



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA
MELATONINA EN UN MODELO DE MUERTE
NEURONAL INDUCIDA POR HIPOGLUCEMIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

PRESENTA:

FRANCISCO ISAAC PÉREZ CARMONA

DIRECTOR:

DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZÁLEZ

MEXICO D.F., MAYO 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



**El presente trabajo de Tesis
fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología de la
División de Investigaciones en Neurociencias del
Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente”**

MUCHAS GRACIAS

TESIS APOYADA POR EL CONACyT (PROYECTO: 49439M/24472)



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis está especialmente dedicada a mis padres:

Lourdes Carmona Luna

Y

Luis Pérez Luna

Gracias por la vida y el amor incondicional que siempre me han dado.

A Israel, a Perla y a mi familia por guiarme en todo momento.

A todos mis amigos y a todas las personas especiales del laboratorio, gracias por sus consejos y su apoyo.

Y a mi asesor, Dr. Eduardo Calixto, por ayudarme a realizar este trabajo.

I ÍNDICE

I	Índice	3
	Resumen	
	Lista de Abreviaturas	6
II	Introducción	7
1.	Muerte Celular	
	1.1 Apoptosis y necrosis	8
	1.2 Estrés oxidativo	11
	1.3 Inflamación	14
	1.4 Excitotoxicidad	16
2.	Glucosa e Hipoglucemia	
	2.1 Glucosa	18
	2.2 Insulina	19
	2.3 Hipoglucemia	21
	2.4 Muerte neuronal por hipoglucemia	22
3.	Melatonina	
	3.1 Síntesis y metabolismo	23
	3.2 Eliminación de melatonina	25
	3.3 Fisiología del sistema melatoninérgico	26
	3.4 Receptores membranales de melatonina	28
	3.4.1 Receptor MT ₁	29
	3.4.2 Receptor MT ₂	30
	3.4.3 Receptores MT ₃ y Mel _{1c}	31
	3.5 Luzindol	31
	3.6 Efectos de la melatonina	31
III	Justificación	34
IV	Objetivo	35
V	Hipótesis	36
VI	Material y Métodos	37
	VI.1 Experimentos <i>in vivo</i>	
	VI. 1.1 Cirugía Estereotáxica	39

	VI. 1.2 Registro de la actividad EEG de la corteza frontal y somatosensorial	40
	VI. 1.3 Glucometrías	42
	VI.2 Histología	42
VII	Resultados	
	VII.1 Efecto de la aplicación de la melatonina en una condición de hipoglucemia severa sobre el EEG de la corteza frontal.	47
	VII.2 Efecto de la exposición continua a luz sobre la síntesis de melatonina.	49
	VII.3 Efecto de la aplicación de la melatonina en una condición de hipoglucemia severa: efecto sobre el EEG independiente de la activación de sus receptores membranales.	52
	VII.4 Los efectos sobre el EEG de la corteza frontal y de la parietal ante la administración de melatonina y durante la hipoglucemia severa.	54
	VII.5 La melatonina modifica la reducción de los niveles de la glucosa sanguínea durante la hipoglucemia severa.	55
	VII.6 Neuroprotección en el área CA3 del hipocampo.	58
	VII.7 Neuroprotección en el área CA1 del hipocampo.	60
	VII.8 Neuroprotección en la corteza somatomotora inducida por melatonina.	62
VIII	Discusión	
	VIII.1 Neuroprotección y melatonina	65
	VIII.2 Captura de radicales libres	67
	VIII.3 Glucosa y melatonina	69
	VIII.4 Citoarquitectura y melatonina	70
IX	Conclusiones	72
IX	Referencias	73

Resumen

Un evento hipoglucémico puede causar irritabilidad y alteraciones neuronales que pueden conducir hasta el coma asociado a muerte neuronal. Los pacientes que sobreviven a un coma hipoglucémico cursan con algún deterioro cognitivo y motor que impactará su calidad de vida. Agentes farmacológicos, como bloqueadores de canales de calcio y fitofármacos, han sido probados clínicamente en el campo de la neuroprotección, aunque ninguno ha demostrado ser eficaz a pesar del éxito visto en anteriores estudios en animales.

El objetivo principal de ésta tesis fue realizar un estudio electrofisiológico y anatómico para identificar el efecto neuroprotector de la melatonina en un modelo *in vivo* de hipoglucemia severa inducida por insulina, así como evaluar si el efecto de neuroprotección es dependiente de los receptores de membrana para melatonina o captura de radicales libres.

Para ello se emplearon 3 técnicas distintas pero complementarias: 1) el registro de la actividad electroencefalográfica (EEG); 2) el análisis histológico con el uso de la tinción de Nissl; y, 3) la medición de los cambios de la glucosa plasmática bajo condición control, de hipoglucemia y durante la administración de las drogas. Se llevó a cabo con 45 ratas macho de la cepa Wistar (200-300g).

Los resultados de esta tesis muestran que la melatonina es capaz de generar un efecto neuroprotector contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia severa. A nivel EEG, este efecto se identifica al bloquear la disminución de la actividad eléctrica de la corteza cerebral durante un evento hipoglucémico. El efecto neuroprotector de la melatonina se puede cuantificar histológicamente en el hipocampo y en la corteza somatosensorial. Asimismo, la melatonina reduce el detrimento de la glicemia durante un evento de hipoglucemia severa y este efecto neuroprotector es independiente de la activación de los receptores membranales de melatonina.

Este proyecto aporta un mejor conocimiento de mecanismos eficaces de neuroprotección de la melatonina, para disminuir los efectos negativos de un evento hipoglucémico severo y su impacto negativo en los pacientes.

Lista de Abreviaturas

AA-NAT	arilalquilamina N-acetiltransferasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
AIF	factor inductor de apoptosis
AMK	N1-acetil-5-metoxiquinuramina
AMP _c	adenosín monofosfato cíclico
APAF-1	factor activador de proteasas apoptóticas
ATP	adenosín trifosfato
BK _{Ca}	canales de potasio activados por calcio
Ca ²⁺	ión calcio
CaM	calmodulina
CAT	catalasa
EEG	electroencefalograma/electroencefalográfico
EO	estrés oxidativo
GMP _c	guanosín monofosfato cíclico
GPx	glutación peroxidasa
HIOMT	enzima hidroxindol-O-metiltransferasa
IL	interleucinas
K ⁺	ión potasio
MMPs	metaloproteinasas
Na ⁺	ión sodio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
NSQ	núcleo supraquiasmático del hipotálamo
PKB	proteincinasa B
PKC	enzima proteincinasa C
PTX	toxina pertusis
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
SOD	superóxido dismutasa
SNC	sistema nervioso central
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
Zn ²⁺	zinc

II Introducción

Los tratamientos que generan protección neuronal tienen como característica bloquear los procesos celulares, bioquímicos y metabólicos durante la muerte neuronal; son varios los agentes neuroprotectores que se han probado clínicamente aunque ninguno ha demostrado ser eficaz a pesar del éxito visto en diversos estudios hechos en animales (Arai y Lo, 2009; Lakhan et al., 2009).

Los radicales libres juegan un papel importante en la patogénesis de condiciones como la hipoglucemia. Diversas evidencias indican que el estrés oxidativo no ocurre de manera aislada en este proceso, sino que tiene interacción con el proceso de apoptosis, la excitotoxicidad y la inflamación (Pei et al., 2003).

Un evento hipoglucémico puede causar la aparición de signos y síntomas clínicos como irritabilidad, desconcentración, alucinaciones, convulsiones, hasta un estado de coma, que conducirá hacia lesiones cerebrales y muerte neuronal (Suh et al., 2007).

Los radicales libres son considerados como un importante objetivo terapéutico. Existen evidencias que apuntan a la melatonina como un potente capturador de radicales libres además de ser una molécula antioxidante eficaz para reducir el daño cerebral producido por el estrés oxidativo. Estudios previos indican, que la administración de melatonina *in vitro* es capaz de inducir un efecto neuroprotector eliminando especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), estimulando la actividad de enzimas antioxidantes e inhibiendo la de las enzimas oxidantes, así como disminuyendo los procesos de inflamación, de excitotoxicidad y de daño al ácido desoxirribonucleico (ADN) (Lin y Lee, 2009; Koh, 2008).

Esta tesis se enfoca como propuesta para un mejor conocimiento de mecanismos eficaces para disminuir los efectos negativos de un evento hipoglucémico severo. Con el fin de distinguir el efecto neuroprotector de la melatonina.

En la introducción de esta tesis se enmarcan los aspectos básicos de la muerte celular y de la hipoglucemia severa (evento capaz de generar muerte

neuronal asociado a la producción de ROS). Posteriormente, se hará énfasis en la melatonina, sus receptores, su fisiología y su importancia como agente antioxidante y neuroprotector. La justificación de la presente tesis que enmarca a los objetivos generales, se relaciona con la hipoglucemia severa, la muerte neuronal que esta puede inducir y con el efecto neuroprotector que la melatonina es capaz de producir. En material y métodos se describen las técnicas utilizadas y los análisis que fueron necesarios para la obtención de los resultados. La última parte de este volumen contiene la discusión de los resultados y las conclusiones que confirman que la administración de melatonina reduce los efectos de la hipoglucemia severa: inhibe el impacto negativo en el EEG y reduce el descenso de los niveles de glicemia, este efecto es posible caracterizarlo histológicamente en el hipocampo y la corteza cerebral parietal; finalmente, se corroboró que el efecto neuroprotector de la melatonina no depende de la actividad de sus receptores acoplados a segundos mensajeros; lo que nos permite sugerir que este efecto es a través de la captura de radicales libres.

Debido a que nuestra investigación se basa en el daño neuronal generado por una hipoglucemia severa, enfocamos en esta introducción los aspectos moleculares involucrados en el proceso.

1.- Muerte Celular

1.1 Apoptosis y Necrosis

A mediados del siglo XIX, varias observaciones indicaban que la muerte celular jugaba un rol considerable durante los procesos de organismos multicelulares. El término “muerte celular programada” fue introducido en 1964, proponiendo que la muerte celular durante el desarrollo no era accidental y seguía una secuencia de pasos controlados. La apoptosis, describe procesos morfológicos que dirigen a la controlada autodestrucción celular, fue introducida por primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972. La apoptosis celular es un proceso activo y definido, el cual tiene una importante función biológica en el desarrollo, en la diferenciación, en la proliferación, en la regulación y el

mantenimiento de poblaciones celulares en los tejidos. Defectos en este proceso están fuertemente relacionados con condiciones patológicas, su deficiencia puede resultar en cáncer, así como en extensión de infecciones, mientras que desórdenes neurodegenerativos y enfermedades isquémicas pueden ser causadas por el incremento de la apoptosis. Las células que experimentan un proceso apoptótico sufren cambios morfológicos progresivos como condensación de la cromatina, contracción de la membrana plasmática y finalmente se fragmentan en los llamados cuerpos apoptóticos que contienen al citosol, la cromatina y a los restos de algunos organelos. Estos cuerpos apoptóticos son degradados por la acción de los macrófagos y son removidos del tejido sin causar respuesta inflamatoria (Gewis, 2003).

La apoptosis es el mayor proceso por el cual las neuronas mueren en el sistema nervioso central (SNC; Reiter et al., 2005). La muerte celular por apoptosis sólo puede ser clasificada de esta manera si la ejecución de este proceso es dependiente de enzimas denominadas caspasas (Gewis, 2003).

La apoptosis está mediada por dos vías principales: la vía intrínseca (mitocondrial) y la vía extrínseca (dependiente de receptores inductores de muerte celular). La activación de la vía intrínseca es iniciada con un daño mitocondrial, que libera al citocromo C, el cual forma al factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) y activa a las caspasas iniciadoras. La vía extrínseca es iniciada por la activación de dominios asociados a ligandos como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o como Fas, lo que activa a la cascada de caspasas. Ambas vías conducen a la muerte neuronal (Fischer et al., 2008).

Las caspasas iniciadoras (2, 8, y 10) activan señalizaciones de muerte en respuesta a la unión de los ligandos con los receptores inductores de muerte (vía extrínseca de apoptosis) o en respuesta a señales que se originan desde el interior de la célula (vía intrínseca de apoptosis) activando posteriormente a proteínas pro-apoptóticas (Bid, apoptosoma, smacDIABLO, etc.) y a las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7) que mediarán la señalización y la ejecución de muerte celular apoptótica (Gewis, 2003).

Durante la apoptosis, la mitocondria sufre daños en su estructura lo que resulta en la pérdida de su función. Las ROS como un segundo mensajero pro-apoptótico inducen la apertura del poro de transición de permeabilidad localizado en la membrana interna de la mitocondria y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Yi et al., 2006). La apertura del poro de transición de permeabilidad libera factores pro-apoptóticos como el citocromo C y el factor inductor de apoptosis (AIF) hacia el citosol. Estos agentes activan señalizaciones nucleares a través de la activación de caspasas, disminuyendo la producción de adenosín trifosfato (ATP), lo cual genera muerte celular (Wang et al., 2009; Reiter et al., 2000).

Los cambios en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y la anti-apoptótica Bcl2 controlan la vía apoptótica mitocondrial. Un incremento en Bax abre el poro de transición mitocondrial seguido de la liberación del citocromo C y la activación de caspasas, lo que conducirá a la muerte celular (Figura 1; Das et al., 2008).

A diferencia del proceso apoptótico, durante la muerte celular por necrosis, las neuronas sufren un daño irreversible, el cual consiste en la pérdida de la integridad de la membrana, ésta se edematiza y se rompe, liberando incontroladamente el contenido citosólico hacia el medio extracelular dañando a las neuronas aledañas y generando una fuerte respuesta inflamatoria que conducirá a más muerte neuronal (Gewis, 2003).

Figura 1

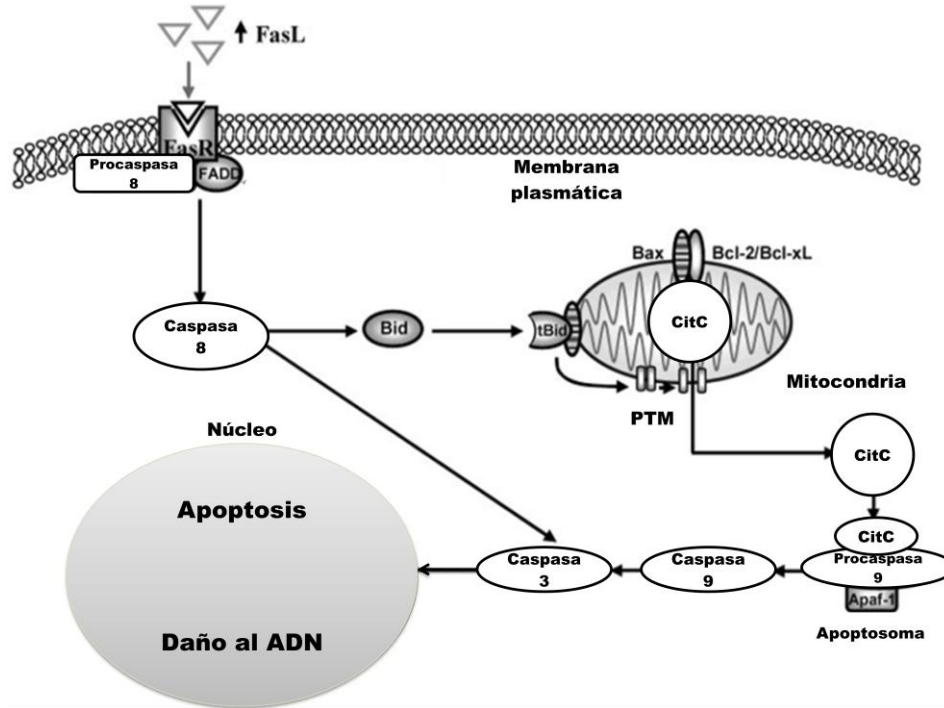


Diagrama del proceso de apoptosis. La apoptosis puede ser iniciada mediante la vía intrínseca la cual involucra la disfunción mitocondrial y la liberación del citocromo C que activa la cascada de caspasas. Alternativamente, receptores membranales de la célula (receptores de muerte) son activados por la unión de ligandos específicos y de la misma manera incrementan la activación de caspasas, a lo cual se denomina como vía extrínseca de la apoptosis. Ambas vías conducen a la apoptosis celular (Modificado de Broughton et al., 2009).

1.2 Estrés oxidativo

El oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones del organismo. Tiene un alto potencial reductor debido a que sirve como un aceptor de electrones en el proceso metabólico de generación de energía. Desafortunadamente, puede dañar a las células si no está completamente reducido, su reducción parcial es una consecuencia que ocurre durante el metabolismo aeróbico y genera efectos tóxicos mediante la producción de moléculas pro-oxidantes que reaccionan con las biomoléculas generando cambios estructurales y daño celular (Wang y Michaelis, 2010).

El estrés oxidativo (EO) daña a las neuronas y a las células gliales, contribuye a la patogénesis del envejecimiento y de numerosas condiciones neurológicas (Reiter et al., 2000). Este proceso es definido como la condición que

ocurre cuando el balance fisiológico entre oxidantes y antioxidantes queda interrumpido ya sea por un déficit de las defensas o por un incremento en la producción de los primeros, generando peligro potencial para el organismo, alteraciones en la estructura-función de cualquier órgano y daño a las macromoléculas causando muerte celular por necrosis o apoptosis (Wang y Michaelis, 2010; Kaur y Ling, 2008; Venereo, 2002). El EO involucra la formación de ROS y RNS, a través de mecanismos como la inhibición de la función mitocondrial, el exceso de calcio intracelular (Ca^{2+}) y formación de inflamación (Lakhan et al., 2009).

El cerebro es particularmente susceptible al daño que genera el EO por las siguientes razones: 1) el consumo de O_2 es más grande que en otros tejidos, el cerebro representa el 2% del peso total corporal, sin embargo, consume el 20% del total del O_2 , lo que lo hace propenso a generar y a ser dañado por ROS; 2) sus células poseen altos niveles de ácidos grasos polinsaturados, los cuales pueden ser fácilmente oxidados; 3) sus altos niveles de hierro más peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton, generan al radical hidroxilo el cual es tóxico; 4) el SNC tiene un sistema de defensa antioxidante relativamente ineficiente; y 5) más el hecho de que las neuronas son células que tienen reposición reducida durante la vida, lo anterior hace al cerebro altamente susceptible al daño neuronal por ROS (Wang y Michaelis, 2010; Kaur y Ling, 2008; Reiter et al., 2005).

Los radicales libres pueden interrumpir el balance redox dentro de las células sino se eliminan adecuadamente (Wang y Michaelis, 2010). Tienen acciones benéficas y perjudiciales, niveles moderados activan canales iónicos, aumentan la transmisión sináptica, promueven la proliferación y la sobrevivencia neuronal, mientras que una alta producción induce la ruptura de la barrera hematoencefálica y muerte celular (Kaur y Ling, 2008).

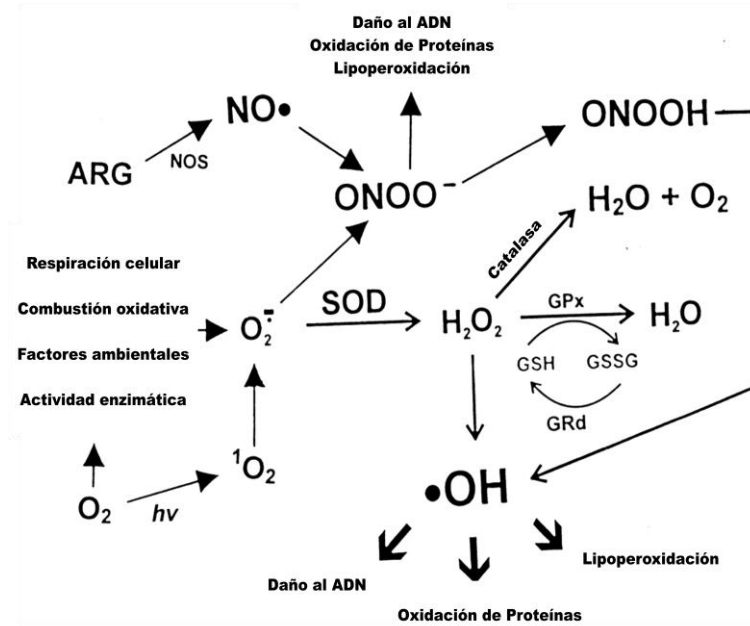
Desde el punto de vista molecular, los radicales libres son pequeñas moléculas difusibles que pueden producirse en la cadena respiratoria mitocondrial, en la cadena de transporte de electrones, en las reacciones de oxidación y pueden producir daño oxidativo al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Pueden dañar a las neuronas abstrayendo o donando un electrón de

ellas (Reiter et al., 2004). Son especies químicas que en su estructura atómica presentan un electrón impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera inestabilidad y una alta reactividad. Tienen una vida media muy corta por lo que actúan cercano al sitio en que se forman. Las principales ROS son: el oxígeno molecular ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$; Venereo, 2002) y las principales RNS (que dependen de nitrógeno): el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), el anión peroxinitrito (ONOO^-) y el ácido peroxinitroso (ONOOH ; ver Figura 2; Wang y Michaelis, 2010; Kaur y Ling, 2008; Guerra, 2001).

La producción de ROS modifica a las macromoléculas y causa lesión neuronal (Wang y Michaelis, 2010; Hong et al., 2010): en los lípidos genera lipoperoxidación alterando la permeabilidad de la membrana produciendo edema y muerte celular; en las proteínas se oxidan los residuos de aminoácidos y en el ADN pueden ocurrir mutaciones, pérdida de expresión o de síntesis de una proteína por daño a un gen específico, deleciones o inducen reordenamientos cromosómicos (Venereo, 2002).

La mitocondria genera ATP, sin embargo, en este organelo se da la mayor producción de ROS producidas por el complejo I y III de la cadena respiratoria, si la respiración mitocondrial se ve bloqueada, la síntesis de ATP disminuye y se excede la producción de ROS (Pei et al., 2003). La mitocondria ha sido implicada como una fuente de ROS en varias patologías, en especial durante un evento de hipoglucemia severa: la generación de ROS se incrementa (Suh et al., 2007). La alta demanda de energía y los bajos niveles de ATP pueden conducir a las neuronas hacia una crisis energética que puede afectar seriamente su funcionalidad y morfología, así como aumentar el proceso de EO (Wang y Michaelis, 2010). El EO altera la función celular, genera excitotoxicidad, daño tisular, así como la estimulación de reacciones inflamatorias (Hong et al., 2010).

Figura 2



Representación del metabolismo de los radicales libres. La reducción parcial del O₂ genera una variedad de especies reactivas y radicales libres incluyendo al O₂⁻, H₂O₂ y OH•. La adición de energía (*hν*) al O₂ genera al tóxico oxígeno molecular (¹O₂), el cual al dismutarse por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se convierte en H₂O₂ el cual es catalíticamente removido por las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). La GPx usa como sustrato al H₂O₂ para reducir al glutatión (GSh) en su forma disulfuro (GSSG), el cual es metabolizado de nuevo a GSh por la glutatión reductasa (GRd). Además de estas sustancias tóxicas basadas en el oxígeno, intracelularmente también pueden generarse especies tóxicas basadas en el nitrógeno. Aunque el NO, es catalíticamente formado a partir de la arginina (ARG) por la óxido nítrico sintasa (NOS) y tiene efectos benéficos, puede llegar a ser tóxico y puede producir al altamente reactivo ONOO•, el cual puede convertirse a ONOOH y finalmente este puede convertirse a OH• (Modificado de Reiter et al., 2000).

