacto	36.49 \pm 2.39	100.0	21.79 \pm 0.57	100.0	17.99 \pm 0.70	100.0	19.16 \pm 0.54	100.0
“Sham”	34.72 \pm 1.27	95.1	21.94 \pm 1.39	100.6	17.53 \pm 1.11	97.4	18.72 \pm 0.75	97.7
Isq + Veh	8.55 \pm 0.67**	23.4	11.37 \pm 2.24**	52.1	13.19 \pm 0.85*	73.3	12.30 \pm 1.39**	64.2
Isq + Mel	28.73 \pm 3.72 ^{&}	78.7	19.20 \pm 2.42 ^{&}	88.1	15.48 \pm 1.53	86.0	13.47 \pm 2.31	71.7

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, cuando se compara con el grupo Intacto y “Sham”.

[&] $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo Isq + Veh

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos en cuanto a la población de neuronas piramidales remanentes en un área de $30,000 \mu^2$ en las capas III (Media \pm DE; Intacto 28.5 ± 1.4 , "Sham" 28.8 ± 1.2 , Isq + Veh 26.5 ± 1.7 , Isq + Mel 30.3 ± 1.0) y V (Intacto 24 ± 0.8 , "Sham" 22.4 ± 1.5 , Isq + Veh 25.1 ± 1.0 , Isq + Mel 27.2 ± 1.0) de la corteza prefrontal.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados experimentales del presente estudio muestran que el tratamiento con melatonina durante las 6 h siguientes a un período de 15 min de isquemia cerebral global aguda da lugar, a largo plazo, a una preservación significativa de la población neuronal del cuerno de Ammon, así como a una ejecución de las tareas de aprendizaje y memoria de trabajo espacial mejor que la observada en los sujetos isquémicos tratados con vehículo. Esta evidencia sustenta el efecto neuroprotector de la melatonina en contra de los mecanismos fisiopatológicos de daño cerebral que ocurren inmediatamente después de la isquemia global y la reperusión cerebral subsecuente.

La pérdida significativa de las neuronas piramidales de las regiones del cuerno de Ammon del hipocampo ha sido un hallazgo sistemático, luego de isquemia cerebral global aguda en animales de experimentación [15,17,18,82,132,144]. Esto se debe a la gran vulnerabilidad de esas neuronas ante los fenómenos fisiopatológicos que dan por resultado muerte neuronal inmediata o tardía [15,17,18,46]. Por ello, la preservación de la población neuronal del hipocampo dorsal ha sido considerada como un indicador del efecto neuroprotector de varios fármacos capaces de contrarrestar el daño provocado por la isquemia en esos componentes celulares del sistema nervioso central [62,82,116,132,152].

De acuerdo con ello, los resultados del presente estudio sustentan el efecto neuroprotector de la melatonina ya que la pérdida severa de neuronas piramidales que ocurriría en ausencia del tratamiento neuroprotector y prevalecería 4 meses después del episodio de isquemia, se redujo significativamente cuando una dosis grande (10 mg/ kg/ h) de melatonina fue administrada mediante infusión continua iv, durante las 6 horas siguientes al período de isquemia cerebral global aguda. Puede asumirse que el tratamiento con melatonina luego del episodio de isquemia coincide con una ventana de oportunidad terapéutica para su efecto neuroprotector, y que bajo esas condiciones, las concentraciones plasmáticas alcanzadas [153] y las acciones de la melatonina [35,89-94,97], son efectivas para prevenir la muerte neuronal

que ocurre a corto plazo, como ha sido mostrado en estudios efectuados en otros modelos de isquemia cerebral global [81,82,109]; así como para preservar la supervivencia a largo plazo de las neuronas piramidales del hipocampo y de la corteza prefrontal.

Las múltiples acciones antioxidantes de la melatonina incluyendo el atrapamiento de radicales libres oxidantes y la mayor actividad de enzimas antioxidantes son, entre las acciones de la melatonina, el punto de partida de fenómenos celulares a los que se han atribuido mayormente sus efectos neuroprotectores contra el daño cerebral por isquemia. De esta manera, la melatonina podría contrarrestar la sobreproducción de radicales libres [64,81,89,91,97] y sus consecuencias dañinas sobre el funcionamiento mitocondrial, que también puede dar lugar a la activación de mecanismos proapoptóticos [92-94]; todos ellos fenómenos relevantes conducentes al daño cerebral [19,21,28,44,46,154] por necrosis y apoptosis de las neuronas que forman parte de las estructuras cerebrales vulnerables. Además, el efecto neuroprotector de la melatonina mediado por la preservación de la organización del neuro-citoesqueleto, en contra del daño causado por los radicales libres [100,101] puede contribuir a la supervivencia neuronal luego de la isquemia.

Diversas evidencias [85,155,156] muestran que la melatonina no interfiere con los fenómenos de excitotoxicidad y que su efecto neuroprotector en modelos experimentales de excitotoxicidad inducida por ácido kainico se debe a sus acciones antioxidantes sobre radicales libres generados por dicho proceso.

La magnitud y localización de la pérdida neuronal en el cuerno de Ammon del hipocampo parece ser un factor determinante de las deficiencias permanentes del aprendizaje y la memoria espacial, como ha sido observado en seres humanos [128,129] y en animales de experimentación luego de isquemia cerebral global aguda por oclusión de los cuatro vasos, cuando la pérdida neuronal excede al 60% de la población normal de las neuronas piramidales del segmento CA1 del cuerno de Ammon del hipocampo [126,127,132]. En estas condiciones, cabría esperar una ejecución deficiente en las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, condición que

fue observada en el presente estudio por efecto de la isquemia cerebral en ausencia de tratamiento neuroprotector. De hecho, el impedimento del aprendizaje y la memoria espacial en el grupo Isq + Veh durante todo el período de 7 días de prueba y durante la prueba de transferencia en el laberinto acuático de Morris, efectuados 90 días después del episodio de isquemia, indican la presencia y permanencia de alteraciones importantes en funciones cognitivas que dependen principalmente de la integración neural hipocampal [109,126,127,135-137,157]. Por el contrario, las características prácticamente normales de la ejecución de las pruebas de aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, observadas en el grupo de ratas isquémicas tratadas con melatonina durante las primeras 6 h a partir del episodio de isquemia, sugiere que en estas condiciones la capacidad de integración neural del aprendizaje y la memoria espacial quedó preservada.

Si consideramos la correlación estructura/función que parece sustentar el efecto neuroprotector de la melatonina en lo que respecta al aprendizaje y la memoria espacial, cabría esperar un efecto semejante sobre la preservación de la memoria de trabajo espacial, en vista de la proporción importante de neuronas remanentes en el cuerno de Ammon del hipocampo y la ausencia de alteraciones significativas en la población de células piramidales de las capas III y V de la corteza prefrontal medial, ambas estructuras fundamentales como parte del sustrato neural subyacente a la integración de la memoria de trabajo espacial [142,143]. No obstante, la ejecución de las pruebas de memoria de trabajo espacial en las ratas isquémicas tratadas con melatonina mostró alteraciones en comparación con la observada en los animales de los grupos Intacto y "Sham", sin diferir claramente de la de las ratas del grupo Isq + Veh. Esta situación en el grupo Isq + Veh podría estar relacionada con la reducción severa de la población de neuronas piramidales en el cuerno de Ammon y sus consecuencias sobre la magnitud y características de su conectividad con las neuronas de la corteza prefrontal, aún en ausencia de modificaciones significativas de la población de neuronas piramidales de la corteza prefrontal. Sin embargo, los resultados sugieren que la relación morfo-funcional del

hipocampo con la corteza prefrontal no conservó o recuperó las características adecuadas en función de la integración normal de la memoria de trabajo espacial, aún cuando las acciones de la melatonina en contra de los mecanismos fisiopatológicos del daño inducido por la isquemia cerebral fueran ejercidas durante el período inmediato post-isquemia [158,159].

En su conjunto, los resultados del presente estudio permiten diferenciar las consecuencias del efecto neuroprotector de la melatonina sobre la preservación de las funciones cerebrales, con respecto a la recuperación funcional que pudiera ocurrir a largo plazo (4 meses después) a partir de un episodio de isquemia cerebral aguda en ausencia del tratamiento neuroprotector.