1.3 Inflamación

El proceso de inflamación es el mecanismo mediante el cual los tejidos responden a las lesiones. Es caracterizado por la acumulación de líquido, influjo de proteínas, diapédesis de neutrófilos, linfocitos T y macrófagos, así como producción de sustancias químicas (Hong et al., 2010).

Dos conceptos han dominado el campo de la inflamación: 1) que el SNC es inmunológicamente privilegiado por la relativa impermeabilidad de la barrera hematoencefálica y 2) que la inflamación está asociada o exacerbada a la neurodegeneración. La integridad de la barrera hematoencefálica está controlada por la presencia de la matriz extracelular y los astrocitos. Los leucocitos no pueden acceder al SNC aunque pocos de ellos logran entrar a través del líquido cefalorraquídeo y el espacio subaracnoideo. La barrera hematoencefálica puede

alterarse por el incremento en los niveles de moléculas de adhesión y degradación generados por las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y por el aumento en la producción de citocinas (Vexler y Yenari, 2009).

Las células gliales juegan un papel importante manteniendo la homeostasis del SNC, proveen soporte neuronal, ayudan en la comunicación sináptica, establecen gradientes iónicos, modulan la respuesta inmune en el cerebro, su funcionamiento es esencial para las neuronas, pero su disfunción puede incrementar la vulnerabilidad neuronal a condiciones citotóxicas (Wang y Michaelis, 2010). Estudios *in vitro*, han dado evidencias de que la glía es capaz de reducir el EO al estimular la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD, la CAT y GPx (Kaur y Ling, 2008; ver Figuras 2 y 3).

En el cerebro, la microglía juega un papel inmunológico y fagocítico esencial en el SNC, puede liberar sustancias con efectos citotóxicos o neurotróficos. La activación de la microglía en respuesta a patologías del SNC puede liberar citocinas pro-inflamatorias como el TNF- α e interleucinas (IL-1 β y IL-6) en un esfuerzo para mantener la integridad y reparar las neuronas dañadas (Wang y Michaelis, 2010; Kaur y Ling, 2008). La activación de la microglía puede liberar O₂⁻, NO, glutamato, factores de activación de proteasas y citocinas, que conducen hacia el daño y muerte neuronal (Shin et al., 2009). Este efecto al activarse repetidamente puede incrementar la producción de ROS y otros mediadores neurotóxicos, los cuales provocan un incremento en el EO, daño a células endoteliales, a células gliales, a neuronas y lo que contribuye a la activación de caspasas que conducirán al daño neuronal. El EO y la inflamación son dos procesos que están estrechamente unidos en la génesis de la muerte neuronal. Establecen una retroalimentación una vez activadas, las células inflamatorias generan ROS y estas especies reactivas activan la respuesta inflamatoria (Wang y Michaelis, 2010; Vexler y Yenari, 2009). El incremento de los radicales libres de oxígeno puede activar la expresión de varios genes pro-inflamatorios induciendo la síntesis de transcripción de proteínas como el factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) y el factor 1 inducible de hipoxia (Lakhan et al., 2009).

Figura 3

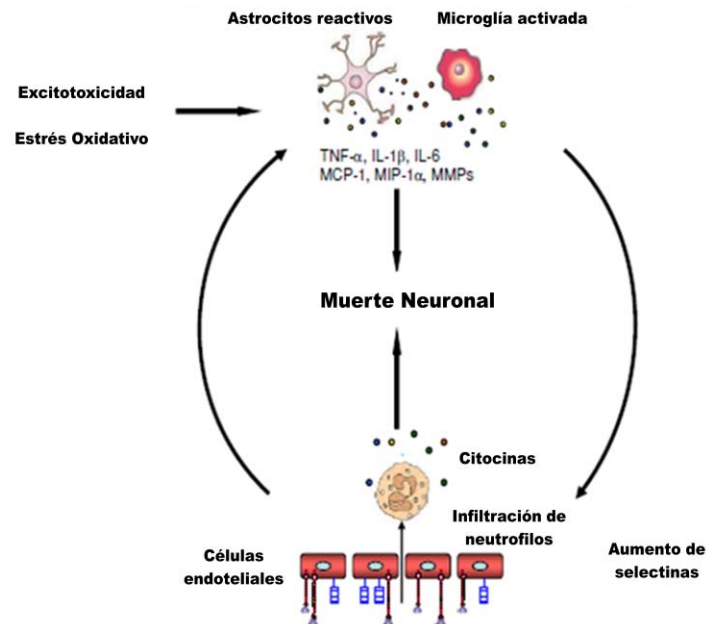


Diagrama del proceso de inflamación. El EO y la excitotoxicidad activan a la microglía y a los astrocitos los cuales reaccionan secretando citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α), quimosinas (MCP-1 α) y MMP's. Estos mediadores inflamatorios conducen a una elevación de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales permitiendo el paso de células inflamatorias, principalmente neutrófilos al SNC. Los neutrófilos también secretan citocinas las cuales causan una mayor activación de glías. Este proceso incrementa el daño tisular (Modificado de Lakhan et al., 2009).

1.4 Excitotoxicidad

La muerte celular por excitotoxicidad es un denominador común en patologías del SNC, el incremento de glutamato en el espacio sináptico induce y exagera la muerte celular al activar excesivamente a sus receptores (Kaur y Ling, 2008).

En el caso de la disminución de O₂, glucosa o ambos, disminuye el ATP, lo que causa despolarización de las neuronas, la liberación de potasio (K⁺) al espacio extracelular y la entrada de sodio (Na⁺) al medio intracelular. La concentración de Ca²⁺ intracelular, durante un evento excitotóxico aumenta activando diversas enzimas como proteasas, lipasas y endonucleasas las cuales generan daño celular. La despolarización membranal permite la liberación de glutamato cuya concentración fisiológica en el citosol es aproximadamente de 10mM. El incremento de la concentración en el espacio sináptico activa a los receptores NMDA y AMPA, la apertura de estos receptores conduce a una mayor

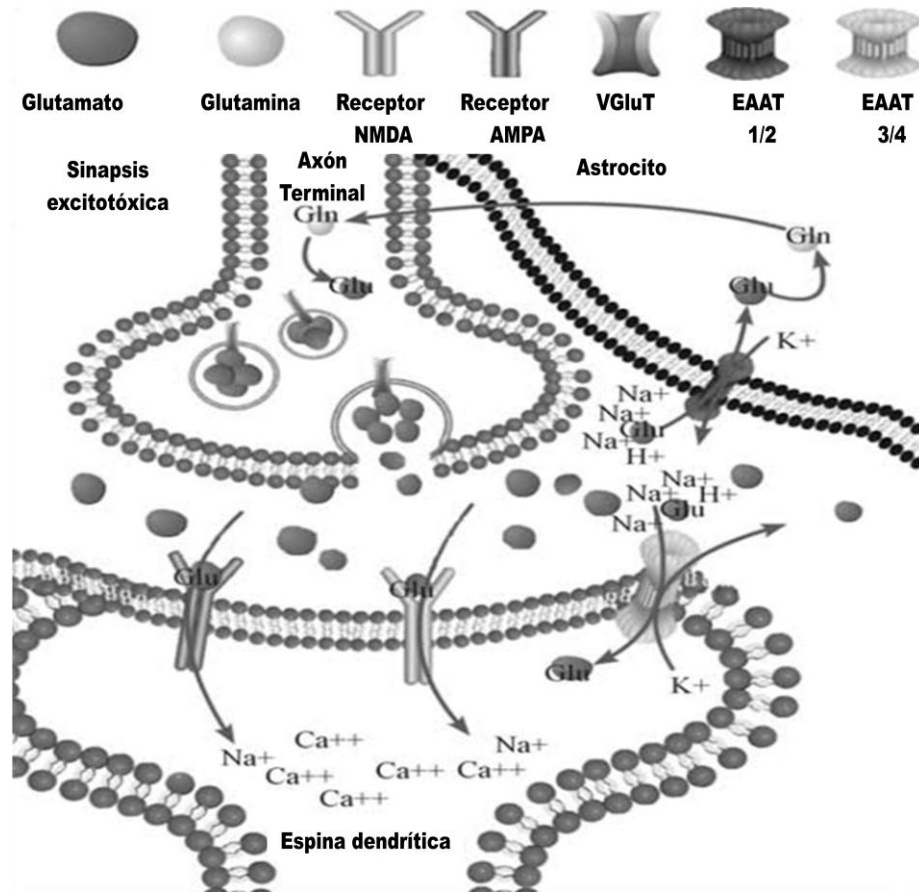
despolarización y al aumento de la concentración intracelular del Ca^{2+} generando daño por excitotoxicidad (Doyle et al., 2008), el cual impacta negativamente en las neuronas y puede incrementar la generación de ROS (Reiter et al., 2005).

El Ca^{2+} tiene un importante papel fisiológico, ya que regula y mantiene la función neuronal incluyendo la liberación de neurotransmisores, la excitabilidad neuronal, la plasticidad sináptica, la transcripción de genes y la sobrevivencia neuronal. Durante el EO, las ROS activan los canales de Ca^{2+} e inhiben las bombas de Ca^{2+} por lo que elevan la concentración intracelular de este ión. Una importante vía de acumulación de Ca^{2+} es a través de la activación de sinapsis glutamatérgicas, las cuales permiten la entrada de Ca^{2+} por medio de sus receptores ionotrópicos (Figura 4). La elevación anormal de la concentración intracelular de Ca^{2+} producida por la disminución del transporte citosólico de Ca^{2+} al medio extracelular o por el aumento del influjo de Ca^{2+} a través de sus canales sensibles a voltaje, representa un estímulo para la disfunción y muerte neuronal. Su elevación intracelular conduce a más liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, a la activación de vías apoptóticas a través de cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, a la activación de dehidrogenasas y al incremento de EO (Wang y Michaelis, 2010).

La muerte celular inducida por excitotoxicidad ha sido involucrada en lesiones agudas del SNC y en desórdenes crónicos neurodegenerativos. La neurona, así como la glía, pueden ser dañadas por excitotoxicidad. En el SNC, el ATP extracelular puede actuar como un neurotransmisor excitatorio activando su receptor ionotrópico P_2X y su receptor metabotrópico P_2Y , los cuales son expresados en los oligodendrocitos y pueden incrementar significativamente la concentración de Ca^{2+} intracelular en células gliales (Arai y Lo, 2009).

En la hipoglucemia se incrementa la concentración de glutamato extracelular generando un proceso de excitotoxicidad y en consecuencia aumenta la producción de O_2^- y OH^- , lo que contribuye a la muerte neuronal (Shin et al., 2009; Suh et al., 2007).

Figura 4



La excitotoxicidad puede ser inducida por la elevación de la concentración del glutamato en el espacio sináptico. Este proceso puede ser causado por el incremento en la liberación de glutamato o por la disminución de su recaptura (EAAT). La excesiva estimulación de los receptores glutamatérgicos, eleva la concentración intracelular de Ca^{2+} , resultando en muerte neuronal. La pérdida neuronal resultante de este proceso puede causar incremento extracelular de glutamato y amplificar el daño excitotóxico (Modificado de Foran y Trotti 2009).

2. Glucosa e Hipoglucemia

2.1 Glucosa

Los productos finales de la digestión de los carbohidratos en el tubo digestivo son la glucosa, la fructosa y la galactosa. Antes de que las células de los tejidos corporales puedan utilizar la glucosa, esta debe transportarse a través de la membrana celular hasta el citoplasma, sin embargo, no puede difundir libremente a través de la membrana, este proceso de su ingreso a la célula es a través de un transporte facilitado. En las membranas de las células intestinales y de los túbulos renales, la glucosa es transportada a través de un co-transporte activo de sodio-

glucosa. En todas las otras membranas celulares, la glucosa se transporta a favor de gradiente por proteínas acarreadoras especializadas. La insulina, hormona producida y liberada por el páncreas permite el transporte de la glucosa al interior de la célula, con excepción de los hepatocitos y las neuronas. Por lo tanto, el índice de utilización de carbohidratos en la mayor parte de las células está controlado por la secreción de insulina. Tras su absorción en las células, la glucosa se puede utilizar de inmediato para liberar energía o bien, almacenarse en forma de glucógeno, especialmente en grandes cantidades en los hepatocitos y en las células musculares (se induce la glucogénesis, se inhibe la glucólisis y gluconeogénesis). Así como la inducción de la lipogénesis en los adipositos (Guyton y Hall, 2000).

Los medios más importantes por los que se libera energía de la molécula de glucosa los inicia la glucólisis, en condiciones de ausencia de oxígeno, este proceso forma un total de 4 moles de ATP por cada mol de glucosa, sin embargo, se necesitan previamente 2 mol de ATP para fosforilar la glucosa original para poder formar fructosa 1,6-bifosfato. Por tanto, la ganancia neta de moléculas de ATP en el proceso glucolítico completo en presencia de oxígeno es solo de 2 moles por cada mol de glucosa utilizado. En presencia de oxígeno, la glucosa sigue oxidándose, proceso por el cual se obtienen 38 moléculas de ATP.

2.2 Insulina

La insulina fue aislada por primera vez del páncreas en 1922. Esta hormona, ejerce efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos. Es una proteína pequeña con peso molecular de 5808 Da. Está compuesta de dos cadenas de aminoácidos conectadas entre sí por puentes disulfuro, cuando se separan las dos cadenas de aminoácidos, se pierde la actividad funcional de la molécula. Es una proteína la cual se sintetiza en las células β del páncreas. Primero, es formada como preproinsulina, eventualmente se escinde en el retículo endoplásmico de la célula pancreática para formar proinsulina y la mayor parte de esta es metabolizada en el aparato de Golgi para formar insulina, antes de ser empaquetada en los gránulos secretores. Sin embargo, aproximadamente la sexta

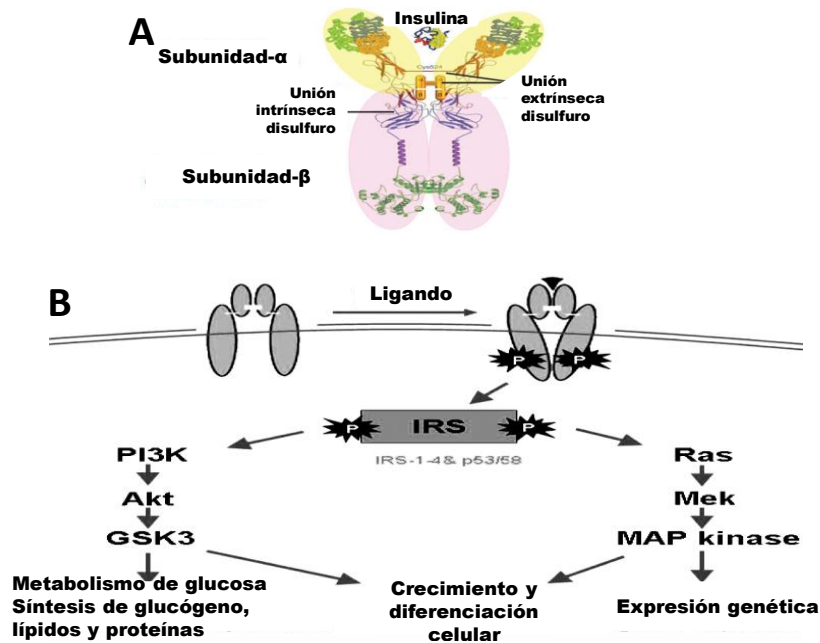
parte del producto final queda en forma de proinsulina la cual carece de actividad. La estimulación de estas células β causa la secreción de insulina por exocitosis, que difundirá dentro de la sangre. Esta hormona tiene una vida plasmática de solo 6 minutos, de forma que en su mayor parte se elimina de la circulación en 10 a 15 minutos. Excepto la porción de insulina que se combina con los receptores de las células diana, el resto se degrada por la enzima insulinasa, principalmente en el hígado, en menor medida en los riñones, en los músculos y muy poco en la mayoría de los tejidos restantes.

La insulina se une a una proteína de membrana de gran afinidad por la hormona que va a permitir un ingreso facilitado a la glucosa a la célula (Figura 5). Este receptor de insulina es una combinación de cuatro subunidades que se mantienen unidas por enlaces disulfuro, dos subunidades α situadas completamente en la parte externa de la membrana y dos subunidades β que atraviesan la membrana haciendo relieve hacia el citoplasma celular. La insulina se une a las subunidades α , pero debido a los enlaces con las subunidades β , las porciones de las subunidades β se autofosforilan. Esto las convierte en una enzima activa, una proteincinasa local, que a su vez causa la fosforilación de otras enzimas intracelulares.

En segundos, aproximadamente el 80% de las células del cuerpo se vuelven muy permeables a la glucosa. En el interior de las células, la glucosa se fosforila inmediatamente y se convierte en un sustrato para todas las funciones metabólicas habituales de los carbohidratos.

La glucosa en la sangre provoca una rápida secreción de insulina y esta a su vez causa una rápida captación, almacenamiento y utilización de la glucosa por casi todos los tejidos del cuerpo, pero especialmente por los músculos, el tejido adiposo y el hígado.

Figura 5



Estructura del receptor de insulina y su vía de señalización. A) El receptor de insulina, compuesto de las subunidades α (amarillo) y de las subunidades β (rosa) unidas por puentes disulfuro. (B) La vía de señalización de la insulina inicia cuando el ligando se une y activa la autofosforilación de la tirosina en las subunidades β , las cuales estimulan las dos mayores vías de señalización, la vía fosfoinositol-3cinasa (PI3K)/Akt y la vía de las MAPK, a través de substratos del receptor de insulina lo cual resulta en diversos procesos celulares (modificado de Chiu y Cline, 2010).

2.3 Hipoglucemia

El nivel de la concentración de glucosa sanguínea en ayunas es normalmente de 80 a 90 mg/dl, se considera que 100 mg/dl representa el límite superior de la normalidad (Guyton y Hall, 2000). Cuando la concentración de glucemia desciende a valores de 70 a 50 mg/dl se considera como un evento hipoglucémico moderado, el SNC habitualmente se vuelve más excitable. Se pueden producir alucinaciones, nerviosismo y temblor. Cuando la glucemia desciende entre 50-20 mg/dl, es probable que se produzcan convulsiones y pérdida de la consciencia. Niveles inferiores a 20 mg/dl inducirán un coma hipoglucémico acompañado de muerte neuronal. En resumen, dependiendo de su severidad y de su duración, la hipoglucemia puede causar desde irritabilidad, dolor de cabeza, fatiga, hasta déficits neurológicos, convulsiones, coma y muerte (Del Campo et al., 2009; Suh et al., 2007). La muerte neuronal por hipoglucemia es

más pronunciada en poblaciones específicas de neuronas como las del hipocampo y las de las láminas II y III de la corteza cerebral, las cuales tienen una alta concentración pre-sináptica vesicular de zinc (Zn), estas neuronas son importantes para el aprendizaje y la memoria, por ello los pacientes que sobreviven a un coma hipoglucémico pueden quedar con alguna discapacidad cognitiva (Suh et al., 2007; Suh et al., 2003).

La hipoglucemia puede ser el resultado de una excesiva administración de insulina por el intento de controlar los niveles de glucosa en sangre, investigaciones sugieren que una inapropiada secreción de insulina puede incrementar el daño al sistema nervioso (Tanaka et al., 2008).

Existe una respuesta metabólica contra la hipoglucemia, sustratos endógenos como los cuerpos cetónicos, intermediarios del ciclo de los ácidos cítricos y aminoácidos son movilizados en respuesta a esta condición (Auer et al., 1984).

2.4 Muerte neuronal por hipoglucemia

Hace 27 años Auer y su grupo (1984), establecieron que una hipoglucemia severa genera muerte neuronal, la cual puede conducir a deterioros cognitivos y a un daño cerebral permanente.

Se sabe que los niveles de glucosa en el cerebro son entre 15 a 20% mayores que su nivel en sangre (Dunn-Meynell et al., 2009). La falla metabólica y la disminución de energía causan desequilibrio en el gradiente iónico, acumulación intracelular de Ca^{2+} , Na^{+} y una reducción del pH. Este desequilibrio traerá como consecuencia la disfunción del transporte de la membrana, de las funciones mitocondriales y de la producción de proteínas, que resultará en una falla de la cadena respiratoria generando excesivamente ROS que conducirán a la lipoperoxidación y al daño de las membranas celulares y el citoesqueleto. Eventos pro-apoptóticos iniciarán, tales como la activación NF- $\kappa\beta$ y vías dependientes de p-53, disminución de Bcl-2 con relación a Bax, liberación del citocromo C y activación de caspasas, eventos que conducirán al daño del ADN y a la muerte

celular (Lin y Lee, 2009). Se ha reportado que la privación de glucosa también afecta, daña y puede inducir la apoptosis de células gliales (Arai y Lo, 2009).

La muerte neuronal que surge después de la hipoglucemia, no es sólo resultado de la falla de energía por la pérdida de glucosa, también puede ser el resultado de la activación sostenida de receptores de glutamato, aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y la de K^{+} extracelular, incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, así como de la muerte celular programada que se inicia por la reperfusión sanguínea. La muerte neuronal por hipoglucemia, es mediada, en parte por la liberación pre-sináptica de Zn^{2+} que activa a la microglía y la translocación post-sináptica de Zn^{2+} , que al acumularse intracelularmente promueve la producción de ROS a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa, la cual se considera como fuente primaria de estrés oxidativo neuronal (Shin et al., 2009; Suh et al., 2007).

El daño neuronal inducido durante la interrupción de energía, como en la isquemia y la hipoglucemia, involucra daño oxidativo. La producción de ROS se encuentra involucrada directamente en la muerte neuronal por hipoglucemia. La peroxidación de los lípidos cerebrales se ha observado durante hipoglucemia inducida por la administración de 30UI de insulina en ayuno, midiendo la concentración de glucosa en sangre (Haces, 2008). En el SNC, una excesiva producción de ROS y RNS es considerada como un mecanismo de neurodegeneración asociado con varios insultos a las neuronas, como la hipoglucemia y la hipoxia (Wang y Michaelis, 2010).

3.- Melatonina

3.1 Síntesis y metabolismo

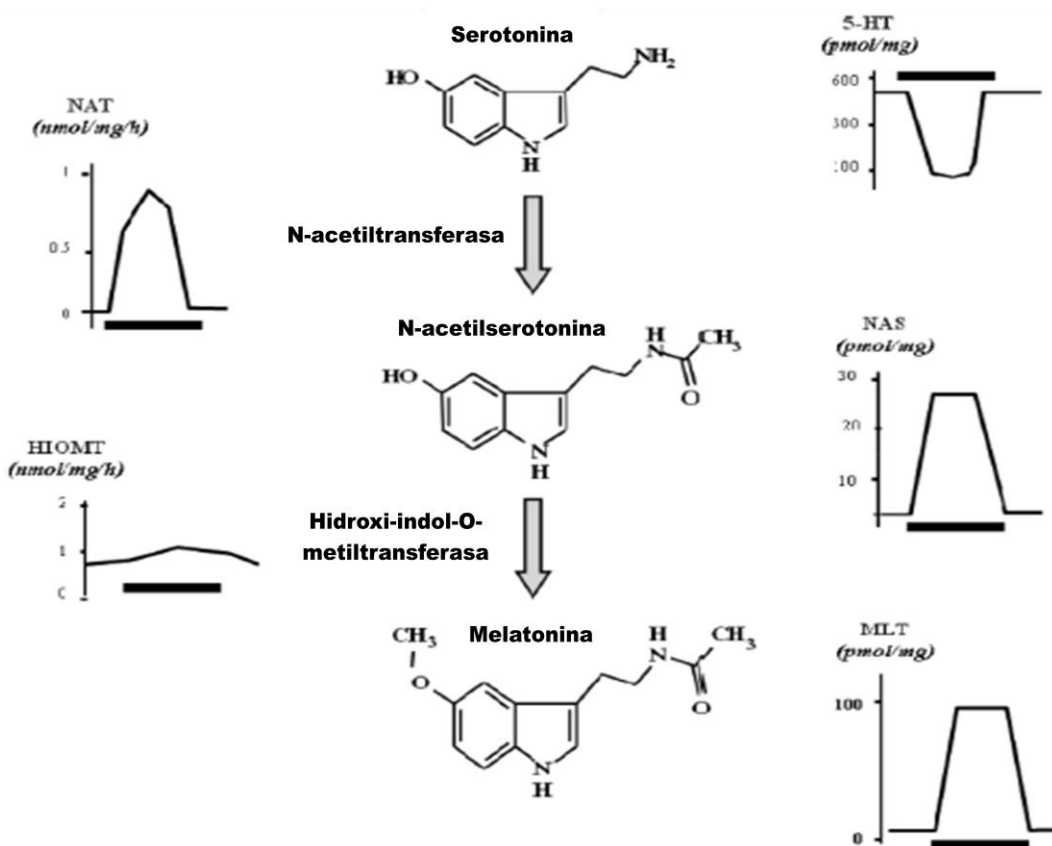
El estudio de la melatonina data desde 1917, cuando McCord y Allen demostraron que la piel de renacuajos (*Rana pipiens*) era aclarada por el extracto de la glándula pineal de bovinos y a finales de los 50's, Aaron Lerner y sus colaboradores aislaron esta hormona pineal, además de corroborar que producía el mismo efecto a partir de pinealocitos bovinos y describieron su estructura química del aminoácido (Zawilska et al., 2009; Dubocovich, 1988). La acción de la

melatonina al agregar pigmentos (melanosomas) dérmicos de anfibios, postuló la presencia de los receptores de melatonina y que estos eran asociados a proteína G (Dubocovich et al., 2010).

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una indolamina endógena sintetizada en los pinealocitos a partir de la serotonina, esencial para sincronizar la actividad biológica con los ritmos circadianos y el sueño (Reiter et al., 2007). Su concentración fisiológica alcanza su punto máximo durante la noche oscilando de 100-400pM y durante el día, cae a valores de 30pM. Es sintetizada en la glándula pineal a partir de la serotonina a través de dos pasos enzimáticos, primero, la enzima serotonina *N*-acetiltransferasa [arilalquilamina *N*-acetiltransferasa (AA-NAT)] agrega un grupo acetilo a la serotonina para producir *N*-acetilserotonina y el segundo paso, involucra la transferencia de un grupo metilo del (S)-adenosinmetionina hacia el grupo 5-hidroxi de la *N*-acetilserotonina por la acción de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Dubocovich et al., 2010; Hong et al., 2010; Tamminga 2006; Akagi et al., 2004; Valdés et al., 2003; ver Figura 6) para de este modo realizar funciones fisiológicas dentro de las cuales también está el regular la actividad sexual de algunas especies.

En mamíferos, la mayor parte del ritmo nocturno de la melatonina circulante es abolido por la pinealectomía, aunque no es eliminada totalmente (Raskind et al., 2007). Existen reportes que sugieren que aproximadamente el 20% de la melatonina circulante es derivada de otros tejidos como la retina, el intestino, la medula espinal, linfocitos, piel, testículos y el núcleo de rafé (Hong et al., 2010; Reiter et al., 2005). La lipofilidad de la molécula de la melatonina le permite difundir pasivamente a través de las barrera hematoencefálica, de membranas y capas celulares, por lo tanto, puede difundirse desde los pinealocitos tan pronto como es sintetizada (Dubocovich et al., 2010; Ambriz et al., 2009; Reiter et al., 2007) y concentrarse mayormente en el núcleo y la mitocondria de las células.

Figura 6



Representación de la síntesis de la melatonina. La melatonina es sintetizada a partir de la serotonina a través de dos pasos enzimáticos. Primero, la 5-HT es acetilada por la NAT para producir *N*-acetil-5HT. El segundo paso involucra la transferencia de un grupo metilo del (*S*)-adenosinmetionina hacia el grupo 5-hidroxil de la *N*-acetil-5HT por la acción de la enzima HIOMT. Los insertos indican: obscuridad (barra negra), tiempo en el cual se produce melatonina y se reduce la producción de serotonina (Dubocovich et al., 2010).

3.2 Eliminación de melatonina

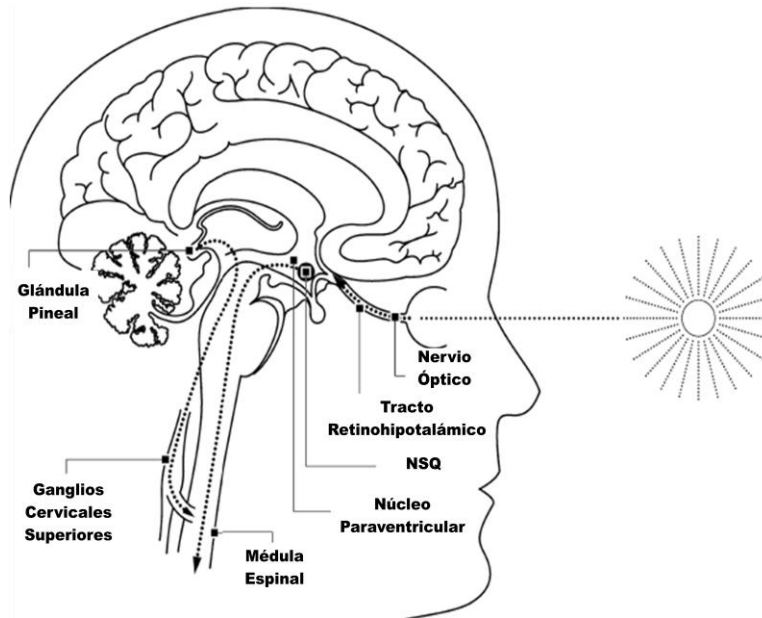
La melatonina desaparece de la sangre rápidamente, con una vida media de aproximadamente de 30min. En el humano, la mayoría de la melatonina en la circulación es convertida por el citocromo P450 a 6-hidroximelatonina por el hígado, el cual elimina del 92 al 97% de la melatonina circulante, posteriormente, la 6-hidroximelatonina es conjugada y eliminada por el riñón, aproximadamente del 50 al 80% como sulfato y del 5 al 30% como ácido glucurónico (Dubocovich et al., 2010; Reiter et al., 2005). El metabolismo de la melatonina en el cerebro involucra al anillo de pirrol oxidativo, el cual se estima que contribuye aproximadamente en un tercio del total de su catabolismo (Ambriz et al., 2009). Los metabolitos de la

melatonina en el cerebro resultantes de la acción del anillo de pirrol pueden interactuar y eliminar ROS, el N^1 -acetil- N^2 -formil-5-metoxiquinuramina (AFMK), captura al H_2O_2 y es transformado por la enzima CAT en N^1 -acetil-5-metoxiquinuramina (AMK), mientras que la 3-hidroximelatonina cíclica, se forma al capturar al radical OH \cdot y puede ser transformado a AFMK; ambos metabolitos son excretados por la orina (Zawilska et al., 2009; Reiter et al., 2007). En otras palabras, la melatonina y sus metabolitos son capaces de reducir los efectos de los radicales libres debido a que capturan a estas moléculas, sin mediar para ello la interacción con receptores membranales (Dubocovich et al., 2010).

3.3 Fisiología y función de la melatonina

En mamíferos, esta neurohormona es secretada principalmente por la glándula pineal durante el periodo de oscuridad del ciclo día/noche y liberada a la sangre, así como hacia el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo (Ramirez et al., 2009; Raskind et al., 2007; Reiter et al., 2005). La síntesis de la melatonina pineal y su liberación son reguladas por células del reloj biológico localizadas en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior (NSQ). La biotransformación de este aminoácido también se lleva a cabo en las células de la retina específicamente en los fotorreceptores (Figura 7). En ambos casos el ritmo biológico y la actividad celular son sincronizados en un periodo de 24 horas por la luz ambiental (fotoperiodo). La información fótica es percibida por las células ganglionares de la retina que contienen un ftopigmento llamado melanopsina, las cuales transmiten los estímulos luminosos al NSQ vía el tracto retinohipotalámico, de donde la información viaja por las neuronas pre-ganglionares simpáticas hasta llegar a los ganglios cervicales superiores y finalmente a las fibras adrenérgicas postganglionares que inervan a la glándula pineal (Dubocovich et al., 2010; Zawilska et al., 2009). La pineal dará información al organismo sobre los cambios de luz en el medio ambiente y la señal bioquímica se transmitirá a través de la liberación de esta hormona regulando funciones como la reproducción, el apetito y el sueño (Valdés et al., 2003).

Figura 7



Fisiología de la melatonina. La síntesis de la melatonina y su liberación por la glándula pineal son inhibidas por la luz y estimuladas por la oscuridad. Las señales neurales provenientes de las células ganglionares son transferidas hacia el hipotálamo anterior y al SNC por el tracto retinohipotalámico, luego a los ganglios cervicales superiores y finalmente a la glándula pineal (modificado de Doghramji, 2007).

El mecanismo molecular de la melatonina se caracteriza por la liberación nocturna en la glándula pineal de noradrenalina, la cual se une y activa a los receptores β y α adrenérgicos localizados en los pinealocitos para estimular la actividad de la adenilato ciclasa y elevar el nivel de Ca^{2+} y adenosín monofosfato cíclico (AMP_c), lo que aumentará la expresión y la actividad de la enzima AA-NAT y subsecuentemente incrementará los niveles de N-acetil-5-metoxitriptamina (Hong et al., 2010; Tamminga 2006).

La melatonina es de gran importancia para la función del NSQ el cual contiene la más alta densidad de receptores para esta hormona, el tracto retinohipotalámico-pineal es capaz de detectar la duración de la noche para hacer ajustes apropiados en la secreción nocturna de la melatonina, es decir, durante los cambios estacionales, la duración de la noche se modifica en proporción directa con la secreción de melatonina (Reghunandan y Reghunandan, 2006). Su concentración endógena o su administración exógena pueden imponer el ritmo

circadiano a diversas estructuras y actuar directamente en el NSQ modulando el reloj biológico, además, existen reportes que afirman que es capaz de modular otras funciones como la visual, la neuroendocrina, la reproductiva, la inmunológica, la fisiología vascular y la regulación del dolor (Dubocovich et al., 2010; Kaur y Ling, 2008).

Después de su administración periférica, la indolamina aparece en altas concentraciones en el cerebro, su concentración difiere entre los orgánulos subcelulares concentrándose mayormente en el núcleo y en la mitocondria (Reiter et al., 2005).

La reducción en la concentración de melatonina endógena por el envejecimiento o por algunos fármacos puede alterar el metabolismo y la actividad física, es decir, que el incremento del peso corporal y del depósito de grasa son en parte explicados por una disminución en la síntesis y liberación de melatonina con la edad (Robeva et al., 2008; Raskind et al., 2007).

Su fisiología se asocia con la regulación del sistema inmune, por ejemplo, la administración exógena de melatonina antagoniza los efectos inmunosupresores de la corticoesterona y del estrés agudo. Se ha sugerido que su efecto inmunoestimulante se produce por un mecanismo mediado por péptidos opioides, ya que en ausencia de melatonina endógena, se rompe el ritmo circádico de las encefalinas y disminuye significativamente su contenido tisular en varias estructuras del SNC de la rata (Valdés et al., 2003).

3.4 Receptores membranales de melatonina

Los ritmos circadianos en la glándula pineal fueron estudiados por Wilbur Quay, desde 1963. La melatonina juega un importante rol en la sincronización de los procesos biológicos, sus acciones fisiológicas son mediadas por sus receptores los cuales se localizan en estructuras como tálamo, pituitaria, médula espinal y principalmente en el NSQ del hipotálamo, ya que reciben y traducen información para influir en los ritmos circadianos y estacionales (Hong et al., 2010). Los receptores membranales de melatonina son proteínas con una estructura heterotrimérica con 7 pasos transmembrana con segmentos α -

helicoidales conectados por lazos intracelulares y extracelulares alternados, con la terminación amino localizada en el lado extracelular y la terminación carboxilo en la parte intracelular. Estos segmentos contienen de 20 a 25 residuos hidrofóbicos. El NSQ regula la liberación de melatonina, ésta hormona genera una retroalimentación negativa, disminuye el disparo neuronal del NSQ (Doghramji, 2007). La nomenclatura actual clasifica a los receptores clonados de melatonina en dos tipos: MT₁ y MT₂ (Dubocovich et al., 2010).

La vía mejor conocida de señalización de los receptores de melatonina es la inhibición de la formación de AMP_c por activación de la proteína G sensible a la toxina pertusis (PTX) (Ambriz et al., 2009; Zawilska et al., 2009). La sensibilidad a PTX indica la participación de proteínas G_i/G_o en los mecanismos de transducción (Reiter et al., 2007). La inhibición de la enzima adenilatociclasa también es otro mecanismo de señalización de los receptores MT₁ y MT₂. Puede presentarse una desensibilización de estos receptores por una prolongada y alta concentración de melatonina la cual puede afectar a la ritmicidad circadiana y al sueño (Dubocovich et al., 2010).

3.4.1 El receptor MT₁

El receptor MT₁ fue el primer receptor de melatonina clonado, está asociado a la proteína G_{i/o} y es responsable de la inhibición de la formación del AMP_c en las células. Se ha indicado su presencia en estructuras como la corteza cerebral, el tálamo, el hipocampo, el cerebelo, la retina, la pituitaria anterior, el NSQ del hipotálamo y en tejidos como las glándulas adrenales, las arterias, el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, la piel y los linfocitos (Zawilska et al., 2009). Este receptor tiene 350 residuos de aminoácidos, siendo aproximadamente el 60% de estos homólogos a los que tiene el receptor MT₂ dentro de su dominio transmembrana. Su terminación amino contiene dos sitios para glicosilación y su parte carboxilo contiene sitios para el reconocimiento de las enzimas caseincinasa 1 α , caseincinasa II y proteincinasa C (PKC). Este receptor está localizado en el humano en el gen P48039, en el cromosoma 4 en la región q35.1, esta acoplado a proteína G sensible (G_i) o insensible (G_{q/11}) a PTX y su activación disminuye la

formación, la actividad y la fosforilación de AMP_c. La activación del receptor MT₁ genera distintas respuestas en los tejidos, puede regular el flujo de iones y la actividad de canales iónicos, genera vasoconstricción aparentemente regulada por la disminución en la fosforilación mediada por AMP_c de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) en músculo liso; inhibe el disparo neuronal en el NSQ probablemente por la activación de canales rectificadores tardíos de K⁺ (Kir) incrementado la corriente saliente de K⁺, así como regula el cambio de fase de la actividad del ritmo circadiano (Dubocovich et al., 2010; Doghramji, 2007).

3.4.2 El receptor MT₂

Este receptor clonado de melatonina, llamado MT₂, también está asociado a proteína G_{i/o}, es capaz de inhibir la producción de AMP_c, la formación de guanósil monofosfato cíclico (GMP_c) y estimular la actividad de la PKC en el NSQ (Mutoh et al., 2003). Por lo que se sugiere que este receptor de melatonina interactúa con la vía fosfolipasa C/diacilglicerol. Inicialmente el perfil farmacológico de este receptor fue caracterizado en la retina, donde inhibe la liberación de neurotransmisor a través de un mecanismo que probablemente involucra la regulación de Ca²⁺ intracelular, además este receptor es expresado en el hipocampo, NSQ del hipotálamo, el cerebelo y en tejidos como el corazón, las arterias, los pulmones, el hígado, los riñones, el intestino y la piel (Zawilska et al., 2009). Fue definido por el uso de sus antagonistas selectivos 4-fenil-2-acetamidotetralin (4P-ADOT) y el 4-fenil-2-propionamidotetralin (4P-PDOT). Este receptor está compuesto por 362 residuos de aminoácidos, siendo aproximadamente el 73% de aminoácidos homólogos a los del receptor MT₁ dentro de su dominio transmembrana. Su terminación amino contiene solo un sitio para glicosilación y su parte carboxilo contiene sitios para el reconocimiento de las enzimas caseinquinasa 1α, caseinquinasa II y PKC. Este receptor está localizado en el humano en el gen P49286, en el cromosoma 11 en la región q21-22. Puede tener funciones como la vasodilatación, la inhibición de liberación de dopamina retinal y la regulación del disparo neuronal en el NSQ en el cambio de fase del ritmo circadiano (Dubocovich et al., 2010; Doghramji, 2007).

3.4.3 Los receptores MT₃ y Mel_{1c}

El receptor MT₃ está ampliamente distribuido en el cerebro, el hígado, el corazón, el riñón y los pulmones, pertenece a la familia citosólica de las quinonas reductasa (Ambriz et al., 2009). Es un receptor-enzima con distinta farmacología con agonistas y antagonistas selectivos, tiene una afinidad similar por la melatonina y por su precursor *N*-acetilserotonina y puede regular la respuesta inflamatoria, así como capturar quinonas (Dubocovich et al., 2010; Reiter et al., 2007; Doghramji, 2007).

El receptor Mel_{1c}, es un receptor de melatonina no expresado en mamíferos, se encuentra en peces, aves y anfibios, es filogenéticamente más cercano al receptor MT₂ (Dubocovich et al., 2010; Mathes, 2010; Zawilska et al., 2009).

3.5 El luzindol

El luzindol (2-benzil *N*-acetiltriptamina), fue el primer ligando descrito como un antagonista competitivo no selectivo de los receptores de melatonina y ha sido usado extensamente para validar la acción de la melatonina sobre estos receptores. Fue el primer antagonista que demostró la actividad de los receptores por la presencia de melatonina modulando la inhibición de la liberación de dopamina en la retina, disminuyendo el disparo neuronal y el cambio de fase en los ritmos circadianos en el NSQ de roedores (Dubocovich et al., 2010). Se ha descrito que es capaz de inhibir el efecto antitumoral (Akagi et al., 2004) e hipotensor de la melatonina (Chao et al., 2001).

3.6 Efectos de la melatonina

Se ha sugerido que la melatonina puede inducir sus efectos mediante tres vías: 1) vía de señalización membranal, 2) vía de señalización nuclear y 3) eliminación/captura de radicales libres independiente de sus receptores de membrana (Ambriz et al., 2009; Reiter et al., 2007).

Esta hormona tiene varios efectos: regula los ritmos circadianos, por ello es usada contra los desórdenes del sueño como el insomnio y el cambio de horario.

Actúa como un antioxidante, puede capturar radicales libres e induce un efecto neuroprotector en patologías neurodegenerativas (Dubocovich et al., 2010; Ramirez et al., 2009; Koh P 2008). Se sugiere un efecto anticancerígeno no tóxico (Wang et al., 2009; Akagi et al., 2004). Puede disminuir el proceso de apoptosis y de necrosis en el SNC, así como en otros tejidos, disminuyendo la producción de caspasas (Hong et al., 2010; Das et al., 2008). Durante la hipoxia y la reoxigenación, la administración de melatonina reduce la apoptosis al elevar los niveles de la proteína *bcl-2* en relación con los niveles de *bax* (Das et al., 2008; Ling et al., 1999).

Diversos estudios han comprobado el efecto neuroprotector de la melatonina en el cerebro y la medula espinal reduciendo el volumen del infarto o de la lesión en diferentes modelos de isquemia en animales, disminuyendo la formación de ROS (Koh, 2008; Samantaray et al., 2008; Reiter et al., 2005), así como *in vitro*, protegiendo contra la muerte celular a las neuronas primarias de la corteza en cultivo inhibiendo la liberación del citocromo C, del AIF y la activación de la caspasa 3 inducidas por privación de glucosa y oxígeno. Este efecto puede ser a corto o a largo plazo y está asociado con la restauración de las características citoarquitectónicas de las neuronas (Wang et al., 2009).

Disminuye la actividad de la oxido nítrico sintasa neuronal y del sistema inmune (nNOS y nNOS) e incrementa la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Koh, 2008; Kaur y Ling, 2008). Reduce el daño oxidativo de biomoléculas capturando ROS y RNS (Hong et al., 2010; Wang et al., 2009; Reiter et al., 2000, 2007), además, estimula la actividad de enzimas antioxidantes como la GPx, la glutatión reductasa (GRd), la SOD, la CAT y la glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G-6-PD) (Hong et al., 2010; Lin y Lee, 2009; Kaur y Ling, 2008). Preserva la función de la cadena de transporte de electrones, previniendo la despolarización de la membrana mitocondrial inducida por la privación de glucosa y oxígeno, manteniendo la producción de ATP y de glutatión (Wang et al., 2009; Reiter et al., 2005; Pei et al., 2003).

Diversas investigaciones han mostrado que la melatonina puede estar involucrada en la homeostasis de la glucosa, regular el balance energético, los

niveles de lípidos y el colesterol en el plasma (Robeva et al., 2008; Raskind et al., 2007; Mahmood et al., 2006).

Estudios muestran que la melatonina es capaz de reducir la inflamación y la degeneración axonal después de un infarto cerebral reduciendo la activación de la microglía y la producción de citocinas, así como la infiltración de células inmunológicas (Hong et al., 2010; Wang et al., 2009; Samantaray et al., 2008). Ejerce este efecto anti-inflamatorio por la inhibición de la producción de NO mediante la supresión de óxido nítrico sintasa (NOS) y de la ciclooxigenasa-2 (Pei et al., 2003).

La melatonina puede atenuar el influjo de Ca^{2+} mediado por el glutamato (Hong et al., 2010) e inhibe el daño neuronal por excitotoxicidad (Wang et al., 2009; Reiter et al., 2005). Su deficiencia *in vivo* inducida por pinealectomía vuelve a las ratas más susceptibles a la muerte neuronal por excitotoxicidad inducida por la administración de kainato y estudios *in vitro*, han reportado que puede abolir el incremento intracelular de Ca^{2+} inducido por el NMDA y aminorar la excitotoxicidad en áreas como el hipocampo, la amígdala, la corteza piriforme y en neuronas del cerebelo (Lin y Lee, 2009; Pei et al., 2003).