En este sentido, las evaluaciones morfo- funcionales efectuadas a largo plazo corresponden en el presente trabajo al consenso internacional acerca de las características del diseño de estudios preclínicos de neuroprotección que favorecen la correcta interpretación acerca de la presencia de un efecto neuroprotector real del fármaco en contraste con la capacidad propia de recuperación funcional de sistema nervioso central, luego del episodio de isquemia. Se ha señalado que la determinación de la importancia relativa de uno y otro de estos factores para el resultado final de las alteraciones morfológicas y funcionales postisquemia requiere que las evaluaciones correspondientes se efectúen, como en el presente trabajo, una vez transcurrido un periodo postisquemia mayor que el establecido en otros estudios de isquemia y neuroprotección, en los que las evaluaciones morfo- funcionales del daño se efectúan a corto plazo [82,88,114,115].

Cabe destacar el hecho de que el efecto neuroprotector de la melatonina que se muestra en el presente estudio deriva de las acciones de este compuesto durante un periodo inmediato corto, pero crítico para el resultado final del daño cerebral post – isquemia, durante el cual se asume que la melatonina podría contrarrestar mecanismos fisiopatológicos de daño inducidos por la isquemia cerebral que de otra manera darían lugar a la alteración permanente de la estructura y del funcionamiento de regiones cerebrales vulnerables.

REFERENCIAS

1. AMERICAN HEART ASSOCIATION. Dallas,Texas: American Heart Association; 2005. Heart Disease Statistics-2005 update. 2005.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report. Geneva: the World Health Organization Health Report. 2004.
3. LACY CR, SUH DC, BUENO M, KOSTIS J. Delay in presentation and evaluation for acute stroke. **Stroke** 2001; 32:63-69.
4. BRODERICK J, WILLIAM M. Feinberg Lecture: Stroke therapy in the year 2025.Burden, Breakthroughs and Barriers to Progress. **Stroke** 2004; 35:205-211.
5. PAYNE KA, HUYBRECHTS KF, CARO JJ, CRAIG TJ, KLITTICH WS. Long term cost-of-illness international review.**Pharmacoeconomics** 2002; 20:813-825.
6. AMES III A. CNS energy metabolism as related to function. **Brain Res Rev** 2000; 34:42-68.
7. CASTILLO J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. **Rev Neurol** 2000; 30:459-464.
8. FAROOKI AA, HAUN S, HORROCKS L. Ischemia and Hypoxia. En: Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. G S, (editor). New York: Raven Press Ltd 1994. pp. 867-883.
9. BRUST JCM. Circulación arterial del cerebro. En: Principios de Neurociencia KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM, (editors). Madrid, Espana McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 2001. pp. 1302-1316.
10. SARRAF-YAZDI S, LASKOWITZ D, WARNER D. Pathophysiology of Ischemic Brain Damage.En: Management Of Acute Stroke Shuaib A, Goldstein L, (editors). New York: Marcel Dekker Inc 1999. pp. 243-277.

11. SIESJO BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. **J Neurosurg** 1992; 77(2):169-184.
12. SHARP F, SWANSON R, HONKANIEMI J, KOGURE K, MASSA S. Neurochemistry and Molecular Biology. En Stroke: pathophysiology, diagnosis and management. B J, (editor): Churchill Livingstone; 1998. pp. 51-83.
13. SIESJO BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. **J Neurosurg** 1992; 77:337-354.
14. PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann Neurol** 1982; 11:491-498.
15. KIRINO T, TAMURA A, SANO K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia - reversible and irreversible types of ischemic cell damage. **Prog Brain Res** 1985; 63:39-55.
16. HOSSMAN JA. Post-ischemic resuscitation of the brain: selective vulnerability versus global resistance. **Prog Brain Res** 1985; 63:3-17.
17. PULSINELLI WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog Brain Res** 1985; 63:29-37.
18. LIPTON P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev** 1999; 79:1431-1568.
19. KOGURE K, ARAI H, ABE K, NAKANO M. Free radical damage of the brain following ischemia. **Prog Brain Res** 1985; 63:237-259.
20. BRIGHT R, MOCHLY-ROSEN D. The role of protein kinase C in cerebral ischemia and reperfusion injury. **Stroke** 2005; 36:2781-2790.
21. TRAYSTMAN RJ, KIRSCH JR, KOEHLER RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. **J Appl Physiol** 1991; 71:1185-1195.