Se ha señalado que esta hormona modula la diferenciación y la neurogénesis en el hipocampo (Ramirez et al., 2009), así como también se sugiere un efecto antitumoral (Fischer et al., 2008). Inhibe el crecimiento neoplásico, retarda el crecimiento tumoral (Akagi et al., 2004) y tiene un efecto oncostático e inmunomodulatorio en las células tumorales (Hong et al., 2010).

Justificación

La hipoglucemia puede originarse por causas endocrinas, autoinmunes, lesiones hepáticas, tumorales, por déficit de sustratos metabólicos o puede ser inducida por agentes externos como drogas o intoxicaciones. Según su grado de severidad puede causar irritabilidad, convulsiones y conducir hasta el coma asociado a muerte neuronal. Los pacientes que sobreviven a un coma hipoglucémico cursan con algún deterioro cognitivo y motor (Suh et al., 2007). Los tratamientos en neuroprotección tienen como principal objetivo bloquear los procesos celulares, bioquímicos y metabólicos durante la muerte neuronal. Son varios los agentes que han sido probados clínicamente en el campo de la neuroprotección, aunque ninguno ha demostrado ser eficaz a pesar del éxito visto en anteriores estudios en animales (Lakhan et al., 2009; Pei et al., 2003).

Por tal motivo, la justificación principal de la presente tesis es analizar en un modelo animal de hipoglucemia severa, el efecto neuroprotector de la melatonina. Los resultados nos ayudarán a entender los mecanismos de neuroprotección que puede tener la melatonina, en un desbalance energético severo.

La justificación de usar melatonina para este trabajo es la siguiente: es una hormona que tiene varios efectos farmacológicos y fisiológicos, tiene capacidad antioxidante capturando radicales libres, favoreciendo neuroprotección en patologías neurodegenerativas, regula los ritmos circadianos, es usada contra los desordenes del sueño.

Objetivo General

Realizar un estudio electrofisiológico y anatómico para identificar el efecto neuroprotector de la melatonina en un modelo *in vivo* de hipoglucemia severa inducida por insulina. Evaluar si este efecto de neuroprotección es dependiente de los receptores de membrana para melatonina.

Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto sobre el EEG de la administración de melatonina durante una condición de hipoglucemia severa inducida por insulina en ratas Wistar, realizando registros de la corteza cerebral frontal y parietal (*in vivo*).
- Analizar los cambios en los niveles de glucosa durante la hipoglucemia inducida por insulina y cuantificar el efecto de la melatonina en los niveles de glucosa.
- Identificar con el uso del antagonista de receptores de melatonina, luzindol, si el efecto inducido sobre el EEG por la hormona es dependiente de sus receptores membranales.
- Cuantificar histológicamente el efecto neuroprotector inducido por la melatonina mediante la tinción de Nissl de las áreas CA1 y CA3 de hipocampo, así como en la corteza somatosensorial de la rata.

VARIABLES DE TRABAJO.

Variable Independiente

Inducción de hipoglucemia severa por ayuno asociado a la aplicación i.p. de 30 UI de insulina.

Variable Dependiente

Validar el efecto neuroprotector de la melatonina: 1) midiendo cambios de la actividad eléctrica del EEG, 2) de los niveles de glicemia y, 3) a través de un análisis histológico de los cerebros de estos animales.

Hipótesis

Si, la melatonina es un capturador de radicales libres y un antioxidante, entonces, la administración de esta hormona puede reducir los eventos de muerte neuronal y los cambios electroencefalográficos inducidos por la hipoglucemia severa.

Método

En esta tesis se realizaron 3 técnicas distintas pero complementarias en sus hallazgos entre ellas: 1) el registro de la actividad EEG; 2) el análisis histológico con el uso de la tinción de Nissl; y, 3) la medición de los cambios de la glucosa plasmática bajo condición control, de hipoglucemia y durante la administración de las drogas (insulina, melatonina y luzindol).

Sujetos

El presente estudio se llevó a cabo *in vivo* además de un análisis histológico post mortem del cerebro de 45 ratas macho de la cepa Wistar (200-300g) provenientes del bioterio del INPRF, las cuales se dividieron en 9 grupos, con N=5 cada uno. Todos los animales se mantuvieron individualmente en cajas de acrílico, 3 grupos bajo ciclo invertido de luz y 6 grupos bajo condición de luz continua. Todos los grupos tuvieron agua y alimento *ad libitum*, los animales se sometieron a cirugías estereotáxicas con cuidados post operatorios de antibióticoterapia. Un día antes de la inducción de la hipoglucemia severa a todos los grupos se les mantuvo en ayuno 24 h, en condiciones estandarizadas de temperatura (20-25°C) y de acuerdo a las normas establecidas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Academia Nacional de Medicina (1999). A todos los animales se les registró EEG, durante los registros se obtuvieron muestras de sangre para cuantificación de la glicemia y sus cerebros fueron estudiados por análisis histológicos. Los detalles de las cirugías, los procedimientos farmacológicos y secuencia del diseño experimental se describirán en dos secciones adelante.

Instrumentos y materiales

Material

Se menciona a continuación en orden de uso, el material que se empleó en la cirugía estereotáxica: jeringas, guantes de látex, instrumental quirúrgico básico, electrodos epidurales (tornillos de acero inoxidable soldados a pequeñas terminales de cobre), conectores y sutura (seda 00). Registros EEG: cables de

registro y jeringas. Glucometrías: lancetas y tiras reactivas de medición glucométrica. Perfusión intracardiaca: jeringas, instrumental quirúrgico, vaso de precipitado 100ml, papel filtro, reja de perfusión, caja de petri, equipo de venoclisis. Histología: parafina, vaso de precipitado 100ml, porta y cubreobjetos.

Aparatos

Báscula Sartorius.

Sistema estereotáxico de una torre Neuroscience Physiology Research Equipment
Stoelting modelo lab. standard.

Amplificadores modelo P511 Grass.

Glucómetro One Touch Ultra de Johnson & Johnson.

Micrótomo de Rotación Leica RM2125.

Microscopio Carl Zeiss Axiolab.

Sistema con platina motorizada Optic Scan II.

Computadora PC software Image proplus.

Sustancias

Alcohol etílico desnaturalizado (D. de Productos Luna, México)

Antibiótico (Benzatina, bencilpenicilina antibióticos de México, S.A. de C.V)

Antiséptico (Microcyn, Oculus Technologies de México)

Formaldehído (Mallinckrodt Baker)

NaCl (Sigma-Aldrich, St Lois, MO, U.S.A.)

Insulina (Humulin regular acción rápida Eli Lilly y Compañía de México)

Lidocaína y epinefrina (265 Laboratorios PiSA de México)

Luzindol (L2407 Sigma-Aldrich, St Lois, MO, U.S.A.)

Melatonina (M5250 Sigma-Aldrich, St Lois, MO, U.S.A.)

Parafina

Pentobarbital sódico (Sedalphorte, Salud y Bienestar Animal de México)

Resina Acrílica (Nic Tone Cross Linked, mdc dental México)

Violeta de cresilo

Xilol

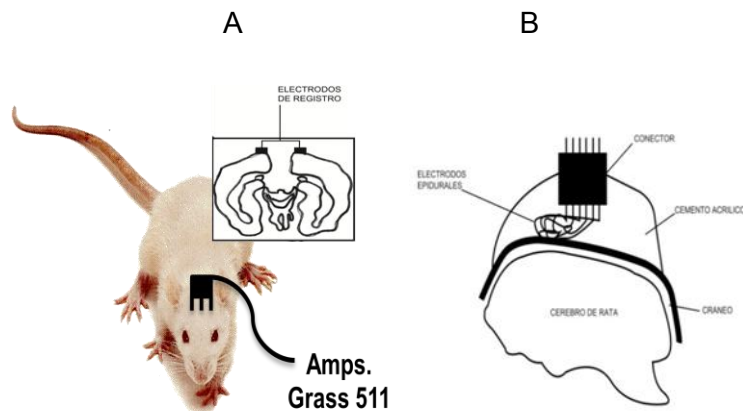
Procedimiento

Cirugía Estereotáxica

La primera serie de experimentos se realizó para identificar los cambios EEG inducidos por la hipoglucemia. Datos previos a esta tesis (Del Campo et al., 2009), cuantificaron que un ayuno de 24 h asociado con la administración de 30UI de insulina produce un estado de hipoglucemia severo; el cual se identifica por un incremento de la excitabilidad del sistema nervioso que gradualmente lleva a un proceso de muerte neuronal, el cual es el sustrato neurobiológico de la aparición de la señal isoelectrica en el EEG. Nosotros desconocíamos si la administración previa de melatonina a la aplicación de insulina podría modificar la actividad EEG bajo condiciones de hipoglucemia y si la administración de luzindol generaría un cambio en el EEG como respuesta inhibitoria al efecto de la melatonina. Para resolver este cuestionamiento fue necesario realizar cirugías estereotáxicas para colocar electrodos epidurales a todos los animales para registro de la actividad EEG.

Cada cirugía se realizó en animales anestesiados intraperitonealmente con pentobarbital sódico (33mg/Kg de peso; Sedalphorte®), el cráneo fue expuesto a través de una incisión longitudinal en la línea media del cuero cabelludo. A cada rata se le colocaron electrodos epidurales (con el uso un sistema estereotáxico Neuroscience Physiology Research Equipment Stoelting) mediante pequeñas trepanaciones en ambos hemisferios cerebrales a 2mm de la línea sagital; 2 en la corteza frontal [CxF] y 2 en la corteza parietal [CxP], 2mm anteriores y 2mm posteriores a bregma; terminales de cobre de cada electrodo se soldaron a un conector el cual fue utilizado para los registros EEG. El complejo electrodos-conector fue fijado al cráneo con cemento acrílico (Figura 8). Cada animal recibió dosis de antibiótico profiláctico (bencilpenicilina) y se alojó individualmente, sin ninguna manipulación durante una semana de recuperación post-quirúrgica. Este sistema permite registrar la actividad eléctrica del cerebro en un animal con libre movimiento en forma crónica.

Figura 8



Esquema de la colocación de electrodos epidurales en la rata por cirugía estereotáxica. A) Ubicación de la posición de los electrodos epidurales en el cráneo de una rata. B) Se muestra el circuito de conexión entre los electrodos y el conector para ser utilizados en el registro del EEG.

Registro de la actividad EEG de la corteza frontal y somatosensorial

Después de una semana de recuperación al evento quirúrgico y de habituación a las condiciones de registro, se obtuvieron 15 min del registro control de la actividad control EEG de cada animal.

La conexión entre los electrodos y el cable de registro se insertó en dos entradas multicanal, las cuales envían la señal bioeléctrica a los amplificadores. Después de la inducción de la hipoglucemia severa o las aplicaciones farmacológicas, el registro bipolar EEG de cada animal duró 2 horas. Cada registro se obtuvo mediante 2 amplificadores Grass P511, la digitalización y grabación se realizó a una velocidad de muestreo de 100Hz, con una amplificación de 20,000 veces la señal bioeléctrica y la banda de frecuencia de entrada de los amplificadores se estableció entre 3 y 300Hz. Los registros fueron visualizados y almacenados en una computadora PC utilizando para ello el software PolyView16.

Se analizó la señal de EEG obteniendo una transformada de Fourier de cada registro, 15 min previos a cualquier manipulación farmacológica, 15 min a la hora (60-75 min) y 15 min a las 2 h (120-135 min) de la aplicación de insulina o del inicio del registro) los espectros de potencia de cada grupo se promediaron. Se

normalizaron los promedios para obtener un porcentaje de cambio en la actividad EEG de todos los grupos. Con este análisis se identificó: 1) la actividad basal o control en el EEG, 2) los cambios en dicha actividad y la latencia de aparición de la actividad isoelectrica que caracteriza a la hipoglucemia severa inducida por la administración de insulina, 3) el efecto EEG de la melatonina sobre la línea base y sobre la hipoglucemia severa y, 4) el efecto EEG de la administración previa de luzindol sobre la actividad de la melatonina. Se realizó un análisis estadístico del porcentaje de cambio durante 2h de la actividad EEG de cada grupo, para ello se utilizó la prueba t de student (no pareada con corrección de Welch con un nivel de significancia asignado para $P \leq 0.05$).

El EEG se empleó como técnica en ésta tesis ya que representa el voltaje registrado entre dos electrodos. El registro obtenido de cada par de electrodos es algo diferente porque cada par toma una muestra de la actividad de una población de neuronas en una región encefálica diferente. Además, cada electrodo de registro puede medir la actividad de una cantidad muy grande de neuronas en las regiones subyacentes del encéfalo, cada una de las cuales genera un campo eléctrico pequeño que cambia con el tiempo. Esta actividad, que en su mayor parte se considera sináptica, torna al espacio extracelular más superficial negativo en relación con las regiones corticales más profundas. Cada electrodo del EEG mide una señal sincrónica porque miles de células responden de la misma forma más o menos al mismo tiempo. En la capa de células piramidales por debajo del electrodo del EEG, cada neurona recibe miles de aferencias sinápticas. Si las aferencias son irregulares o se encuentran fuera de fase, su suma algebraica tendrá una amplitud pequeña, como en el estado de vigilia. Por otra parte, si las neuronas se activan al mismo tiempo, entonces las ondas del EEG estarán en fase y la amplitud será mucho mayor, como en las ondas delta características del estadio IV del sueño (Purves et al., 2006).

Glucometría

Durante los registros de la actividad EEG se midió el nivel de glucosa en sangre de las ratas a través de una punción con sistema de microlanceta en la cola de cada animal procurando que la manipulación generara el menor estrés posible.

A todos los animales se les realizaron tomas secuenciadas de glucosa plasmática cada 30 min durante las 2h del registro de EEG con el uso de un glucómetro (One Touch Ultra de Johnson & Johnson).

Las glucometrías cuantificaron los niveles basales de glucemia, los niveles de glucosa inducidos por el ayuno y la aplicación de insulina, así como el efecto que tuvo la melatonina y el luzindol. El análisis estadístico correspondió a la aplicación de una t de student pareada comparando los tiempos (cada 30min) con el promedio de los niveles de glucemia de los grupos control con respecto a los grupos que recibieron insulina, melatonina y luzindol.

Histología

Datos previos a nuestra investigación muestran que el hipocampo y las capa corticales del cerebro, laminas II y III, tienen un menor umbral al daño por hipoglucemia, es decir, son más vulnerables a los daños de una disminución en la perfusión, aporte de oxígeno y de glucosa (Del Campo et al., 2009). El fenómeno de neuroprotección inducido por melatonina *in vivo* puede cuantificarse en estas áreas del SNC (García et al., 2008; González et al., 2007). El uso de técnicas simples, como la tinción de Nissl, permite una cuantificación histológica precisa: es posible observar en las neuronas el núcleo y el ácido ribonucleico (RNA) con lo que se permite un control específico del conteo neuronal. La propuesta de estudiar los cortes de cerebro de estos animales fue la de obtener un correlato anatómico de la magnitud de la muerte neuronal inducida por la hipoglucemia severa y el efecto neuroprotector de la melatonina.

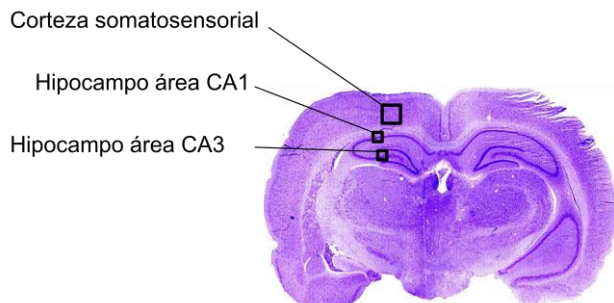
Después del registro EEG de todos los grupos, los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso; Sedalphorte®) y perfundidos con un catéter a nivel del ventrículo izquierdo del corazón con

solución salina (NaCl al 0.9%). Al término de la perfusión, los cerebros se extrajeron rápidamente y fueron inmersos para ser fijados en una solución de formaldehído al 20%.

Posteriormente, los cerebros de cada grupo, se deshidrataron progresivamente en tres soluciones de alcohol 1) 70°, 2) 96° y 3) absoluto/xilol, y se incluyeron en parafina. Cada hemisferio cerebral se seccionó en un micrótomó (Micrótomó de Rotación Leica RM2125) en cortes coronales de 6 μm de grosor. Se obtuvieron cuatro cortes por cada portaobjetos, teniendo un total de 5 portaobjetos por cada cerebro. Los cortes se desparafinaron en baños de xilol, xilol/alcohol, alcohol absoluto (3 ocasiones), alcohol al 96 % (3 ocasiones) y alcohol al 70%, cada uno de estos procesos de desparafinación duró 5 min; posteriormente, se tiñeron con violeta de cresilo durante 3-10min y se eliminó el exceso del colorante con un baño rápido de agua y de xilol.

Se realizó un conteo neuronal en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, así como en la corteza somatosensorial (Figura 9), utilizando para ello un microscopio fotónico (Carl Zeiss Axiolab) en un campo de 40x/0.65, un sistema con platina motorizada (Optic Scan II) y el software Image pro-plus 5.1. El número de neuronas se cuantificó a través del método fraccionario (West, 1993). El cual consiste en: la suma del número de neuronas en una fracción de volumen de cada área por el número de cortes obtenidos por el ancho de los cortes (6 μm). Posteriormente, se realizó un análisis estadístico que validó la diferencia del conteo por volumen neuronal del grupo control entre cada uno de los grupos de experimentación \pm su error estándar, para ello se utilizó la prueba t de student no pareada ($P \leq 0.05$).

Figura 9



Corte coronal del cerebro de la rata en la que se muestran las zonas de análisis histológico que se llevó a cabo. Corteza somatosensorial y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo.

Con los 9 grupos de trabajo, se realizó un diseño experimental de la siguiente forma: Los grupos 1, 2 y 3 se mantuvieron bajo Ciclo Invertido de Luz Oscuridad (CILO) 12 x 12h.

1. Grupo Control (N=5): Acceso *ad libitum* de agua y alimento; se registró la actividad EEG durante 2 h, sin manipulación farmacológica, se realizaron las glucometrías cada 30 min y posteriormente los cerebros se utilizaron para referencia en el análisis histológico.

2. Grupo Ayuno (N=5): Acceso *ad libitum* de agua, con un ayuno de 24h previo al registro de la actividad EEG (duración 2h), no se llevó a cabo manipulación farmacológica alguna, se midieron las glucometrías cada 30 min y posteriormente los cerebros se utilizaron para su análisis histológico.

3. Grupo Ayuno + Insulina (N=5): Acceso *ad libitum* de agua asociado a un ayuno de 24h previo al registro EEG. Se le aplicó 30UI de insulina i.p., se tomaron las glucometrías cada 30 min, (el registro EEG duró 2h) y posteriormente, los cerebros fueron analizados histológicamente.

Para evaluar la producción de melatonina endógena y como ésta influye en los valores de la glicemia, los animales de los grupos 4 al 9 se mantuvieron bajo una Condición de Luz Continua (CLC; 50 luxes durante 15 días) y posteriormente, se iniciaron las series experimentales.

4. Grupo Control (N=5): Acceso *ad libitum* de agua y alimento, durante 2h, se registró la actividad EEG sin alguna manipulación farmacológica, se realizaron las glucometrías cada 30 min y posteriormente, este grupo los cerebros que se utilizaron para su análisis histológico fueron considerados de referencia para los parámetros de comparación de muerte celular o protección neuronal.

5. Grupo Ayuno (N=5): Acceso *ad libitum* de agua y alimento; un ayuno de 24h previo al registro de la actividad EEG, no se realizó manipulación farmacológica, se tomo el EEG durante 2h y se midieron las glucometrías cada 30 min. Finalmente, los cerebros se utilizaron para su análisis histológico.

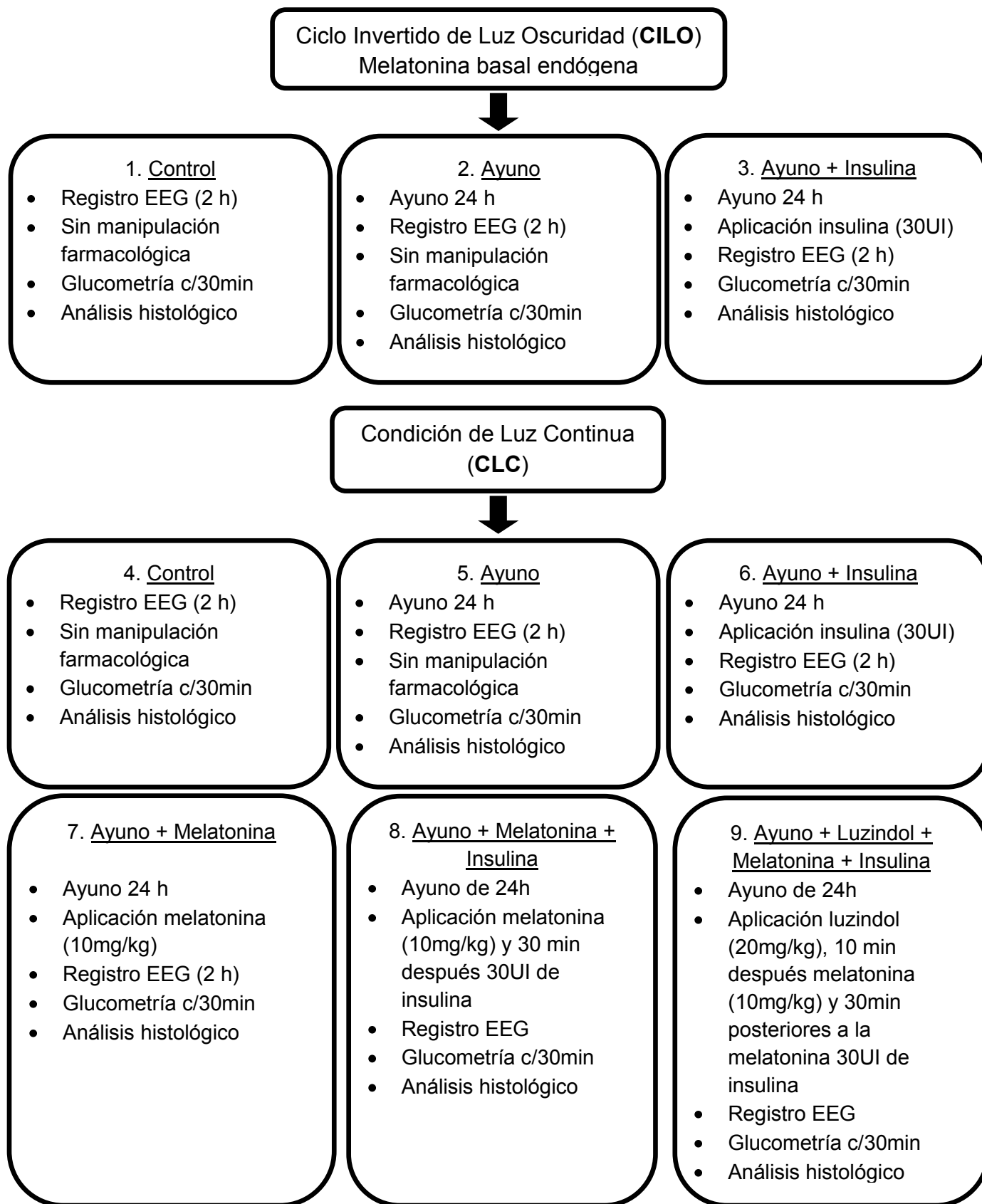
6. Grupo Ayuno + Insulina (N=5): Acceso *ad libitum* de agua; un ayuno de 24h al cual se asoció a una aplicación i.p. de insulina (30UI) para después tomar durante 2h el registro EEG previo al registro EEG. Cada 30min se tomaron las glucometrías. Los cerebros también fueron tomados para su análisis histológico.

7. Grupo Ayuno + Melatonina (N=5): Acceso *ad libitum* de agua; asociado a un ayuno de 24h y una administración i.p. de melatonina (10mg/Kg) previa al registro EEG (2h), se tomaron las glucometrías cada 30 min y posteriormente, los cerebros se emplearon para el análisis histológico.

8. Grupo Ayuno + Melatonina + Insulina (N=5): Acceso *ad libitum* de agua, asociado a un ayuno de 24h, a los que se les administró melatonina (10mg/Kg i.p.), 30min después una aplicación de 30UI i.p. de insulina. Durante las 2h de registro EEG se tomaron las glucometrías cada 30 min y posteriormente, a los cerebros se les realizó análisis histológico.

9. Grupo Ayuno + Luzindol + Melatonina + Insulina (N=5): Acceso *ad libitum* de agua y alimento. Un ayuno de 24h al cual se le asoció la administración de luzindol (20mg/Kg; i.p.), 10 min después una aplicación de melatonina (10mg/Kg; i.p.) y 30min después de esta última aplicación se le administró al animal 30UI de insulina i.p. El registro EEG duró 2h, cada 30 min se obtuvieron glucometrías, asimismo, los cerebros de estos animales fueron analizados histológicamente.

Cuadro 1. Resumen de los grupos de trabajo.



VII. Resultados

VII.1 Efecto de la aplicación de la melatonina en una condición de hipoglucemia severa sobre el EEG de la corteza frontal.

La primer serie de experimentos se orientó a identificar el efecto de la melatonina sobre la actividad basal eléctrica de la corteza cerebral, así como cuantificar el efecto de la hipoglucemia severa. Los animales se mantuvieron 15 días bajo ciclo de luz continua y previo a cualquier tratamiento farmacológico, a cada animal de experimentación, se le cuantificó la actividad EEG basal durante 15 min de la corteza frontal (CxF) y la corteza parietal (CxP). Es de hacerse notar que ningún animal presentó anomalías en su trazo EEG como espigas de gran amplitud o modificaciones en la frecuencia. Al término de la cuantificación basal, se inició el registro EEG de cada uno de los grupos durante 2 h (N=5 cada grupo).

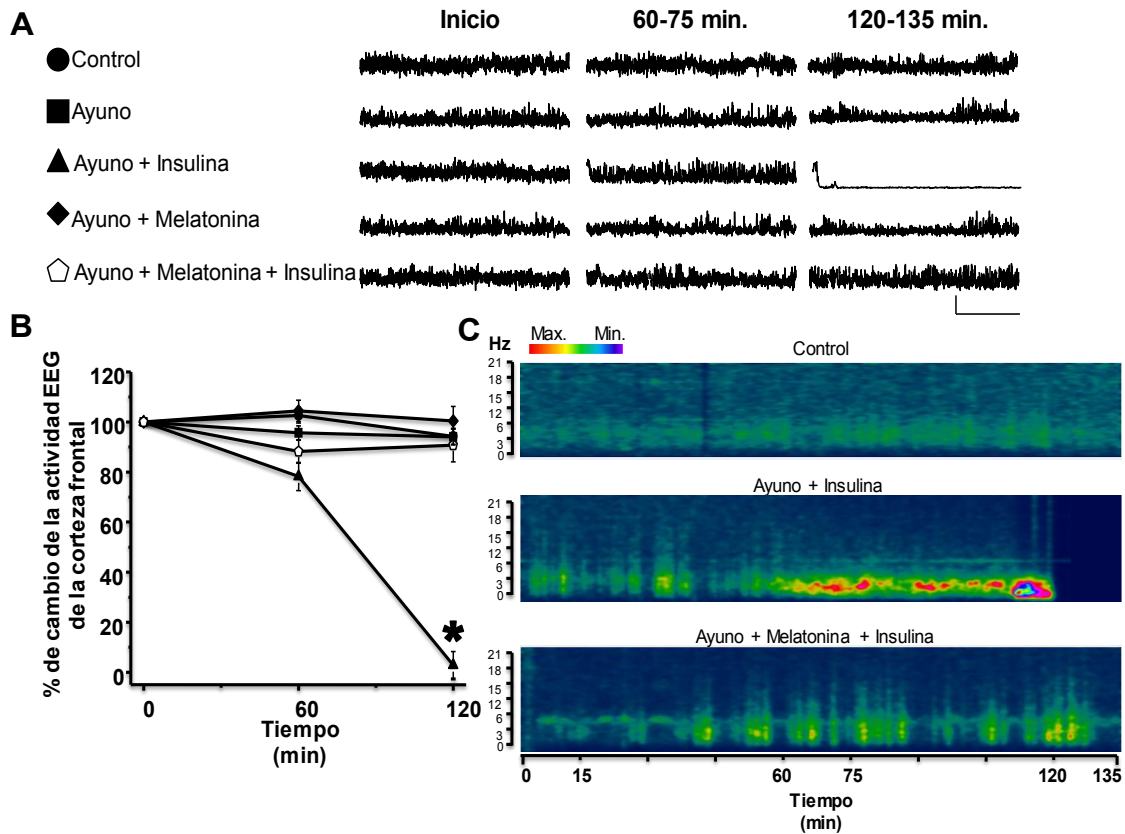
Los registros de los grupos: 1) control, 2) ayuno y 3) ayuno + melatonina, no presentaron cambios significativos en la actividad eléctrica del EEG a lo largo del curso de los experimentos (Figura 10A y 10B). La amplitud y la frecuencia de la señal EEG se mantuvieron sin modificaciones.

En contraste, en el grupo 4) de ayuno asociado a insulina para la inducción de hipoglucemia severa, a los 60 min, después de la aplicación de insulina el EEG presentó una gradual disminución de las frecuencias rápidas y un aumento de las frecuencias lentas de aproximadamente 3Hz . A los 120 min posteriores a la administración de insulina, se presentó una reducción estadísticamente significativa en la amplitud y en la frecuencia en el EEG, se cuantificó una disminución del 97% con respecto a la actividad EEG control (triángulos negros, Figura 10A y 10B; $P \leq 0.0001$).

Finalmente, en el grupo 5) la administración de melatonina previa a la aplicación de insulina mantiene la señal EEG, es decir, la actividad eléctrica cortical no disminuye, este efecto se cuantificó en el EEG de la siguiente manera: la actividad EEG no se reduce en su amplitud y en su frecuencia (pentágono, Figura 10A y 10B, $P \leq 0.001$) como fue cuantificado por la administración de

insulina sola en una condición de ayuno de 24h. Este grupo no presentó el registro isoelectrónico, la amplitud y la frecuencia en el EEG fueron semejantes a los registros de los grupos control en un 90%.

Figura 10



Efecto de la aplicación de la melatonina en una condición de hipoglucemia evaluado al EEG de la corteza frontal. A) Se muestran 15 minutos representativos de los registros EEG de inicio, a los 60 y a los 120 minutos posteriores a la aplicación de insulina o melatonina. La calibración hace referencia a $100\mu\text{V}/5\text{min}$. B) Nótese que la aplicación de insulina (triángulos negros; se grafican promedio \pm error estandar) induce una disminución significativa en la amplitud de la señal EEG, en contraste, la aplicación previa de melatonina a la inducción de hipoglucemia (pentágonos blancos) reduce la disminución de la actividad cortical, ya que el EEG se mantiene semejante a la actividad del grupo control (círculos negros; * $P \leq 0.001$). C) La figura muestra el espectro de potencia de la corteza frontal en condiciones control, de hipoglucemia severa y de ayuno + melatonina asociado a insulina. Nótese la disminución de las frecuencias rápidas y el incremento en la potencia de las frecuencias lentas, aproximadamente de 3Hz (60 min después de la administración de insulina) y la posterior reducción total del espectro de potencia (120 min posteriores a la aplicación de insulina). El incremento de las frecuencias lentas, así como la inhibición del espectro de potencia, son atenuadas por la previa administración de melatonina a la de insulina.

VII.2 Efecto de la exposición continua a luz sobre la síntesis de melatonina.

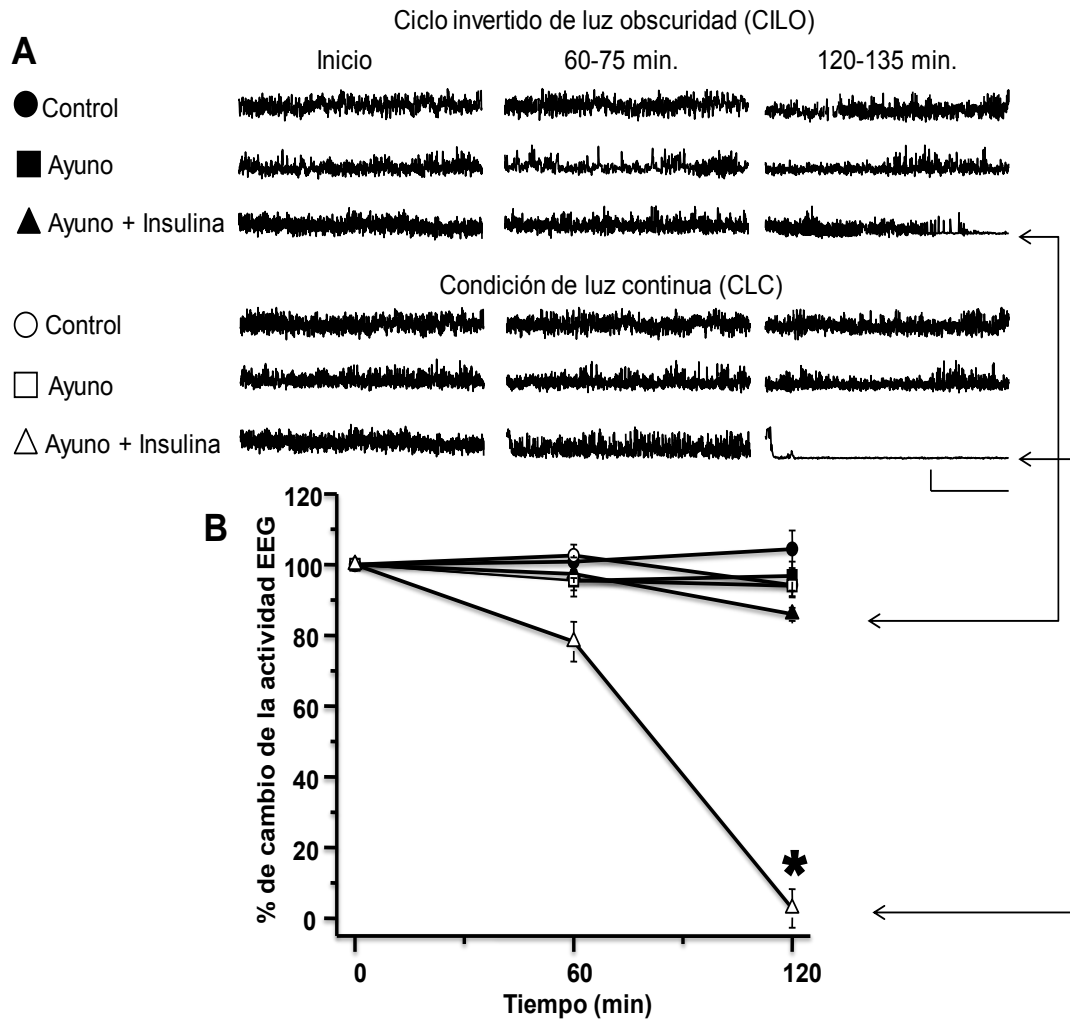
Para evaluar la producción de melatonina endógena y su impacto neurobiológico en la hipoglucemia, los animales se dividieron en 6 grupos, 3 de ellos se mantuvieron bajo un ciclo invertido de luz (CILO) 12 x 12h: 1) control, 2) ayuno y 3) ayuno + insulina, y los restantes 3 grupos estuvieron en condición de luz continua (CLC; 50 luxes) durante 15 días: 4) control, 5) ayuno y 6) ayuno + insulina, es decir, esta estrategia fue diseñada para evitar periodos de obscuridad y contrastar la síntesis y liberación de melatonina por la glándula pineal. De tal manera que los grupos CLC tienen la siguiente premisa, la producción de melatonina está reducida y en consecuencia, la hipoglucemia severa tendrá un efecto mayor en su reducción de la actividad del EEG en comparación con los grupos que estuvieron ante un periodo de obscuridad (CILO).

La actividad EEG de los grupos control (1 y 3) y de ayuno (2 y 4) de las dos diferentes condiciones de periodos de luz, no tuvo diferencias estadísticamente significativas; por ejemplo, a los 120 min después de haber iniciado el registro EEG, la amplitud promedio de los animales sometidos a un ayuno de 24 h bajo CILO, fue de $94\mu\text{V}$, lo cual representa un $94\pm 7\%$ de la actividad basal, comparándolo con los animales en ayuno en CLC la amplitud promedio fue de $96\mu\text{V}$ lo cual representa una actividad del $96\pm 9\%$, ($P\leq 0.6$; Figura 11, cuadros. Tabla 1) es decir, mantener a un animal en luz constante no difiere de ponerlo en un ciclo de luz/obscuridad, en condiciones basales o de una hipoglucemia moderada, el EEG es semejante en frecuencia y amplitud de su actividad (Figura 11A y 11B, círculos y cuadros).

En contraste, los animales con hipoglucemia severa (ayuno + insulina) que estuvieron sometidos a CLC si mostraron diferencias significativas en su frecuencia y en su amplitud de las ondas de su EEG, comparados con el grupo de hipoglucemia severa pero en condiciones CILO. Por ejemplo, a los 120 min de haberse iniciado el registro, los animales con hipoglucemia severa en CLC la amplitud promedio de la señal del EEG fue de $3\pm 1\mu\text{V}$, sin embargo, en estas mismas condiciones metabólicas el grupo mantenido en CILO presentó una amplitud promedio de $87\pm 4\mu\text{V}$, es decir, se cuantificó una reducción del 96% de

la actividad eléctrica cortical entre estos dos grupos ($P \leq 0.0001$; Figura 11 triángulos). Estos resultados indican que la luz continua (CLC) impacta negativamente en la señal del EEG en condiciones de hipoglucemia severa. El grupo en CILO conserva la amplitud y la frecuencia en condiciones de hipoglucemia severa, la señal del EEG no desaparece. Por lo que se sugiere que la síntesis y la liberación de melatonina por la glándula pineal se ve reducida por la exposición continua a luz (CLC), es decir, el CILO que tiene periodos de oscuridad permite la formación de melatonina y en consecuencia el efecto de la hipoglucemia a nivel EEG es menor comparado con el grupo de animales que no tuvo un periodo de síntesis de melatonina.

Figura 11



Efectos de la luz continua (CLC 15 días) y ciclo invertido (CILO) sobre el EEG. A) Ejemplos representativos de registros a una velocidad de muestreo de 100 Hz, en tres condiciones, en los casos de control (círculos) y ayuno (cuadrados): 15, 60 y 120 min después del inicio del registro. En el caso de los grupos de ayuno asociado a insulina (triángulos) los tiempos representan los minutos después de la aplicación de insulina. Nótese que en la hipoglucemia severa asociada a CLC se cuantificó la aparición de una línea isoelectrónica con ausencia de actividad cortical (triángulos blancos). B) Gráfica de los cambios cuantitativos entre los grupos de CLC y CILO. Bajo condiciones control y en ayuno, la actividad de la corteza cerebral no tiene cambios importantes, en contraste, los animales que estuvieron en CLC en condiciones de hipoglucemia severa son los que muestran una disminución significativa de la actividad en el EEG (* $P \leq 0.0001$).

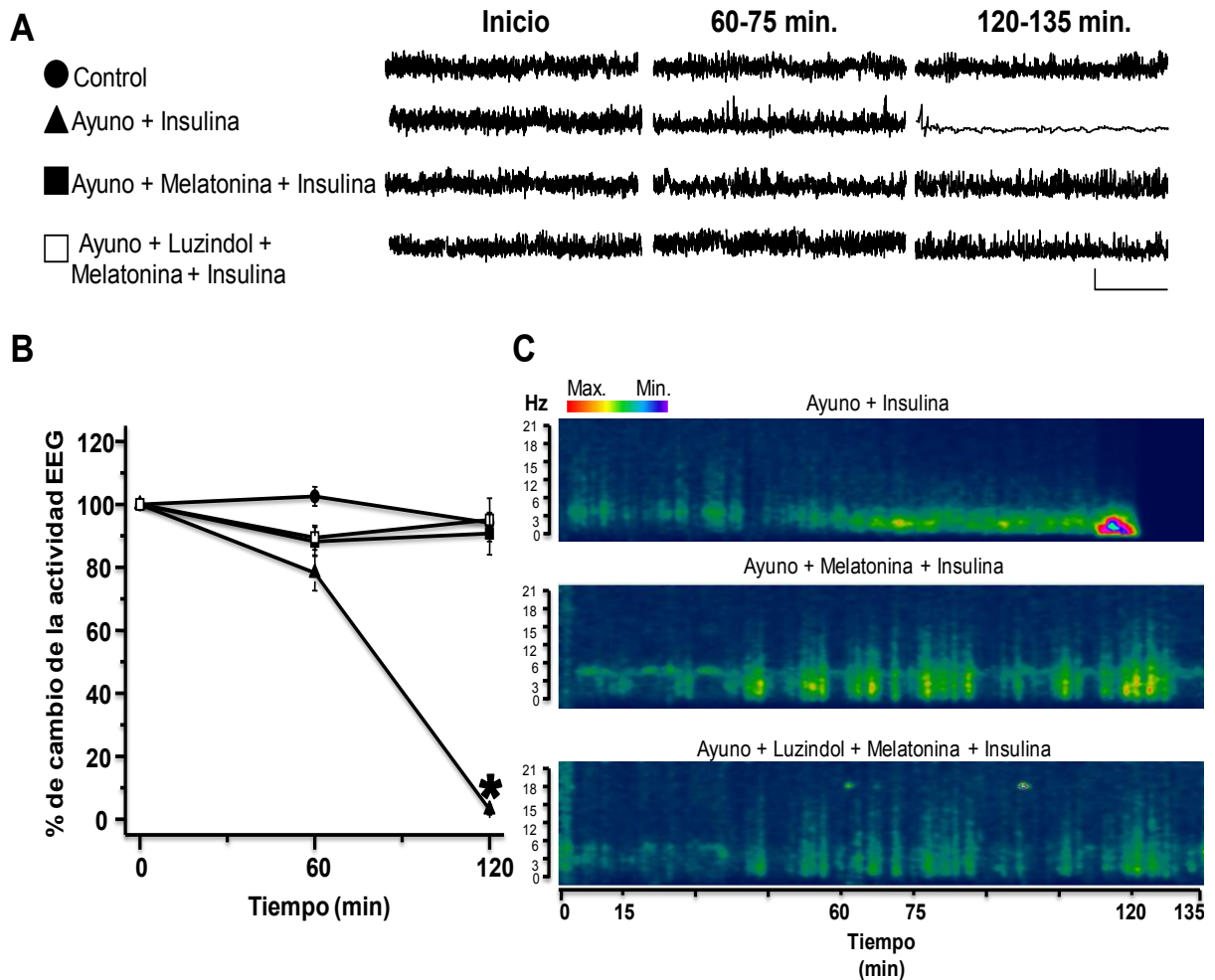
VII.3 Efecto de la aplicación de la melatonina en una condición de hipoglucemia severa: efecto sobre el EEG independiente de la activación de sus receptores membranales.

En relación a los resultados anteriores, hemos identificado que la aplicación de melatonina es capaz de reducir el impacto negativo de la hipoglucemia en la actividad cuantificada del EEG. En virtud de este hallazgo, los siguientes experimentos fueron encaminados para conocer si esta actividad farmacológica es dependiente de la interacción entre la melatonina y sus receptores membranales o por la captura de radicales libres que tiene esta hormona.

Por esta razón, en la siguiente serie de experimentos se administró luzindol, un antagonista de los receptores de melatonina (MT₁ y MT₂), a una dosis de 20 mg/Kg vía i.p; 10 minutos previos a la aplicación de la melatonina.

Los resultados de este grupo identificaron que el luzindol no modifica la actividad EEG que exhibe la melatonina (Figura 12, cuadros blancos), la amplitud promedio de la actividad del EEG fue de $95 \pm 2 \mu\text{V}$, con respecto al grupo de aplicación de melatonina asociada a ayuno/insulina que fue de $90 \pm 6 \mu\text{V}$, en contraste, en condiciones de hipoglucemia severa la amplitud promedio fue de $3 \pm 1 \mu\text{V}$, estos valores fueron obtenidos 120 min después de la aplicación de insulina, es decir, se cuantificó una reducción solo del 7% entre la actividad eléctrica cortical del grupo control con respecto de la actividad del grupo que recibió luzindol previo a las manipulaciones farmacológicas. La protección que presenta la melatonina ante una hipoglucemia severa no es bloqueada por el luzindol. En resumen, el bloqueo de los receptores de melatonina por el luzindol no cambia la actividad eléctrica que exhibe la melatonina en el registro EEG (cuadros blancos, $P \leq 0.0009$). Lo cual sugiere que el efecto EEG de la melatonina es a través de la captura de radicales libres. Investigaciones previas como las de Dubocovich et al., (2010) y Hong et al., (2010); afirman que el efecto neuroprotector de la melatonina es inducido por la captura de radicales libres, un efecto independiente de la actividad de sus receptores de membrana asociados a proteínas G.