22. WON SJ, KIM DY. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. **J Bioch Mol Biol** 2002; 35:67-86.
23. CHOI DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron** 1988; 1:623-634.
24. DEMEMIUK P. Arachidonic acid metabolites and membrane lipid changes in central nervous system injury. En: Pharmacological approaches to the treatment of brain and spinal cord injury. Stein DG BS, (editor). New York: Plenum Press 1988. pp. 23 -41.
25. CHAN PH, FISHMAN RA, LONGAR S. Cellular and molecular effects of polyunsaturated fatty acids in brain ischemia and injury. **Prog Brain Res** 1985; 63:227-235.
26. SCHALAEPFER WW, ZIMMERMAN UP. Mechanisms underlying the neuronal response to ischemic injury. Calcium - activated proteolysis of neurofilaments. **Prog Brain Res** 1985; 63:185-196.
27. CHIN JH, BUCKHOLZ TM, DE LORENZO RJ. Calmodulin and protein phosphorylation: implication in brain ischemia. **Prog Brain Res** 1985; 63:169-184.
28. CHAN PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke** 1996; 27:1124-1129.
29. SIESJO BK, HU B, KRISTIAN T. Is the cell death pathway triggered by the mitochondrion or the endoplasmic reticulum? **J Cereb Blood Flow Metab** 1999; 19:19-26.
30. BROOKES PS, YOON Y, ROBOTHAM JL, ANDERS MW, SHEU SS. Calcium, ATP and ROS: a mitochondrial love- hate triangle. **Am J Physiol Cell Physiol** 2004; 287:C817-C833.
31. REITER RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J** 1995; 9:526-533.

32. SHOHAMI E, BEIT-YANNAI E, HOROWITZ M, KOHEN R. Oxidative stress in closed-head injury: brain antioxidant capacity and an indicator of functional outcome. **J Cereb Blood Flow Metab** 1997; 17:1007-1019.
33. REITER RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Prog Neurobiol** 1998; 56:359- 384.
34. MARGAILL I, PLOTKINE M, LEROUET D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. **Free Rad Biol Med** 2005; 39:429-443.
35. REITER RJ, TAN DX, LEON J, KILIC U, KILIC E. When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. **Exp Biol Med** 2005; 230:104-117.
36. IADECOLA C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends Neurosci** 1997; 20:132-139.
37. MONCADA S, BOLANOS JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J Neurochem** 2006; 97:1676-1689.
38. CHEN J, GRAHAM SH, NAKAYAMA M, ZHU RL, JIN K, STETLER A. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x long are expressed in the rat brain following global ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab** 1997; 17:2-10.
39. HARA A, IWAI T, NIWA M, UEMATSU T, YOSHIMI N, TANAKA T. Immunohistochemical detection of Bax and Bcl-2 proteins in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia. **Brain Res** 1996; 711:249-253.
40. MARTINOU JC, DUBOIS MD, STAPLE JK, RODRIGUEZ I, FRANKOWSKI H. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. **Neuron** 1994; 13:1017-1030.
41. NICOTERA P, LEIST M, L M. Neuronal cell death:a demise with different shapes. **TIPS** 1999; 20:46-51.