Figura 12

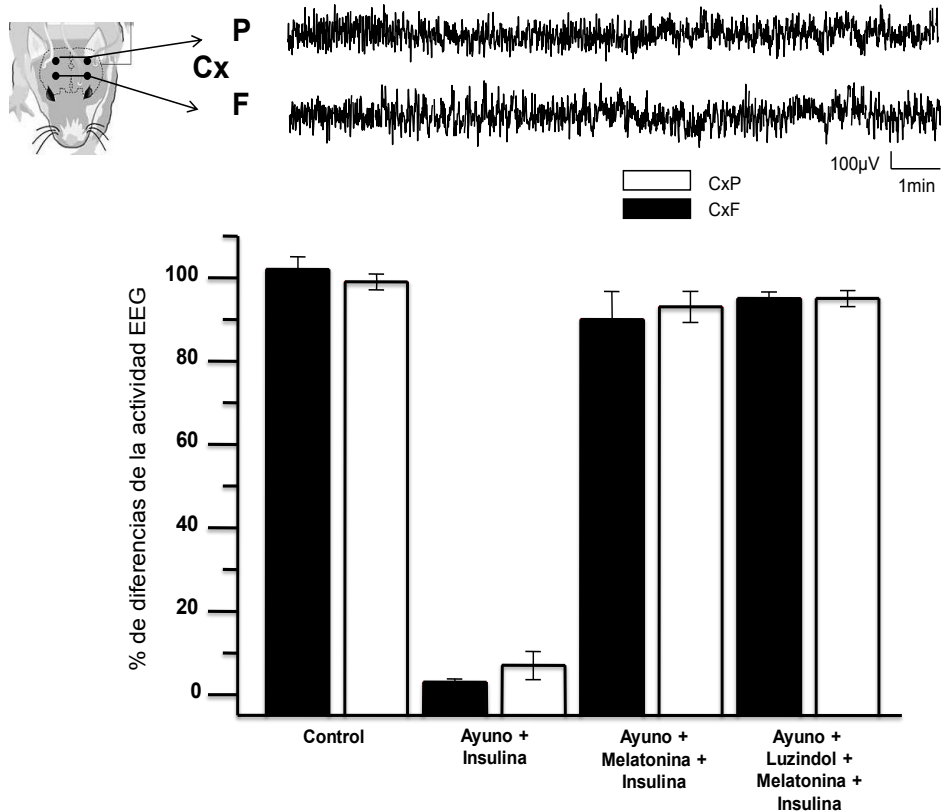


El luzindol no modifica el efecto sobre la actividad EEG de la melatonina. A) Se muestran 15 minutos representativos de los registros EEG al inicio y a los 60 y 120 min posteriores a la administración de insulina. B) La administración de luzindol previa a la aplicación de melatonina (cuadros blancos) no tiene efectos significativos sobre la actividad que muestra la aplicación de melatonina durante la hipoglucemia severa (cuadros negros; $P \leq 0.1$), lo cual, indica que el efecto en el EEG de la indolamina, no es a través de receptores de membrana. En contraste, el grupo de hipoglucemia severa (triángulos negros) muestra claramente una importante disminución en la actividad cortical ($P \leq 0.0009$). C) La figura muestra el espectro de potencia de la corteza frontal. A partir de los 60 min de registro EEG posteriores a la aplicación de insulina se puede observar una disminución de las frecuencias rápidas y un incremento en la potencia de las frecuencias lentas, así como a los 120 min, una inhibición del espectro de potencia. En contraste, en el grupo que recibió la administración de melatonina previa a la insulina, se puede observar que el incremento de las frecuencias lentas es atenuado y la inhibición del espectro de potencia es totalmente suprimida. Del mismo modo, la administración de luzindol previa a la aplicación de melatonina no disminuye las frecuencias rápidas, ni aumenta las frecuencias lentas significativamente sobre el espectro de potencia, durante la posterior administración de insulina.

VII.4 Los efectos sobre el EEG de la corteza frontal y de la parietal ante la administración de melatonina y durante la hipoglucemia severa.

En condiciones de ayuno y 120 min después de la aplicación de insulina, la actividad EEG disminuye en su amplitud y frecuencia en forma significativa (Figura 12, triángulos negros), es de hacerse notar que en un análisis cuantitativo de la actividad del lóbulo frontal con respecto del lóbulo parietal, los cambios en la señal EEG por cualquiera de los tratamientos previamente descritos no exhiben diferencias estadísticamente significativas entre estos dos lóbulos cerebrales, es decir, que la disminución de la señal eléctrica inducida por la hipoglucemia severa en la corteza frontal (CxF) tuvo valores de $3 \pm 1 \mu\text{V}$ con respecto a la corteza parietal (CxP) que exhibió valores de $7 \pm 3.3 \mu\text{V}$. En el caso de los efectos EEG de reversión de la hipoglucemia severa por la melatonina, los valores en la CxF tuvieron una amplitud promedio de $90 \pm 6 \mu\text{V}$, con respecto a los cuantificados en la CxP ($93 \pm 3 \mu\text{V}$); finalmente, la asociación de la administración de luzindol y melatonina, no difiere en su potencia entre ambas cortezas, así por ejemplo, CxF ($95 \pm 2 \mu\text{V}$) fue semejante a los valores de CxP ($95 \pm 1.6 \mu\text{V}$; Figura 13).

Figura 13



Actividad EEG (panel superior) a los 120 min posteriores al inicio o a la aplicación de insulina, entre la corteza frontal (CxF) y la corteza parietal (CxP) en diferentes grupos. Los cambios en la actividad entre ambas cortezas cerebrales no tienen diferencias significativas.

VII.5 La melatonina modifica la reducción de los niveles de la glucosa sanguínea durante la hipoglucemia severa.

Los experimentos anteriores arrojaron evidencias de que la melatonina induce un efecto de reversión del daño cuantificado en el EEG por hipoglucemia severa y que este efecto es independiente de la actividad de sus receptores de membrana. Investigaciones recientes afirman que la melatonina influye en la homeostasis de la glucosa y en la regulación del balance energético en los mamíferos (Robeva et al., 2008). Sin embargo, se conoce poco el efecto metabólico de la melatonina. Es posible que la melatonina ejerza cambios en los niveles de glucosa antes de ejercer la captura de radicales libres en el SNC. Con

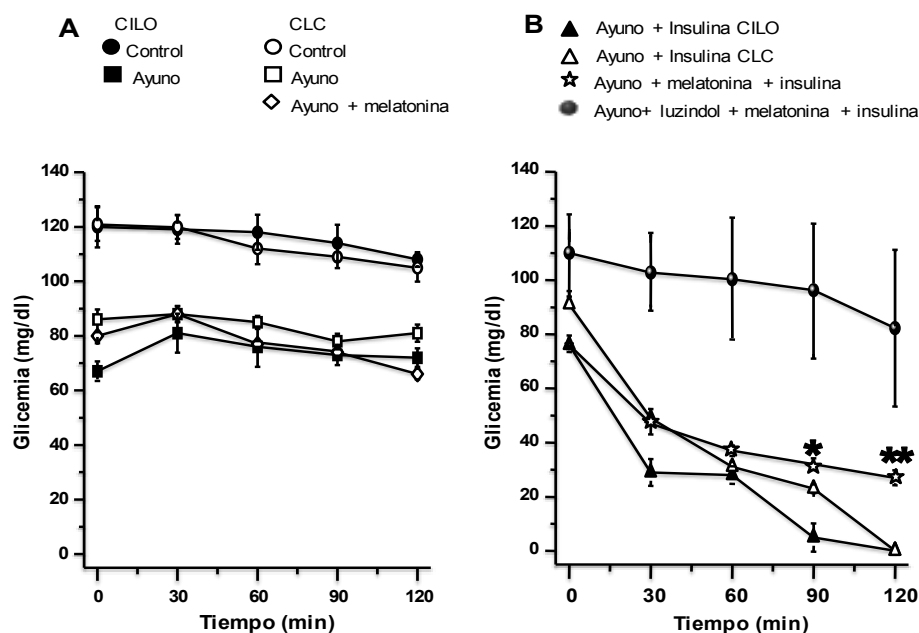
el propósito de resolver 2 cuestionamientos asociados a estos eventos, se planteo lo siguiente: 1) ¿qué le sucede a los niveles de glucosa en sangre de un animal al que se le administra melatonina previa a la hipoglucemia? y 2) en el caso de realizar modificaciones a la glicemia, ¿la administración de luzindol bloquea el efecto de melatonina?. Para dar respuesta a esto, se realizaron los siguientes experimentos: a todos los animales del estudio se les cuantificó la glucosa plasmática cada 30 min durante las 2 h de registro EEG.

En los grupos control (CILO y CLC), los valores de glucemia durante los 120 min de registro EEG fueron 116 ± 4 mg/dL y 113 ± 4 mg/dL respectivamente, los cuales no tienen diferencias estadísticamente significativas entre ellos (círculos, Figura 14A). Sin embargo, en los grupos ayuno (CILO y CLC; cuadros, Figura 14A) los valores de glucosa son menores a los cuantificados en los grupos control, en esta condición de 24 h de privación de alimento los valores fueron 74 ± 5 mg/dL y 84 ± 5 respectivamente. La aplicación de melatonina en condiciones de ayuno en CLC fue de 78 ± 1 mg/dL (rombos, Figura 14A). Es decir, que el ayuno reduce un 30% la glucosa basal y que los ciclos de luz (invertido y continuo) así como la aplicación de melatonina en ayuno no influyen en los niveles de glicemia.

Los grupos con hipoglucemia severa (ayuno + insulina), en condiciones CILO y CLC (triángulos, Figura 14B) muestran la caída de la pendiente en los valores de glucosa a partir de los 30 min después de haber aplicado insulina, en promedio 29 y 49 mg/dL, respectivamente, en una evolución del seguimiento de los niveles de glucosa a los 90 min la reducción es estadísticamente significativa 5.2 ± 5 mg/dL y 24 ± 1 mg/dL ($P \leq 0.01$). Asimismo a los 120 min después de la aplicación de insulina los valores de glucosa se reducen dramáticamente a 0mg/dL. Es necesario resaltar el hallazgo, en el que la aplicación de melatonina en estas condiciones, los niveles de glucosa no se reducen radicalmente. La melatonina, cambia la pendiente de caída de la glucosa plasmática, a los 90 min, después de haber aplicado la insulina, en este grupo se obtuvo un valor promedio de 32 ± 2 mg/dL y a los 120 min los valores promedio fueron: 27 ± 2 mg/dL (estrellas, Figura 14B). Es decir, que la aplicación de melatonina evita que los niveles de glucosa colapsen a valores bajos ($P \leq 0.0006$; Tabla 1). El luzindol es un

antagonista competitivo de los receptores de melatonina, sus efectos farmacológicos son complejos en tejidos no neuronales (Dubocovich et al., 2010). De acuerdo a nuestros resultados, y en forma sorprendente, la administración de luzindol + melatonina después de haber aplicado insulina, la caída de la pendiente de los niveles de glucosa plasmática disminuye, los valores se mantienen en un rango de 98 ± 18 mg/dL (esferas negras, Figura 14B).

Figura 14



A) En condiciones control, independientemente de los ciclos de luz (CILO y CLC) los niveles de glicemia son estables (círculos negro y blanco respectivamente, no hay diferencias significativas entre estos grupos; se grafica el promedio \pm error estandar), de la misma forma la condición de ayuno (cuadrados) y la aplicación de melatonina (rombos) mantiene los niveles de glicemia en un 30% menor pero estable que los grupos control (la validación estadística indica que no hay diferencia entre los valores en ayuno). B) Se muestra la pendiente de descenso de los niveles de glucosa en la sangre. Los triángulos negros indican la aplicación de insulina en ayuno bajo un CILO, en tanto que los triángulos blancos indican las mismas condiciones metabólicas pero en una CLC. La pendiente se inicia en valores cercanos a 80 mg/dl y en un periodo de 2 h, las cifras caen a valores de 0 mg/dl. En contraste, la administración de melatonina (estrella), reduce la caída de los niveles de glucosa en sangre, 90 y 120 min después de aplicar insulina los valores son en promedio de 32 mg/dl (* $P \leq 0.01$; comparando el grupo ayuno + insulina en CILO) y 27 mg/dl (** $P \leq 0.0006$; comparando con ambos grupos de ayuno + insulina) respectivamente. La aplicación de luzindol y melatonina también modifican la caída de la pendiente de los niveles de glucosa (esferas negras), sin embargo, no se consideraron diferencias significativas en comparación de este grupo con cualquier otro.

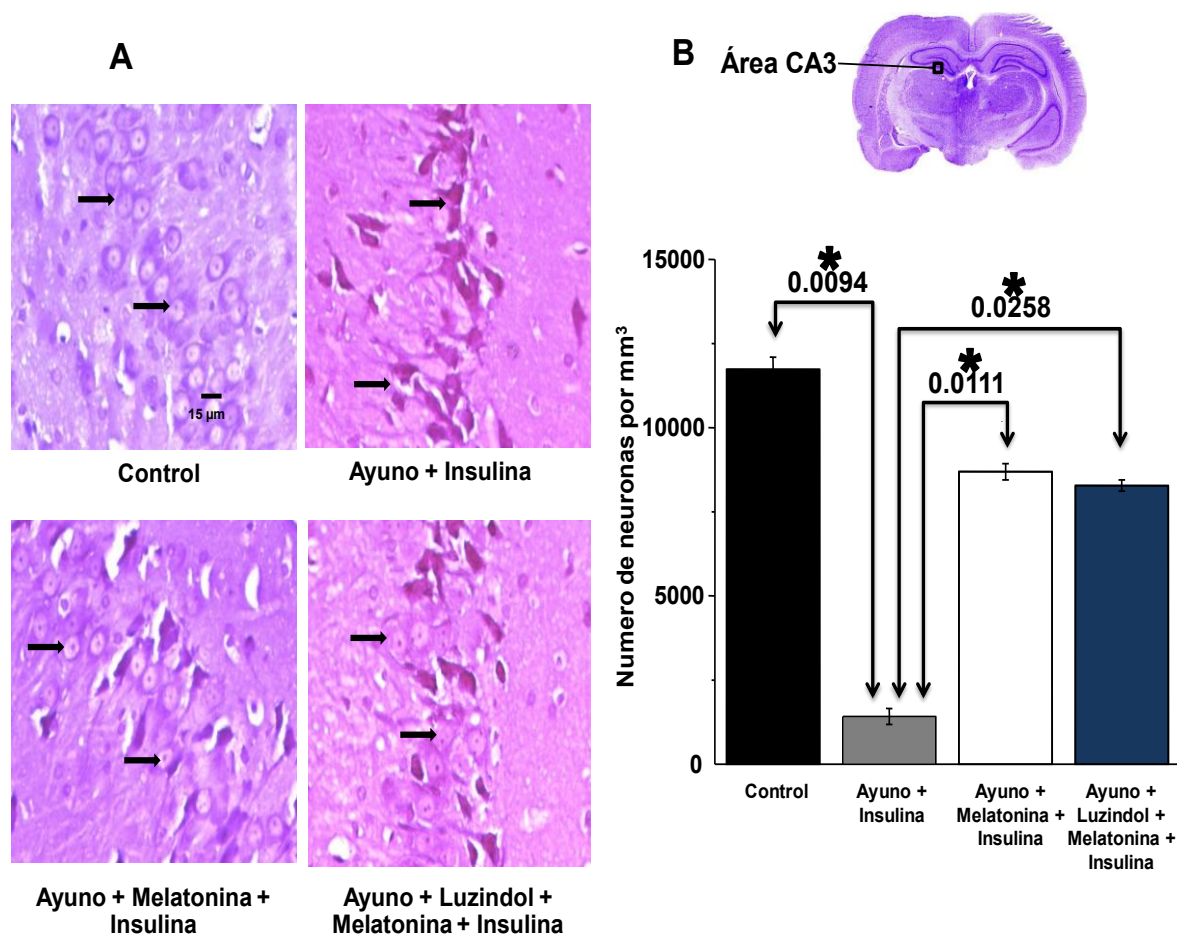
VII.6 Neuroprotección en el área CA3 del hipocampo.

En la primera serie de experimentos de esta tesis registramos el EEG de la corteza cerebral e identificamos los cambios que se presentan después la aplicación de la melatonina en la hipoglucemia severa. Nuestro siguiente propósito fue cuantificar histológicamente el efecto neuroprotector de la melatonina contra la muerte neuronal inducida por la reducción de la glucosa plasmática, en cortes coronales de $6\mu\text{m}$ de grosor. Para este propósito se realizó un conteo celular del área CA3 del hipocampo, se eligió esta estructura subcortical como estudio inicial de análisis histológico debido a que la mayoría de sus neuronas están densamente empaquetadas dentro de una sola capa y en particular suelen ser altamente susceptibles a procesos como la excitotoxicidad, la inflamación y al daño celular inducido por la privación de glucosa.

En el área CA3 del hipocampo en el grupo control (CLC), se cuantificaron $11,736\pm 360$ cuerpos neuronales por mm^3 respectivamente; las neuronas mostraron una relación núcleo con respecto al soma 0.2 (valores normales), asimismo una homogeneidad en la membrana celular y en el citoplasma sin alteraciones anatómicas son identificables en este grupo (Figura 15). En contraste, en el grupo de ayuno asociado a insulina, en el que: hay una disminución de la actividad EEG y los valores de glucosa alcanzan valores de 0 mg/dL; se cuantificaron $1,416\pm 240$ neuronas por mm^3 , es decir, un 87% menor que en las condiciones control (Figura 15). Asimismo, el análisis histológico de los cerebros de los animales en los que se administró melatonina en forma previa al evento hipoglucémico, permitió identificar que existe un efecto protector de la melatonina contra la muerte neuronal, en estas condiciones experimentales el número de neuronas por mm^3 es estadísticamente diferente al grupo de hipoglucemia severa: $8,688\pm 240$ neuronas ($P<0.01$; Figura 15). Debido a que previamente habíamos demostrado que el luzindol no modificaba los efectos EEG de la melatonina y que incluso evitaba la caída de los niveles de glucosa, el análisis celular de los cerebros de estos animales, también permiten identificar que el número de neuronas no es estadísticamente diferente a las cuantificadas en el grupo que recibió melatonina: 8280 ± 168 neuronas por mm^3 . Lo anterior sugiere que: 1)

existe un correlato anatómico e histológico del cerebro con los eventos electrofisiológicos asociado a los niveles de glucosa en sangre, y 2) el efecto neuroprotector de la melatonina en el área CA3 es debido a la captura de radicales libres e independiente de la actividad de los receptores de melatonina.

Figura 15



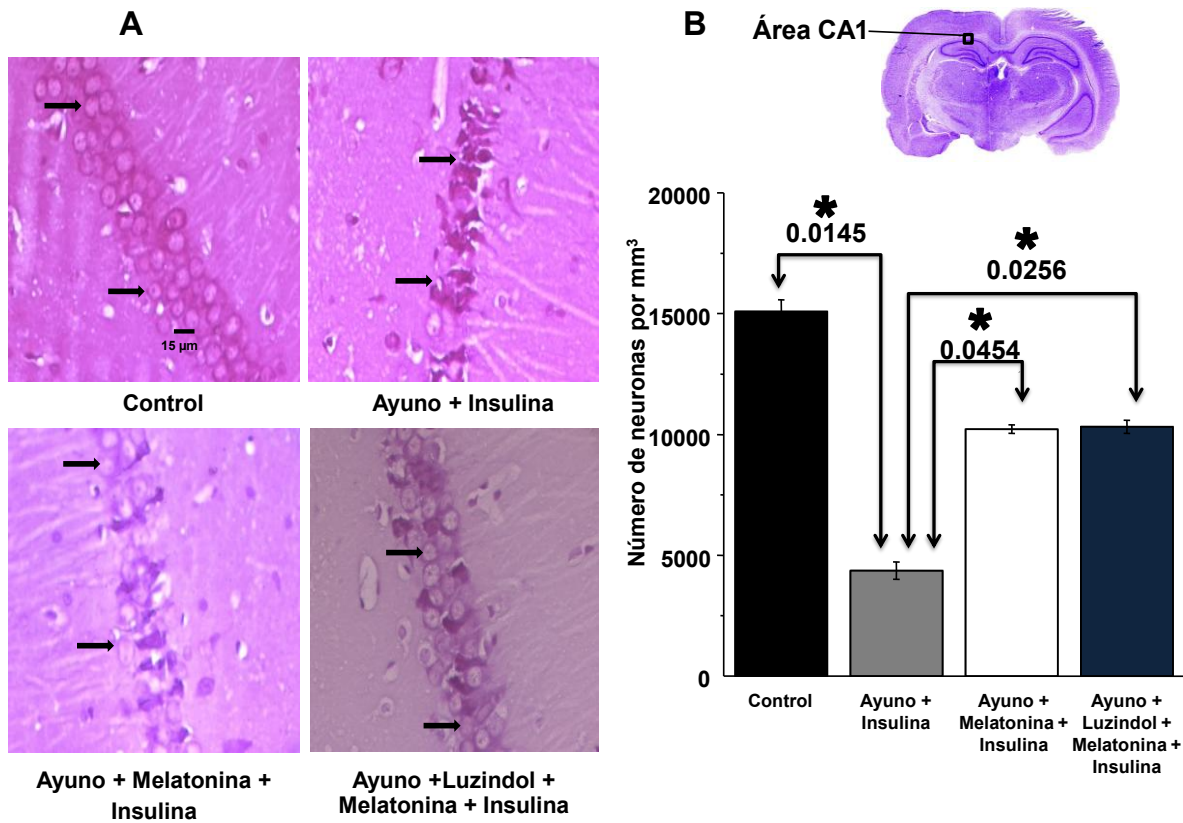
Efecto neuroprotector de la melatonina contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia en el área CA3. A) Panel de la izquierda, micrografías de esta área del hipocampo mostrando las características histológicas que se cuantificaron en las barras. Las flechas indican los cuerpos neuronales sanos en el caso del grupo control, melatonina y melatonina + luzindol; y en el caso de ayuno + insulina, las neuronas lesionadas por esta condición. B) Panel de la derecha, nótese, una reducción estadísticamente significativa del grupo con hipoglucemia severa (barra gris) con respecto al número de neuronas cuantificadas en el grupo control en CLC (barra negra) y con los grupos que recibieron melatonina (barra blanca) y a la asociación de luzindol y melatonina (barra azul), la melatonina protege contra el daño neuronal. El valor de P esta marcado por el asterisco.

VII.7 Neuroprotección en el área CA1 del hipocampo.

El hipocampo constituye un excelente circuito neuronal funcional, cuya integración sináptica se conoce con detalle: las neuronas piramidales del área CA1 reciben las aferencias excitadoras de las neuronas del área CA3; diversas investigaciones señalan que las neuronas piramidales de CA1 también son vulnerables como las del área CA3 al daño celular por hipoxia, hipoglucemia y neurodegeneración (Wang y Michaelis, 2010; González et al., 2007). La hipoglucemia genera daño neuronal significativo en esta área del hipocampo aun mayor que condiciones de anoxia (Suh et al., 2007). De esta manera, en la secuencia del estudio histológico de esta tesis, también realizamos un conteo neuronal de CA1 en los cerebros de los animales que previamente se les registró el EEG, para corroborar anatómicamente el efecto de la hipoglucemia y la neuroprotección de la melatonina.

En los cortes de los cerebros provenientes de los animales del grupo control (en CLC y acceso libre a comida) se contabilizaron en CA1 un total de $15,096 \pm 480$ neuronas por mm^3 (barra negra, Figura 16). A diferencia, el grupo de animales a los que se les indujo la hipoglucemia severa, en el área CA1 se cuantificaron $4,368 \pm 360$ neuronas por mm^3 , lo que corresponde a una disminución del 71% de la población neuronal de esta área comparada con las condiciones control (barra gris, Figura 16). En contraste, la administración previa de melatonina a la condición hipoglucémica reduce significativamente la pérdida neuronal, se cuantificaron $10,224 \pm 172$ cuerpos neuronales por mm^3 (barra blanca; Figura 16, $P < 0.04$). Estas evidencias anatómicas sugieren una neuroprotección también del área CA1 inducida por melatonina. Sin embargo, la administración de luzindol previo a la melatonina y bajo condiciones del efecto de insulina, el número de cuerpos neuronales es semejante al cuantificado del grupo que recibió melatonina sola: $10,320 \pm 271$ neuronas por mm^3 , es decir, el bloqueo de los receptores membranales de melatonina no modifica la neuroprotección de esta indolamina, lo cual sugiere que este efecto neuroprotector se debe a la captura de radicales libres y no por su interacción con sus receptores (barra azul, Figura 16; ver Tabla 1).

Figura 16



Efecto neuroprotector de la melatonina contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia en el área CA1. A) Panel de la izquierda, se detallan las microfotografías del área CA1 del hipocampo, mostrando las características histológicas que se cuantificaron en las barras. Las flechas indican los cuerpos neuronales sanos en el caso del grupo control, melatonina y melatonina + luzindol; y en el caso de ayuno + insulina, las neuronas lesionadas por esta condición. B) En el panel de la derecha se muestra una reducción estadísticamente significativa del grupo con hipoglucemia severa (barra gris) con respecto al número de neuronas cuantificadas en el grupo control (barra negra) y con los grupos que recibieron melatonina (barra blanca) y a la asociación de luzindol y melatonina (barra azul), es decir, la melatonina protege contra la pérdida neuronal en esta área del hipocampo. El valor de P está marcado por el asterisco.

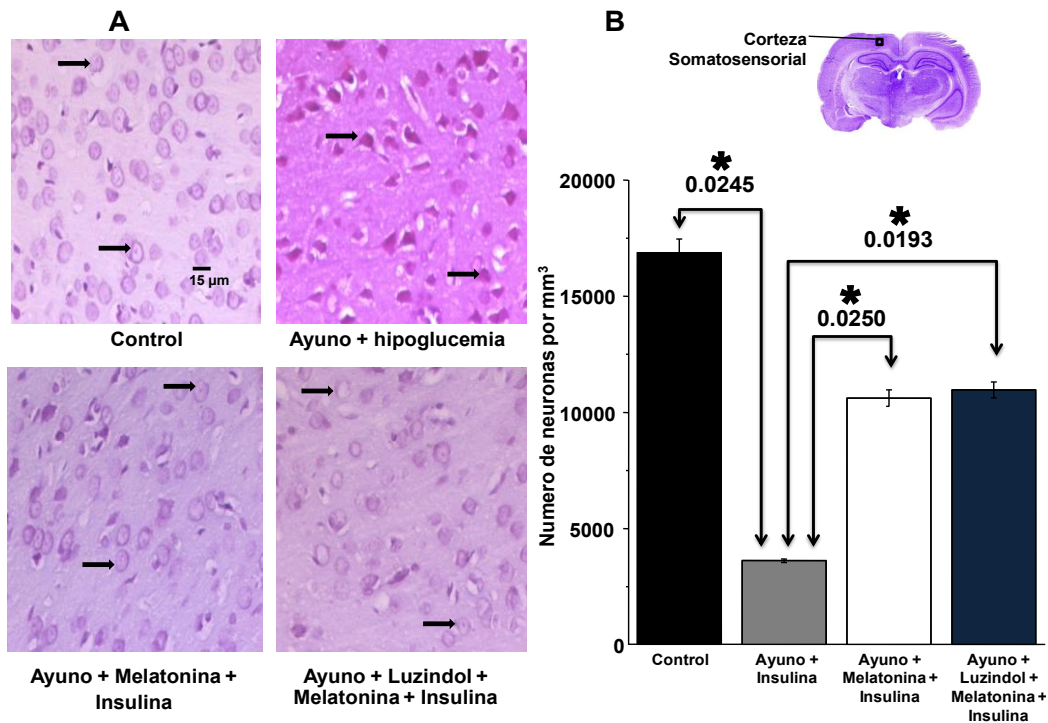
VII.8 Neuroprotección en la corteza somatomotora inducida por melatonina.

Bajo la premisa de que la información procedente del hipocampo proyecta en forma aferente a varias estructuras entre ellas la corteza cerebral, hemos corroborado que sus áreas CA1 y CA3 fueron afectadas negativamente por la hipoglucemia severa, de la misma forma que el daño neuronal fue revertido por la aplicación de melatonina. El estudio histológico de la corteza cerebral en esta tesis obedece también a que estudios previos indican que las neuronas piramidales de las láminas II, III y V de la corteza cerebral del área somatomotora también presentan una alta vulnerabilidad al daño y muerte celular por diversos insultos celulares como la hipoxia, la hipoglucemia y la neurodegeneración (García et al., 2008; Suh et al., 2007).

Semejante a lo que sucede en el hipocampo, el análisis histológico de la corteza cerebral de los animales del grupo control (acceso libre a comida y en CLC) permitió cuantificar un promedio de $17,064 \pm 600$ neuronas por mm^3 (barra negra, Figura 17). Estos datos contrastan en el grupo de animales en condiciones de hipoglucemia severa, en la corteza somatosensorial de los animales que recibieron insulina en un estado de ayuno, la población neuronal se ve reducida en un 78%; la muerte neuronal es significativa, se identificaron $3,648 \pm 72$ cuerpos neuronales por mm^3 (barra gris, $P < 0.02$, Figura 17). Asimismo, es posible contrastar el efecto neuroprotector de la melatonina en la corteza cerebral: la aplicación previa de la hormona a la hipoglucemia severa reduce el daño tisular, en estas condiciones se contaron $10,728 \pm 360$ cuerpos neuronales por mm^3 (barra blanca, Figura 17).

Finalmente, el análisis histológico de la corteza cerebral del grupo de animales a los que se les administró el antagonista de los receptores membranales de melatonina, luzindol, previo a la aplicación de melatonina y bajo condiciones del efecto de insulina (barra azul, Figura 17), el número de cuerpos neuronales cuantificado fue de 11088 ± 348 neuronas por mm^3 . Nuevamente, el bloqueo de los receptores membranales de melatonina no modifica la neuroprotección, lo cual refuerza la premisa de que este efecto neuroprotector se debe a la captura de radicales libres.

Figura 17



Efecto neuroprotector de la melatonina contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia en la corteza somatosensorial. A) A la izquierda de la figura, se pueden observar las micrografías de la corteza somatosensorial, mostrando las características histológicas que se cuantificaron en las barras. Las flechas indican los cuerpos neuronales sanos en el caso del grupo control, melatonina y melatonina + luzindol; y en el caso de ayuno + insulina, las neuronas lesionadas por esta condición. B) En el panel de la derecha se muestra en gráficas de barras la disminución estadísticamente significativa del grupo con hipoglucemia severa (barra gris) con respecto al número de neuronas cuantificadas en el grupo control (barra negra) y con los grupos que recibieron melatonina (barra blanca) y a la asociación de luzindol/melatonina (barra azul). La melatonina exhibe neuroprotección en esta área del cerebro. El asterisco marca el valor de P.

TABLA 1	Controles		Ayuno		Ayuno + Insulina		Ayuno + Melatonina	Ayuno + Melatonina + Insulina	Ayuno + Luzindol + Melatonina + Insulina
	CILO	CLC	CILO	CLC	CILO	CLC	CLC	CLC	CLC
1. EEG amplitud promedio (μV ; 120 min)	104 \pm 5	102 \pm 3	94 \pm 7	96 \pm 9	87 \pm 4	3 \pm 1 <i>*P\leq0.0001</i> (comparado con CLC control)	100 \pm 6	90 \pm 6 <i>**P\leq0.001</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>	95 \pm 2 <i>***P\leq0.0009</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>
2. Glucosa mg/dL (120 min)	108 \pm 2	103 \pm 4	72 \pm 5	81 \pm 4	0 \pm 0	0 \pm 0 <i>*P\leq0.0001</i> <small>(comparado con CLC control)</small>	71 \pm 9	27 \pm 2 <i>**P\leq0.0006</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>	82 \pm 28 <i>***P\leq0.06</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>
3. Neuronas por mm ³									
Área CA3 del hipocampo	11904 \pm 840	11736 \pm 360	11856 \pm 240	11640 \pm 240	6024 \pm 300	1416 \pm 240 <i>*P\leq0.0094</i> <small>(comparado con CLC control)</small>	11424 \pm 360	8688 \pm 240 <i>**P\leq0.011</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>	8280 \pm 168 <i>***P\leq0.025</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>
Área CA1 del hipocampo	15120 \pm 360	15096 \pm 480	14832 \pm 480	14880 \pm 720	7800 \pm 288	4368 \pm 360 <i>*P\leq0.0145</i> <small>(comparado con CLC control)</small>	14856 \pm 432	10224 \pm 172 <i>**P\leq0.045</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>	10320 \pm 271 <i>***P\leq0.025</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>
Corteza Somatosensorial	18840 \pm 1032	17054 \pm 600	17640 \pm 840	16944 \pm 480	9600 \pm 524	3648 \pm 72 <i>*P\leq0.0245</i> <small>(comparado con CLC control)</small>	17064 \pm 480	10728 \pm 360 <i>**P\leq0.025</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>	11088 \pm 348 <i>***P\leq0.019</i> <small>comparado con CLC ayuno + insulina</small>

Tabla 1. Resumen de resultados (media \pm error estándar) entre los grupos experimentales (120 min) en las 3 distintas técnicas empleadas: 1) registro EEG, 2) medición de los cambios de la glucosa plasmática y 3) análisis histológico.

VIII Discusión

VIII.1 Neuroprotección y melatonina

La presente tesis es un estudio secuencial de tres enfoques complementarios e interdependientes: electrofisiológico, histológico y metabólico (tabla 1). La línea general de este trabajo fue demostrar la susceptibilidad de inducir protección contra de la muerte neuronal, por la administración previa de melatonina a un evento hipoglucémico.

La muerte neuronal inducida por hipoglucemia se caracteriza en un EEG por una disminución significativa en la actividad eléctrica de la corteza cerebral, este evento está representado por la aparición inicialmente de una reducción en la amplitud que evoluciona a la aparición de una señal isoelectrica. En forma heurística, se sugiere que este evento bioeléctrico está relacionado directamente con procesos de estrés oxidativo, de excitotoxicidad, de inflamación y de apoptosis. Es decir, que el colapso metabólico, la caída de ATP, son la causa de los cambios en el EEG. Cuantificamos a nivel EEG la inducción de muerte neuronal de la corteza cerebral por hipoglucemia, la cual tiene una latencia promedio de 120 min después de la administración de insulina.

La melatonina, hormona capaz de reducir el daño celular, evita a los 120 min la aparición del registro isoelectrico, evita la disminución de la actividad EEG, mantiene la frecuencia y la amplitud en el trazo EEG similar a la condición control (Figura 10; Tabla 1). Estos datos nos permiten sugerir que este efecto neuroprotector es inducido mediante la disminución del estrés oxidativo, excitotoxicidad, inflamación y apoptosis. En virtud de lo anterior, se fortalece los efectos que previamente se le atribuyen a la melatonina: captura de radicales libres.

Desde 1993, Tan y colaboradores reportaron por primera vez a esta neurohormona como un eficiente antioxidante endógeno. Se ha descrito que funciona como un atrapador eficiente de radicales libres, protegiendo a los tejidos del daño generado por estas moléculas reactivas (Benítez-King, 2000). Además de reducir el estrés oxidativo, disminuye la excesiva $[Ca^{2+}]$ intracelular, la cual es

el detonador de la excitotoxicidad (Das et al., 2008). Las evidencias más recientes que explican el mecanismo por el cual la melatonina tiene estos efectos de neuroprotección es el siguiente: dos moléculas de melatonina están involucradas en la reducción del dinucleótido flavin adenina (FAD a FADH₂): una dona un electrón reduciendo a FAD a FADH, mientras que el catión resultante de melatonina interactúa con O₂⁻ para formar AFMK. El segundo electrón requerido para formar FADH₂ es donado por otra molécula de melatonina para también formar AFMK (Fischer et al., 2008).

Niveles fisiológicos y dosis farmacológicas de melatonina promueven la actividad enzimática antioxidante, es decir, regula la expresión y la actividad de enzimas como SOD, CAT y GPx. En complemento, esta hormona también induce una expresión a la baja (*down regulation*) de enzimas pro-oxidantes como la NOS y la lipo-oxigenasa, reduciendo la formación de NO, de O₂⁻ y de ONOO⁻ (Mathes, 2010). Esta hormona es frecuentemente comparada con las vitaminas C y la E, sin embargo, estudios *in vivo* han reportado que la melatonina tiene un mejor perfil antioxidante (Reiter et al., 2007).

Esta tesis identificó que la disminución de la actividad eléctrica cortical por hipoglucemia severa (ayuno 24h asociado a la aplicación de insulina), se ve exacerbada significativamente por la exposición continua a luz durante 15 días (CLC) comparando con la misma condición metabólica en ciclo invertido de luz/obscuridad (CILO; Figura 11). Esto significa que, la inhibición en la formación y liberación de melatonina pineal inducida por la presencia continua de luz hace más vulnerable al cerebro a los cambios metabólicos y a los daños provocados por insultos moleculares.

La secreción nocturna de la melatonina es independiente del periodo de actividad del animal: en especies nocturnas y diurnas, los niveles de melatonina se incrementan durante la obscuridad (Mathes, 2010). La disminución en la síntesis de melatonina endógena consecuencia de la exposición a la luz, puede estar asociada a que el ritmo de liberación de la melatonina es usualmente indetectable en mamíferos que se han mantenido en iluminación constante (Zawilska et al., 2009) y su síntesis se puede inhibir por la exposición continua a luz disminuyendo

la actividad de la enzima AA-NAT (Tamminga, 2006). Uno de los efectos de la luz es sincronizar el ritmo endógeno de la síntesis/liberación de melatonina con el ciclo de luz oscuridad. La oscuridad despolariza la membrana plasmática de los fotoreceptores, produciendo el influjo de Ca^{2+} y la estimulación de la síntesis del AMP_c al final del día y por la noche. La despolarización de la membrana plasmática de los fotoreceptores abre los canales de Ca^{2+} activados por voltaje, resultando en un largo y sostenido incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} de los fotoreceptores lo que conducirá a la formación de AMP_c . El incremento intracelular de AMP_c activa la transcripción de la enzima AA-NAT y disminuye su degradación, lo que consecuentemente estimulará la actividad enzimática de AA-NAT y la síntesis de melatonina. La luz tiene un segundo efecto, la exposición a esta durante la noche o en la fase de oscuridad resulta en una rápida disminución en la producción de melatonina suprimiendo la actividad del NSQ. La exposición a la luz durante la noche, rápidamente disminuye la síntesis de melatonina hiperpolarizando a las células fotoreceptoras reduciendo los niveles de Ca^{2+} intracelular y de AMP_c , lo que genera la desfosfoliración y degradación de la AA-NAT (Fukuhara et al., 2004; Reppert et al., 1981).

Sin embargo, es posible que los niveles de melatonina no fueron reducidos totalmente con la exposición continua a luz (CLC), dado que la pineal es un importante recurso de la síntesis y liberación de melatonina, su extracción quirúrgica no refleja una disminución total en su concentración, los niveles de melatonina residuales en plasma son debido a que la melatonina es sintetizada en otros órganos diferentes a la glándula pineal (Kosa et al., 2001; Reiter et al., 2000).

VIII.2 Captura de radicales libres

La primera parte de esta tesis muestra la evaluación del efecto neuroprotector de la melatonina contra la lesión neuronal inducida por hipoglucemia severa y cuantificada a nivel EEG. En esta etapa demostramos que el efecto neuroprotector de la melatonina, está sustentado en la captura de

radicales libres y no en la asociación de su actividad con sus receptores de membrana (Figura 12; Tabla 1).

Si previamente (10 min.) se administra luzindol a una aplicación de melatonina, es posible bloquear la interacción del ligando con sus receptores MT₁ y MT₂. En estas condiciones, la inducción de hipoglucemia no genera la disminución en la amplitud ni en la frecuencia del EEG a lo largo de los 120 min, así como la ausencia del registro isoelectrico (Figura 12). A partir de lo anterior, podemos sugerir cuatro efectos que tiene la melatonina en el modelo de hipoglucemia severa: 1) induce un potente efecto antioxidante, 2) protección contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia, 3) elimina radicales libres y 4) este mecanismo es independiente de la activación de sus receptores de membrana.

Trabajos previos han cuantificado que la melatonina actúa como antioxidante capaz de capturar ROS, inhibe la formación de radicales libres mediante la donación de electrones y este proceso no requiere de un sitio de unión a sus receptores (Dubocovich et al., 2010; Reiter et al., 2007; Fischer et al., 2008).

No obstante es posible que la función antioxidante de la melatonina pueda estar también mediada por el receptor citosólico MT₃ o por los receptores localizados intracelularmente, específicamente en el núcleo (Reiter et al., 2004). En 1993, Menendez-Pelaez, reportó que dado que la melatonina es una molécula anfipática, esta difunde libremente a través de las membranas celulares por lo que su concentración es alta en el núcleo. Esta observación permitió saber que existen receptores nucleares de esta hormona (Reiter et al., 2007), los cuales se han denominado RZR/ROR α y RZR/ROR β cuya función se encuentra en debate (Zawilska et., 2009; Fischer et al., 2008). Además, un punto importante de discusión en esta tesis, es que se ha demostrado que el sólo uso del luzindol también tiene un fuerte potencial antioxidante y es capaz de reducir la lipoperoxidación *in vitro* (Mathes, 2010). Esta puede ser la razón por la cual la caída de los niveles de glucosa por la aplicación de insulina se vea reducida ante la aplicación de luzindol (Figura 14).

VIII.3 Glucosa y melatonina

Otro factor involucrado en el proceso de las modificaciones en el EEG es la disminución del nivel de glucosa plasmática provocada por la inducción de la hipoglucemia debido a la acción de la insulina.

Al inducir un efecto neuroprotector contra la hipoglucemia podemos sugerir que al mismo tiempo la melatonina influye en los valores de la glicemia, es decir, se encarga de facilitar un efecto metabólico, ya que su administración amortigua el detrimento de la glucosa sanguínea durante la hipoglucemia severa (Fig. 14B)

Datos obtenidos de estudios en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, sugieren que la melatonina puede influir en la homeostasis de la glucosa (Robeva et al., 2008). Existe evidencia de que la melatonina tiene efectos benéficos en la captación de glucosa por su efecto en moléculas esenciales de la cascada de señalización de insulina. De acuerdo con lo anterior, el efecto neuroprotector de la melatonina es debido, al menos en parte, por la activación de la vía de fosfatidilinositol 3- cinasa/AKT y promueve la sobrevivencia neuronal, que junto con el aumento en la vasodilatación en músculo esquelético por la activación de la eNOS, mantiene la homeostasis de la glucosa, activando en forma importante a la glucólisis (Sartori et al., 2009).

En modelos experimentales de ratas diabéticas, la aplicación a largo plazo de melatonina disminuye su hiperinsulinemia y varios resultados indican que la melatonina tiene un efecto anti-insulina, el cual puede ser la llave en el metabolismo de los carbohidratos (Stárka et al., 2008). Algunos estudios han reportado que el tratamiento de melatonina incrementa la glicemia en ratas (Kosa et al., 2001). Este efecto es sumamente importante en el cuerpo de la discusión de esta tesis. Esto indica que la melatonina incrementa los niveles de la glucosa en sangre además de los efectos antioxidantes previamente descritos. Lo cual favorece a la recuperación funcional y reduce el daño neurológico que la hipoglucemia genera.

Sejian y Swaroop, en el 2010 establecieron que existe un incremento significativo de la glucosa en el plasma sanguíneo después de un tratamiento con melatonina a ratas y mencionan que en 2001, Poon y cols., explican el posible

mecanismo por el cual la melatonina controla el nivel de la glucosa: una posible acción directa de la melatonina sobre los hepatocitos modulando la glucosa plasmática (generando glucogenólisis, activando glucólisis y en su defecto estimulando gluconeogénesis), esta hipótesis está apoyada por la presencia de receptores de melatonina en hepatocitos.

Investigaciones indican que cuando existe una falla en el nivel de glucosa en el cerebro, se activan mecanismos homeostáticos como el incremento del flujo sanguíneo y un incremento del transporte de glucosa (Silver y Erecinska, 1994).

Bajo condiciones normales, la energía del cerebro es proporcionada por la glucosa, durante un ayuno prolongado, 60% de la energía que requiere el cerebro es suministrada por cuerpos cetónicos (acetoacetato, β -hidroxibutirato, cetona). El acetoacetato así como el lactato, tienen la habilidad para ser transportados en el cerebro y ser utilizados en lugar de la glucosa para obtener ATP, o ingresar al ciclo de Krebs. Un aumento en la concentración del acetoacetato y de lactato en el cerebro, sugieren un posible mecanismo alternativo en la utilización de la glucosa y de metabolitos intermedios para evitar el colapso energético (Pawlosky et al., 2010). La concentración de acetoacetato en el plasma es directamente proporcional a su concentración en el cerebro y a su consumo en el sistema nervioso (Deelchand et al., 2009).

Es posible que el luzindol incremente la lipogénesis y en consecuencia los sustratos energéticos confluyan a la formación de glucosa, o también, el luzindol puede reducir la actividad de la insulina en el hígado y en el músculo, lo cual hace que la glucosa no ingrese a estos tejidos y en consecuencia sus niveles no se reduzcan en sangre (Figura 15B). Sus efectos farmacológicos son complejos en tejidos no neuronales (Dubocovich et al., 2010).

VIII.4 Citoarquitectura y melatonina

En el cerebro de animales que recibieron la administración de melatonina, nosotros reportamos que existe un mayor número de neuronas por mm^3 en las áreas CA3 y CA1 del hipocampo, así como en la corteza somatomotora, en comparación con el cerebro de los animales con hipoglucemia severa. A partir de

este hallazgo se propone que la melatonina induce un efecto protector contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia en el SNC (Figuras. 15-17; Tabla 1).

Una posibilidad para explicar este mecanismo de neuroprotección a nivel anatómico es el conocimiento que se tiene sobre la capacidad de esta hormona para modificar la organización de los tres componentes principales del citoesqueleto: los microtúbulos, los microfilamentos y los filamentos intermedios, los cuales se modifican de manera reversible cuando las células se cultivan en presencia de concentraciones fisiológicas de melatonina.