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

52. BARONE FC, GZ F. Inflammatory mediators and stroke: New opportunities for novel therapeutics. **J Cereb Blood Flow Metab** 1999; 19:819-834.
53. TREMBLY B. Clinical potential for the use of neuroprotective agents. **Ann N Y Acad Sci** 1995; 765:1-20.
54. REITER RJ, TAN DX, PAPPOLLA MA. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. **Ann N Y Acad Sci** 2004; 1035:179-196.
55. MUIR KW, RL K. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. **Stroke** 1995; 26:503 - 513.
56. WAHLGREN NG, AHMED N. Neuroprotection in cerebral ischaemia: facts and fancies - the need for new approaches. **Cerebrovas Dis** 2004; 17:153-166.
57. DANYSZ W, PARSONS CG. Neuroprotective potential of ionotropic glutamate receptor antagonists. **Neurotox Res** 2002; 4:119-126.
58. HORN J, LIMBURG M. Calcium antagonists for ischemic stroke. **Stroke** 2001; 32:570-576.
59. TIRILAZAD INTERNATIONAL STEERING COMMITTEE. Tirilazad mesylate in acute ischemic stroke. **Stroke** 2000; 32:2257-2265.
60. MARSHALL JWB, CUMMINGS RM, BOWES LJ, RIDLEY RM, GREEN AR. Functional and histological protective effect of NXY-059 in a primate model of stroke when given 4 hours after occlusion. **Stroke** 2003; 34:2228-2233.
61. ENDRES M, NAMURA S, SHIMIZU-SASAMATA M, WAEBER C, ZHANG L, GOMEZ-ISLA T. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. **J Cereb Blood Flow Metab** 1998; 18:238-247.

62. MORALI G, LETECHIPIA-VALLEJO G, LOPEZ-LOEZA E, MONTES DEL CARMEN P, HERNANDEZ-MORALES L, CERVANTES M. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. **Neurosci Lett** 2005; 382:286-290.
63. WOJTAL K, TROJNAR MK, CZUCZWAR SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. **Pharmacol Rep** 2006; 58:335-340.
64. REITER RJ, ACUNA-CASTROVIEJO D, TAN DX, BURKHARDT S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Ann N Y Acad Sci** 2001; 939:200-215.
65. SANTINA A, ZANELLI NJ, SOLENSKI R, ROSENTHAL E, FISKUM G. Mechanisms of Ischemic Neuroprotection by Acetyl-L-carnitine. **Ann N Y Acad Sci** 2005; 1053:153-161.
66. GLADSTONE DJ, BLACK SE, HAKIM AM. Toward wisdom from failure. Lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. **Stroke** 2002; 33:2123 -2136.
67. DAVIS S, LEES K, DONNAN G. Treating the acute stroke patient as an emergency: current practices and future opportunities. **Int J Clin Pract** 2006; 60:399 - 407.
68. FLAMM E, DEMAPAULOS H, SELIGMAN M, POSER R, RANSOHOFF J. Free radicals in cerebral ischemia. **Stroke** 1978; 9:445-447.
69. WU D. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. **NeuroRx** 2005; 2:120-128.
70. DE KEYSER J, SULTER G, LUITEN PG. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemic stroke: are we doing the right thing? **Trends Neurosci** 1999; 22:535 -540.
71. YAKOVLEV AG, FADEN AI. Mechanisms of neural cell death: implications for development of neuroprotective treatment strategies. **NeuroRx** 2004; 1:5-16.

72. HUETHER G, POEGGELER B, ADLER L, RUTHER E. Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. **Eur J Pharmacol** 1993; 238:249 -254.
73. PANDI-PERUMAL SR, SRINIVASEN V, MAESTRONI GJM, CARDINALI DP, POEGGLER B, HARDELAND R. Melatonin:nature's most versatile biological signal?. **FEBS J** 2006; 273:2813-2838.
74. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr J** 1993; 1:57-60.
75. TAN DX, REITER RJ, MANCHESTER LC, YAN MT, EL-SAWI M. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr Top Med Chem** 2002; 2:181-197.
76. TAN DX, MANCHESTER LC, HARDELAND R, LOPEZ-BURILLO S, MAYO JC. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. **J Pineal Res** 2003; 34:75-78.
77. REITER RJ, TAN DX, OSUNA C, GITTO E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **J Biomed Sci** 2000; 7:444-458.
78. MENENDEZ -PELAEZ A, POEGGELER B, REITER RJ, BARLOW -WALDEN L, PABLOS MI. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: inmunocytochemical and radioinmunoassay evidence. **J Cell Biochem** 1993; 53:353-382.
79. TRICOIRE H, LOCATELLI A, CHEMINEAU P. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. **Endocrinol** 2002; 143:84-90.
80. REITER RJ, TAN DX, MANCHESTER LC. Antioxidative capacity of melatonin. En: Handbook of antioxidants Cadenas E, (editor). New York: Dekker 2002. pp. 556-613.
81. CUZZOCREA S, COSTANTINO G, GITTO E, MAZZON E, FULIA F. Protective effects of melatonin in ischemic brain injury. **J Pineal Res** 2000; 29:217-227.