Se puede sugerir que en el mecanismo por el cual la melatonina modula el arreglo del citoesqueleto es a través de las interacciones directas que tiene con las enzimas: 1) calmodulina (CaM) y 2) la PKC. La melatonina se une a la CaM localizada en la membrana plasmática con alta afinidad y en presencia de Ca^{2+} , esta interacción cambia la organización y la polimerización de los microtúbulos. En presencia de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), el efecto inhibitorio del Ca^{2+} sobre la polimerización de los microtúbulos se incrementa por la adición de la CaM. La melatonina previene este efecto inhibitorio de la CaM, causando el alargamiento de los microtúbulos. En los citoesqueletos *in situ* tratados con melatonina, los microtúbulos son más largos y gruesos que los de los citoesqueletos despolimerizados por la activación de la CaM endógena por Ca^{2+} . Al faltar una CaM activa, la melatonina inhibe la polimerización de los microtúbulos. La melatonina modifica la organización de los filamentos intermedios de vimentina. Por otra parte, se sabe que la PKC se encuentra asociada con los filamentos intermedios. Se ha encontrado que la melatonina activa a la PKC, aumenta la fosforilación de la vimentina y rearregla la organización tanto de los filamentos intermedios de vimentina como los activados por la PKC. La melatonina induce el traslado de la isoforma α de la PKC, pero no de la PKC- ϵ , lo que sugiere que la hormona interacciona con las isoformas dependientes de Ca^{2+} . Finalmente, la melatonina modula el arreglo de los microfilamentos de actina y el transporte de agua por medio de la interacción con la CaM y la PKC, las cuales están estructuralmente asociadas a los microfilamentos y ambas proteínas intervienen en la modulación de la polimerización de la actina (Benítez-King, 2000).

IX. Conclusiones

- La administración de melatonina es capaz de generar un efecto neuroprotector contra la muerte neuronal inducida por hipoglucemia.
- A nivel EEG, el efecto neuroprotector de la melatonina se identificó por bloquear la disminución de la actividad eléctrica de la corteza cerebral durante una hipoglucemia severa.
- La muerte neuronal por hipoglucemia tiene una mayor magnitud en el área CA3 del hipocampo, sin embargo, esta área también tiene un mayor índice de neuroprotección por melatonina seguido del área CA1 del hipocampo y la corteza somatosensorial.
- La caída de la glicemia inducida por insulina es reducida por la melatonina.
- El efecto neuroprotector que exhibe la melatonina durante un evento hipoglucémico es independiente de la activación de sus receptores membranales y se sugiere sea consecuencia de la captura de radicales libres.

Referencias

1. Abramov, A., Scorziello, A. y Duchen, M. (2007). Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J. Neurosci.*, 27(5):1129 –1138.
2. Akagi, T., Ushinohama, K., Ikesue, S., Yukawa, E., Higuchi, S., Hamase, K., Zaito, K. y Ohdo, S. (2004). Chronopharmacology of melatonin in mice to maximize the antitumor effect and minimize the rhythm disturbance effect. *JPET* 308:378-384.
3. Alkan, T. (2009). Neuroprotective effects of ischemic tolerance preconditioning and postconditioning. *Turkish Neurosurgery*, Vol: 19, No: 4, 406-412.
4. Allison, K., Ahima, R., O'Reardon, J., Dinges, D., Sharma, V., Cummings, D., Heo, M., Martino, N. y Stunkard, A. (2005). Neuroendocrine profiles associated with energy intake, sleep, and stress in the night eating syndrome. *The journal of clinical endocrinology & metabolism* 90(11):6214–6217.
5. Ambriz, M., Rocha, H., Cruz, S. y Granados, V. (2009). Melatonin: A hormone that modulates pain. *Life Sciences* 84, 489–498.
6. Arai, K. y Lo, E. (2009). Experimental models for analysis of oligodendrocyte pathophysiology in stroke. *Esxperimental & Translational Stroke Medicine*, 1:6.
7. Auer, R., Olsson, Y. y Siesjo, B. (1984). Hypoglycemic brain injury in the rat. Correlation of density of brain damage with the EEG isoelectric time: A quantitative study. *Diabetes*; 33:1090-1098.

8. Benítez-King, G. (2000). El papel de la melatonina como modulador de la organización del citoesqueleto. *Salud Mental* V.23, No. 1.
9. Borlongan, C., Yamamoto, M., Takei, N., Kumazaki, M., Ungsuparkorn, C., Hida, H., Sanberg, P. y Nishino, H. (2009). Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J.* 14, 1307–1317
10. Brailowsky, S. (1976). Effects of melatonin on the photosensitive epilepsy of the baboon, *papio papio*. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 41: 314-319.
11. Broughton, B., Reutens, D. y Sobey, C. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*; 40; e331-e339.
12. Buga, A., Bălșeanu, A., Wagner, A. y Mogoantă, I. (2009). Strategies to improve post-stroke behavioral recovery in aged subjects. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(4):559–582.
13. Cardinali, D., Furio, A. y Reyes, M. (2005). Clinical perspectives for the use of melatonin as a chronobiotic and cytoprotective agent. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1057: 327–336.
14. Chao, D., Yin, C., Li, Z., Da, Z., Zhong, S., Min, F. y Ping, Y. (2001). Effects of microinjection of melatonin and its receptor antagonists into anterior hypothalamic area on blood pressure and heart rate in rats. *Acta Pharmacol Sin*; 22 (11): 997-1002.
15. Chiu, S. y Cline, H. (2010). Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Development*, 5:7.

16. Cryer, P. (2007). Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *J. Clin. Invest.* 117:868–870.
17. Das, A., Belagodu, A., Reiter, R., Ray, S. y Banik, N. (2008). Cytoprotective effects of melatonin on C6 astroglial cells exposed to glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *J. Pineal Res.* 45(2): 117–124.
18. Deelchand, D., Shestov, A., Koski, D., Uğurbil, K. y Henry, P. (2009). Acetate transport and utilization in the rat brain. *J Neurochem.* 109(Suppl 1): 46–54.
19. Del Campo, M., Abdelmalik, P., Wu, C., Carlen, P. y Zhang, L. (2009). Seizure-like activity in the hypoglycemic rat: Lack of correlation with the electroencephalogram of free-moving animals. *Epilepsy Research* 83:243-248.
20. Dirnagl, U., Becker, K. y Meisel, A. (2009). Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol.* 8(4): 398–412.
21. Doghramji, K. (2007). Melatonin and its receptors: A new class of sleep-promoting agents. *Journal of Clinical Sleep Medicine Supplement to Vol. 3, No. 5.*
22. Doyle, K., Simon, R., y Stenzel-Poore, M. (2008). Neuropharmacology—special issue on cerebral ischemia mechanisms of ischemic brain damage—review article. *Neuropharmacology.* 55(3): 310–318.
23. Drouyer, E., Rieux, C., Hut, R. y Cooper, H. (2007). Responses of suprachiasmatic nucleus neurons to light and dark adaptation: relative contributions of melanopsin and rod–cone inputs. *J. Neurosci.,* 27(36):9623–9631.

24. Dubocovich, M. (1988). Pharmacology and function of melatonin receptors. *The FASEB Journal*.
25. Dubocovich, M., Delagrange, P., Krause, D., Sugden, D., Cardinali, D. y Olcese, J. (2010). International union of basic and clinical pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62:343-380.
26. Dubocovich, M., Yun, K., Al-Ghoul, W., Benloucif, S. y Masana, M. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *The FASEB Journal Vol. 12*.
27. Dunn-Meynell, A., Sanders, N., Compton, D., Becker, T., Eiki, J., Zhang, B. y Levin, B. (2009). Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *J. Neurosci.* 29(21):7015–7022.
28. Ersahin, M., Toklu, H., Cetinel, S., Yuksel, M., Yegen, B. y Sener, G. (2009). Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. *J. Pineal Res.* 46:324–332.
29. Fischer, T., Slominski, A., Zmijewski, M., Reiter, R. y Paus, R. (2008). Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Experimental Dermatology*, 17, 713–730.
30. Fischer, T., Zmijewski, M., Wortsman, J. y Slominski, A. (2008). Melatonin maintains mitochondrial membrane potential and attenuates activation of initiator (casp-9) and effector caspases (casp-3/casp-7) and PARP in UVR-exposed HaCaT keratinocytes. *J. Pineal Res.* 44(4): 397–407.
31. Fisher, S. y Sugden, D. (2009). Sleep-promoting action of IIK7, a selective MT2 melatonin receptor agonist in the rat. *Neurosci Lett.* 457(2-3): 93–96.

32. Foran, E. y Trotti, D. (2009). Glutamate transporters and the excitotoxic path to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling, Volume 11*, Number 7.
33. Fukuhara, C., Liu, C., Ivanova, T., Chan, G., Storm, D., Iuvone, M. y Tosini, G. (2004). Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *The Journal of Neuroscience*, 24(8):1803–1811.
34. García, D., González, I., Letechipía, G., López, E., Moralí, G. y Cervantes, M. (2008). Long-term evaluation of cytoarchitectonic characteristics of prefrontal cortex pyramidal neurons, following global cerebral ischemia and neuroprotective melatonin treatment, in rats. *Neuroscience Letters* 448:148-152.
35. Gewis, A. (2003). Introduction to apoptosis. *Apo Review* 1-26.
36. Ginsberg, M. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55(3): 363–389.
37. Glass, C., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. y Gage, F. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140(6):918–934.
38. González, I., Letechipía, G., López, E., Moralí, G. y Cervantes, M. (2007). Long-term study of dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal cells, after neuroprotective melatonin treatment following global cerebral ischemia in rats. *Neuroscience Letters* 423:162-166.
39. Guerra, E. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *AN. MED. INTERNA (Madrid) Vol. 18, N. ° 6*, 326-335.

40. Haces, M., Hernández, K., Medina, O., Montiel, T., Pedraza, J. y Massieu, L. (2008). Antioxidant capacity contributes to protection of ketone bodies against oxidative damage induced during hypoglycemic conditions. *Experimental Neurology* 211, 85–96.
41. Hardeland, R. (2009). New approaches in the management of insomnia: weighing the advantages of prolonged-release melatonin and synthetic melatonergic agonists. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 5: 341–354.
42. Hong, Y., Palaksha, K., Park, K., Park, S., Kim, H., Reiter, R. y Chang, K. (2010). Melatonin plus exercise-based neurorehabilitative therapy for spinal cord injury. *J. Pineal Res.*; 49:201-209.
43. Imbesi, M., Uz, T., Dzitoyeva, S., Giusti, P. y Manev, H. (2008). Melatonin signaling in mouse cerebellar granule cells with variable native MT1 and MT2 melatonin receptors. *Brain Res.* 1227: 19–25.
44. Karelina, K., Norman, G., Zhang, N., Morris, J., Peng, H. y DeVries, C. (2009). Social isolation alters neuroinflammatory response to stroke. *PNAS* vol. 106, no. 14, 5895–5900.
45. Kaur, C. y Ling, E. (2008). Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 3068-3080.
46. Kidd, P. (2009). Integrated brain restoration after ischemic stroke – medical management, risk factors, nutrients, and other Interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. *Alternative Medicine Review* Volume 14, Number 1.

47. Koh, P. (2008). Melatonin regulates nitric oxide synthase expression in ischemic brain injury. *J. Vet. Med. Sci.* 70(7):747-750.
48. Korkmaz, A., Reiter, R., Topal, T., Manchester, L., Oter, S. y Tan, D. (2009). Melatonin: An established antioxidant worthy of use in clinical trials. *MOLMED* 15 (1-2): 43-50.
49. Kosa, E., Maurel, D. y Siaud, P. (2001). Effects of pinealectomy on glucagon responsiveness to hypoglycaemia induced by insulin injections in fed rats. *Exp. Physiol.* 86:5.
50. Lakhan, S., Kirchgessner, A. y Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 7:97.
51. Ling, X., Zhang, LM., Lu, SC., Li, XJ. y Sun, FJ. (1999). Protective effect of melatonin on injured cerebral neurons is associated with bcl-2 overexpression. *Acta Pharmacol Sin* 20:409–414.
52. Lin, H. y Lee, E. (2009). Effects of melatonin in experimental stroke models in acute, sub-acute, and chronic stages. *Neuropsychiatry Disease and Treatment* 5: 157-162.
53. Liu, T. y Borjigin, J. (2006). Relationship between nocturnal serotonin surge and melatonin onset in rodent pineal gland. *Journal of Circadian Rhythms*, 4:12, 1-10.
54. Mahmood, H., Hussein, S., Ibrahim, K., Hikmat, I., Salih, A., Hoshi, B. y Rehman, S. (2006). Effects of melatonin and zinc on lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with metformin. *J. Pineal Res.* 41:189-193.

55. Mathes, A. (2010). Hepatoprotective actions of melatonin: Possible mediation by melatonin receptors. *World J. Gastroenterol.* 16(48): 6087-6097.
56. Mendoza, J., Graff, C., Dardente, H., Pevet, P. y Challet, E. (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *The Journal of Neuroscience*, 25(6):1514–1522.
57. Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R., Barlow-Walden, L., Pablos, M. y Tan, D. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunological and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem* 53: 373–382.
58. Menges, C., Altomare, D. y Testa, J. (2009). FAS-associated factor 1 (FAF1): diverse functions and implications for oncogenesis. *Cell Cycle* 8 (16): 2528–2534.
59. Minamino, T. (2010). Role of cellular senescence in lifestyle-related disease *Circ J.* 74:2527–2533.
60. Moulton, P. y Harvey, J. (2008). Hormonal regulation of hippocampal dendritic morphology and synaptic plasticity. *Cell Adhesion & Migration* 2:4, 269-275.
61. Mutoh, T., Shibata, S., Korf, H. y Okamura, H. (2003). Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Physiol*, 547.1, 317–332.
62. Niizuma, K., Endo, H. y Chan, P. (2009). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J. Neurochem.* 109(Suppl 1): 133–138.

63. Ortiz, G., Benítez, G., Rosales, S., Pacheco, F. y Velázquez, I. (2008). Cellular and biochemical actions of melatonin which protect against free radicals: role in neurodegenerative disorders. *Current Neuropharmacology*, 6, 203-214.
64. Pawlosky, R., Kashiwaya, Y., Srivastava, S., King, M., Crutchfield, C., Volkow, N., Kunos, G., Li, T. y Veech, R. (2010). Alterations in brain glucose utilization accompanying elevations in blood ethanol and acetate concentrations in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 34(2): 375–381.
65. Pei, Z., Pang, S. y Cheung, R. (2003). Administration of melatonin after onset of ischemia reduces the volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *Stroke*, 34: 770-775.
66. Pellegrini-Giampietro, D., Cherici, G., Alesiani, M., Carla, V. y Moroni F (1990). Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *The Journal of Neuroscience*, 10(3):1035-1041.
67. Poeggeler, B., Sambamurti, K., Siedlak, S., Perry, G., Smith, M. y Pappolla, M. (2010). A novel endogenous indole protects rodent mitochondria and extends rotifer lifespan. *IPAM Protection in Rat Brain, Volume 5, Issue 4*, e10206.
68. Prunet-Marcassus, B., Desbazeille, M., Bros, A., Louche, K., Delagrangé, P., Renard, P., Casteilla, L. y Nicaud, L. (2003). Melatonin reduces body weight gain in sprague-dawley rats with diet-induced obesity. *Endocrinology* 144(12):5347–5352.

69. Ramirez, G., Klempin, F., Babu, H., Benítez, G. y Kempermann, G. (2009). Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 2180-2191.
70. Raskind, M., Burke, B., Crites, N., Tapp, A. y Rasmussen, D. (2007). Olanzapine-induced weight gain and increased visceral adiposity is blocked by melatonin replacement therapy in rats. *Neuropsychopharmacology* 32:284-288.
71. Reghunandanan, V. y Reghunandanan, R. (2006). Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms*, 4:2.
72. Reiter, R. (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology Vol. 56*: 359-384.
73. Reiter, R., Acuña, D., Tan, D. y Burkhardt, S. (2000). Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 939:200-215.
74. Reiter, R., Tan, D., Gitto, E., Sainz, R., Mayo, J., Leon, J., Manchester, L., Kilic, E. y Kilic, U. (2004). Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol. J. Pharmacol.* 56:159–170.
75. Reiter, R., Tan, D., Leon, J., Kilic, U. y Kilic, E. (2005). When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Exp Biol Med (Maywood)*. 230(2):104-117.
76. Reiter, T., Tan, D., Manchester, I. y Tamura, H. (2007). Melatonin defeats neurally-derived free radicals and reduces the associated

neuromorphological and neurobehavioral damage. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 58, Suppl 6, 5.22.

77. Reiter, R., Tan, D., Terron, P., Flores, L. y Czarnocki, Z. (2007). Melatonin and its metabolites: New findings regarding their production and their radical scavenging actions. *Acta Biochímica Polonica Vol. 54 No. 1*, 1–9.
78. Reppert, S., Perlow, M., Ungerleider, I., Mishkin, M., Tamarkin, I., Orloff, D., Hoffman, H. y Klein, D. (1981). Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the rhesus monkey. *The Journal of Neuroscience Vol. 1, No. 12*, 1414-1425.
79. Robeva, R., Kirilov, G., Tomova, A. y Kumanov, P. (2008). Melatonin–insulin interactions in patients with metabolic syndrome. *J. Pineal Res.* 44:52–56.
80. Samantaray, S., Das, A., Thakore, N., Matzelle, D., Reiter, R., Ray, S. y Banik, N. (2009). Therapeutic potential of melatonin in traumatic central nervous system injury. *J. Pineal Res*; 47:134–142.
81. Samantaray, S., Sribnick, E., Das, A., Knaryan, V., Matzelle, D., Yallapragada, A., Reiter, R., Ray, S. y Banik, N. (2008). Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats. *J Pineal Res.* 44(4): 348–357.
82. Sánchez, J., López-Zapata, D. y Romero-Leguizamón, C. (2010). Mecanismos de transporte de calcio en neuroprotección y neurotoxicidad. *Rev Neurol*; 51 (10): 624-632.
83. Sánchez, N. (2008). Enfermedad cerebro vascular en México. Epidemiología y pronóstico. *Revista Ministerio de Salud*.

84. Sartori, C., Dessen, P., Mathieu, C., Monney, A., Bloch, J., Nicod, P., Scherrer, U. y Duplain, H. (2009). Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice. *Endocrinology* 150: 5311–5317.
85. Sejian, V. y Swaroop, R. (2010). Effects of melatonin on adrenal cortical functions of indian goats under thermal stress. *Vet Med Int.* 6.
86. Semak, I., Korik, E., Antonova, M., Wortsman, J. y Slominski, A. (2008). Metabolism of melatonin by cytochrome P-450s in rat liver mitochondria and microsomes. *J Pineal Res.* 45(4): 515–523.
87. Shin, B., Won, S., Yoo, B., Kauppinen, T. y Suh, S. (2009). Prevention of hypoglycemia-induced neuronal death by hypothermia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1-13.
88. Silver, I. y Erecinska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *The Journal of Neuroscience*, 14(8): 5068-5076.
89. Singh, S., Ahmed, R., Sagar, R. y Krishana, B. (2006). Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J Med Res* 124: 419-426.
90. Stárka, L., Dušková, M., Rácz, B., Šimůnková, K., Hill, M. y Kancheva, R. (2008). Melatonin negatively correlates with c-peptide after food intake. *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 1): S187-S192.
91. Suh, S., Aoyama, K., Chen, Y., Garnier, P., Matsumori, Y., Gum, E., Liu, J. y Swanson, R. (2003). Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors

- administered after hypoglycemia. *The Journal of Neuroscience*, 23(33):10681–10690.
92. Suh, S., Gum, E., Hamby, A., Chan, P. y Swanson, R. (2007). Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *The Journal of Clinical Investigation*, volume 17, number 4.
93. Sun, X., Deng, J., Liu, T. y Borjigin, J. (2002). Circadian 5-HT production regulated byadrenergic signaling. *PNAS*, vol. 99, no. 7, 4686–4691.
94. Sugawara, T., Sieving, P., Iuvone, M. y Bush, R. (1998). The melatonin antagonist luzindole protects retinal photoreceptors from light damage in the rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol. 39, No. 12.
95. Tamminga, C. (2006). Discovering light effects on the brain. *Am J Psychiatry* 163:5.
96. Tan, D., Poeggeler, B., Reiter, R., Chen, C., Chen, S. yManchester, L. (1993). The pineal hormone melatonin inhibits DNA adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole *in vivo*. *Cancer Lett*; 70: 65-71.
97. Tanaka, Y., Takata, T., Satomi, T., Sakurai, T. y Yokono, K. (2008). The double-edged effect of insulin on the neuronal cell death associated with hypoglycemia on the hippocampal slice culture. *Kobe J. Med. Sci.*, Vol. 54, No.2:E97-E107.
98. Tasker, R., Coyle, J. yVornov, J. (1992). The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. *The Journal of Neuroscience*, 12(11): 4298-4308.

99. Tasset, I., Medina, F., Peña, J., Jimena, I., Muñoz, M., Salcedo, M., Ruiz, C., Feijóo, M., Montilla, P. y Túnez. (2005). Olfactory bulbectomy induced oxidative and cell damage in rat: Protective effect of melatonin. *Physiological research pre-press article*.
100. Torres, C., Richter, H., Germain, A., Valenzuela, G., Campino, C., Rojas, P., Forcelledo, M., Torrealba, F. y Serón, M. (2003). Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J. Physiol*, 554.3, 841-856.
101. Valdés, M., Asai, M. y Matamoros, G. (2003). Efecto de la melatonina sobre la concentración de péptidos opioides en el sistema inmune de la rata. *Salud Mental*, año/vol. 26, número 003, 46-56.
102. Velísek, L., Velískova, J., Chudomel, O., Poon, K., Robeson, K., Marshall, B., Sharma, A. y Moshe, S. (2008). Metabolic environment in substantia nigra reticulata is critical for the expression and control of hypoglycemia-induced seizures. *J. Neurosci.*, 28(38):9349 –9362.
103. Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.*; 31(2):126-133.
104. Vexler, Z. y Yenari, M. (2009). Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Dev Neurosci.*, 31:378–393.
105. Wang, Q., Zhang, Q., Wu, D., Yin, X. y Zhang, G. (2007). Neuroprotection of selenite against ischemic brain injury through negatively regulating early activation of ASK1/JNK cascade via activation of PI3K/AKT pathway. *Acta Pharmacol Sin*; 28 (1): 19-27.

106. Wang, X., Figueroa, B., Stavrovskaya, I., Zhang, Y., Sirianni, A., Zhu, S., Day, A., Kristal, B. y Friedlander, R. (2009). Methazolamide and melatonin inhibit mitochondrial cytochrome C release and are neuroprotective in experimental models of ischemic injury. *Stroke*; 40(5): 1877-1855.
107. Wang, X. y Michaelis, E. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, volume 2, article 12.
108. Wang, Y. y Qin, Z. (2010). Molecular and celular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15: 1382-1402.
109. Yi, H., Zhang, S., Xi, W. y Jian, W. (2006). Inhibition of mitochondria responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin during ischemia-reperfusion. *J Zhejiang Univ SCIENCE B* 7(2):142-147.
110. Zawilska, J., Skene, D. y Arendt, J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological reports*, 61, 383-410.
111. Gaceta Médica de México. *Animales de Laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)*. 2002. Vol. 138. Número 3.
112. Guía para el cuidado y uso de los animales en el laboratorio. *Academia Nacional de Medicina*, 1999. 146pp.
113. Neurociencia. Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A., Mcnamara, J. y Williams, M. *Ed. Medica Panamericana 6ª Ed. España*. 2007. 744-746 pp.

114. Tratado Fisiología Médica. Guyton, A. y Hall, J. *Ed. Interamericana McGraw-Hill 9ª Ed. México. 2000. 1075-1076 pp.*