82. LETECHIPIA-VALLEJO G, GONZALEZ-BURGOS I, CERVANTES M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. **Arch Med Res** 2001; 32:186-192.
83. CHEUNG RTF. The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. **J Pineal Res** 2003; 34:153-160.
84. JOO JY, UZ T. Opposite effects of pinealectomy and melatonin administration on brain damage following cerebral focal ischemia in rat. **Rest Neurol Neurosci** 1998; 13:185-191.
85. MANEV H, UZ T, KHARLAMOV A, JY J. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin-deficient rats. **FASEB J** 1996; 10:1546-1551.
86. KILIC E, OZDEMIR YG, BOLAY H, KELESTIMUR H, T D. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab** 1999; 19:511-516.
87. REITER RJ, SAINZ RM, LOPEZ-BURILLO S, MAYO JC, MANCHESTER LC, TAN DX. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 993:35-47.
88. MACLEOD MR, O'COLLINS T, HORMY LI. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of melatonin in experimental stroke. **J Pineal Res** 2005; 38:35-41.
89. BARLOW-WALDEN LR, REITER RJ, ABE M, PABLOS M, MENENDEZ-PELAEZ A. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem Int** 1995; 26:497-502.
90. EL-ABHAR HS, SHAALAN M, BARAKAT M, EL-DENSHARY ES. Effect of melatonin and nifedipine on some antioxidant enzymes and different energy fuels in the blood and brain of global ischemic rats. **J Pineal Res** 2002; 33:87-94.
91. RODRIGUEZ C, MAYO JC, SAINZ RM, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **J Pineal Res** 2004; 36:1-9.

92. MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G, REITER RJ, AGAPITO MT. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. **J Pineal Res** 2000; 28:242-248.
93. JOU MJ, PENG TI, REITER RJ, JOU SB, WU HY, ST W. Visualization of the effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. **J Pineal Res** 2004; 37:55-70.
94. LEON J, ACUNA- CASTROVIEJO D, ESCAMES G, TAN DX, RJ R. Melatonin mitigates mitochondrial malfunctions. **J Pineal Res** 2005;38:1-9.
95. ALLEGRA M, REITER RJ, TAN DX, GENTILE C, TESORIERE L, LIVREA MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **J Pineal Res** 2003; 34:1-10.
96. TAN DX, MANCHESTER LC, TERRON MP, FLORES LJ, REITER RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **J Pineal Res** 2007; 42:28-42.
97. REITER RJ. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **News Physiol Sci** 2000; 15:246-250.
98. PÖEGGELER B, THUEURMANN S, DOSE A, SHOENKE M, BURKHARDT S, R H. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogues. **J Pineal Res** 2002; 33:20-30.
99. ACUNA-CASTROVIEJO D, MARTIN M, MACIAS M, ESCAMES G, LEON J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **J Pineal Res** 2001; 30:65-74.
100. BENITEZ-KING G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. **J Pineal Res** 2006; 40:1-9.
101. BENITEZ-KING G, ORTIZ -LOPEZ L, JIMENEZ-RUBIO G. Melatonin precludes cytoskeletal collapse caused by hydrogen peroxide: participation of protein kinase C. **Therapy** 2005; 2:767-778.

102. PEI Z, CHEUNG RTF. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **J Pineal Res** 2004; 37:85-92.
103. CUZZOCREA S, REITER RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol** 2001; 426:1-10.
104. PEI Z, HO HT. Pre-treatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model in the rat. **Neurosci Lett** 2002; 318:1-4.
105. PEI Z, PANG SF. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **J Pineal Res** 2002; 32:168-172.
106. SINHA K, DEGAONKAR MN, JAGANNATHAN NR, YK G. Effect of melatonin on ischemia reperfusion injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. **Eur J Pharmacol** 2002; 428:185-192.
107. KONDOH T, UNEYAMA H, NISHINO H. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. **Life Sci** 2002; 72:583-590.
108. TORII K, UNEYAMA H, NISHINO H. Melatonin supresses cerebral edema caused by middle cerebral artery occlusion/reperfusion in rats assessed by magnetic resonance imaging. **J Pineal Res** 2004; 36:18-24.
109. CHO S, JOH TH, BAIK JJ, DIBINIS C. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. **Brain Res** 1997; 755:335-338.
110. KILIC E, KILIC U, YULUG B. Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspase-3 and is suitable as an add on treatment to tissue plasminogen activator. **J Pineal Res** 2004; 36:171-176.

111. LI XJ, ZHANG IM, GU J. Melatonin decreases production of hydroxyl radical during ischemia reperfusion. **Acta Pharmacol Sinica** 1997; 18:394-396.
112. PEI Z FP. Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood-brain breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **J Pineal Res** 2003; 34:110-118.
113. LING X, ZHANG IM, LU SD. Protective effect of melatonin on injured cerebral neurons is associated with bcl-2 over expression. **Acta Pharmacol Sinica** 1999; 20:409-414.
114. STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUND TABLE. Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. **Stroke** 1999; 30:2752-2758.
115. STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUND TABLE II. Recommendations for clinical acute stroke therapies. **Stroke** 2001; 32:1598 -1606.
116. GREEN AR, CROOSS AJ,. Techniques for examining neuroprotective drugs in vivo. En: Neuroprotective agents and cerebral ischemia. Green AR CA, (editor). New York Academic Press 1997. pp. 47-68.
117. KOVALENKO T, OSADCHENKO I, NOKOLENKO A. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. **Hippocampus** 2006; 16:814-825.
118. ARVIDSSON A, KOKAIA Z, AIRAKSINEN M, SAARMA M, LINDVALL O. Stroke induces widespread changes of gene expression of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. **Neuroscience** 2001; 106:27-41.
119. SCHMIDT-KASTNER R, TRUETTNER J, LIN B, ZHAO W, SAUL J. Transient changes in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in the rat. **Mol Brain Res** 2001; 92:157-166.

120. JOURAIN P, NIKONELKO I, ALBERTI S, MULLER D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-ischemia. **J Neurosci** 2002; 22:3108-3116.
121. CREPEL V, EPSTEIN J, BEN-ARI Y. Ischemia induces short- and long-term remodeling of synaptic activity in the hippocampus. **J Cel Mol Med** 2003; 7:401-407.
122. BRIONES TE, SUH E, JOZSA L, ROGOZINSKA M, WOODS J, WADOWSKA M. Changes in the number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. **Brain Res** 2005; 1033:51-57.
123. NEIGH GN, GLASPER ER, KOFLER J, TRAYSTMAN RJ, MERVIS RF. Cardiac arrest with cardiopulmonary resuscitation reduces dendritic spine density in CA1 pyramidal cells and selectively alters acquisition of spatial memory. **Eur J Neurosci** 2004:1865-1872.
124. RUAN YW, SOU B, FAN Y, LI Y, LIN N. Dendritic plasticity of CA1 neurons after transient global ischemia. **Neuroscience** 2006; 140:191-201.
125. BENDEL O, BUETERS T, EULER M, OGREN SO, SANDIN J, EULER G. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. **J Cereb Blood Flow Metab** 2005; 25:1586-1595.
126. BLOCK F. Global ischemia and behavioral deficits. **Progr Neurobiol** 1999; 58:279-295.
127. OLSEN G, SCHEEL - KRUGER J, MOLLER A. Relation of spatial learning of rats in the Morris water maze task to the number of viable CA1 neurons following four-vessel occlusion. **Neuroscience** 1994; 4:681-690.
128. ZOLA-MORGAN S, SQUIRE LR, AMARAL DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **J Neurosci** 1986; 6:2950-2967.
129. LIM C, ALEXANDER MP, LAFLECHE G. The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest. **Neurology** 2004; 63:1774 -1778.

130. DAVIS HP, TRIBUNA J, PULSINELLI WA, VOLPE BT. Reference and working memory of rats following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. **Physiol Behav** 1986; 37:387-392.
131. GALANI R, OBIS S, COUTUREAU E, JARRARD L. A comparison of the effects of fimbria-fornix, hippocampal, or entorhinal cortex lesions on spatial reference and working memory in rats: short versus long postsurgical recovery period. **Neurobiol Learn Mem** 2002; 77:1-16.
132. HARTMAN RE, LEE JM, ZIPFEL GJ, WOZNIA DF. Characterizing learning deficits and hippocampal neuron loss following transient global cerebral ischemia in rats. **Brain Res** 2005; 1043:48-56.
133. KESSELS R, HAAN E, JAAP L, POSTMA A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Res Rev** 2001; 35:295-303.
134. POU CET B, BENHAMOU S. The neuropsychology of spatial cognition in the rat. **Critical Rev Neurobiol** 1997; 11:101-120.
135. MCDONALD RJ, WHITE NM. A triple dissociation of memory systems: hippocampus. **Behav Neurosci** 1993; 107:3-22.
136. McNAMARA R, SKETTON RW. The neuropharmacological and neurochemical bases of place learning in the Morris water maze. **Brain Res Rev** 1993; 18:33-49.
137. SILVA AJ, GIESE KP, FEDOROV NB. Molecular, cellular and neuroanatomical substrates of place learning. **Neurobiol Learn Mem** 1998; 70:44-61.
138. VERWER R. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. **Hippocampus** 1997; 7:397-402.
139. OLVERA ME. El papel de la corteza prefrontal en la orientacion espacial. En: Aproximaciones al estudio de la corteza prefrontal. Guevara MA HM, (editor). Guadalajara, Jal 2004. pp. 179 - 196.

140. MYHRER T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat : a meta- analysis based on studies of four behavioral tasks. **Brain Res Rev** 2003; 41:268-287.
141. WOODSIDE B, BORRONI A, HAMMONDS M, TEYLER T. NMDA receptors and voltage -dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. **Neurobiol Learn Mem** 2004; 81:105-114.
142. FLORESCO SB, SEAMANS JK, PHILLIPS AG. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial arm maze task with or without delay. **J Neurosci** 1997; 17:1880 - 1890.
143. LAROCHE S, DAVIS S, JAY TM. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. **Hippocampus** 2000; 10:438-446.
144. PULSINELLI WA, BRIERLEY JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. **Stroke** 1979; 10:267-272.
145. PULSINELLI WA, BUCHAN AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. **Stroke** 1988; 19:913-914.
146. MORRIS RGM. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods** 1984; 11:47-60.
147. OLTON DS. The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. **Physiol Behav** 1987; 40:793-797.
148. LUNA G. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces. Mc Graw Hill New York 1960.
149. PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain in Sterotaxic Coordinates. . Academic Press San Diego,Cal, 1986.
150. SIEGEL S. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. MacGraw-Hill: New York, 1956.

151. DOWNIE MM, HEATH RW. Basic Statistical Methods. Harper E Row New York, 1983.
152. PALMER GE, CREGAN EF, BORRELLI AR, WILLETT F. Neuroprotective properties of the uncompetitive NMDA receptor antagonist ramacemide hydrochloride. **Ann NY Acad Sci** 1995; 765:236-247.
153. CHEUNG RTF. Preclinical evaluation of pharmacokinetics and safety of melatonin in propylene glycol for intravenous administration. **J Pineal Res** 2006; 41:337-343.
154. CHAN PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **J Cereb Blood Flow Metab** 2001; 21:2-14.
155. MELCHIORRI D, REITER RJ, SEWERYNEK E, CHEN LD, G N. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. **FASEB J** 1995; 9:1205 -1210
156. MELCHIORRI D, REITER RJ, CHEN LD, SEWERYNEK E, G N. Melatonin affords protection against kainate-induced in vitro lipid peroxidation in brain. **Eur J Pharmacol** 1996; 305:239-242.
157. OLVERA-CORTES E, CERVANTES M, Gonzalez-Burgos I. Place-learning but no cue learning modifies the hippocampal theta rhythm in rats. **Brain Res Bull** 2002; 58:261-270.
158. KESNER RP, ROGERS J. An analysis of independence and interactions of brain substrates that subserve multiple attributes, memory systems, and underlying processes. **Neurobiol Learn Mem** 2004; 82:199-215.
159. LEE I, KESNER RP. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. **J Neurosci** 2003; 23:1517-1523.