# 9. Efectos de la hormona de crecimiento y la melatonina sobre el Sistema Nervioso Central

JESÚS A.F. TRESGUERRES*, KIREEV R.,SALAZAR V.
Y ARIZNAVARRETA C.

*Catedrático de Fisiología*. Académico de Número de la Real Academia Nacional de Medicina*. Departamento Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid*

**RESUMEN**

Con la edad disminuyen una serie de hormonas tanto en el hombre como en los animales de experimentación y esta disminución está directamente relacionada con las alteraciones que se observan en diversos procesos fisiologicos con el envejecimiento. Las más importantes parecen ser GH y melatonina además de las hormonas sexuales. El envejecimiento del SNC determina una serie de cambios en su estructura y función que pueden estudiarse por un lado mediante la observación tanto del número total de neuronas presentes en el hipocampo, como de la neurogénesis. Además se investigan los fenómenos de estrés oxidativo e inflamación cerebrales que pueden explicar los fenómenos de apoptosis y deterioro funcional del SNC. En este capítulo se presentan una serie de datos que apoyan el papel que juegan la GH y la melatonina en la reversión parcial del deterioro del SNC asociado al envejecimiento. Se presentan los resultados obtenidos haciendo especial hincapié en los mecanismos moleculares que explican las acciones observadas.

Se han estudiado ratas machos y hembras de 22 meses, que fueron sometidos a tratamiento con cada una de dichas hormonas o bien con placebo durante 10 semanas. Se incluyeron como controles jóvenes de ambos sexos de 2 meses sin tratar. En el hipocampo el número de neuronas se mantiene estable hasta

que a los 22 meses comienza el proceso de apoptosis que conduce a una reducción en el número que se hace evidente a los 24 meses. También aparece con la edad pero con un comienzo mucho mas temprano una disminución de la neurogénesis en esa misma estructura. Todo esto ocurre a la vez que se incrementan los indicadores de estrés oxidativo en el cerebro como lipoperóxidos y NO sintasa inducible y aumentan también los indicadores de inflamación como TNF alfa, NFkB e interleukinas 1 y 6 El tratamiento con GH impide la disminución del número de neuronas pero no aumenta la neurogénesis por lo que parece actuar exclusivamente disminuyendo la apoptósis. Esto parece confirmarse porque en los homogenizados cerebrales hay un aumento de Bcl2, sirtuina y glutatión peroxidasa, y una disminución de caspasas 3 y 9 y de nucleosomas. A la vez descienden los indicadores de estrés oxidativo y de inflamación. La melatonina actúa por el contrario estimulando la neurogénesis y mucho menos sobre apoptósis. De hecho no son capaces de evitar la caida en el numero total de neuronas, aunque si son capaces de reducir el estrés oxidativo y la inflamación. Por todo ello los tratamientos hormonales mencionados son capaces de mejorar los síntomas del envejecimiento en el hipocampo del SNC bloqueando los mecanismos moleculares de inducción de estrés oxidativo y apoptósis.

## ABSTRACT

Age is associated with the reduction of several hormones both in humans and experimental animals and this reduction seems to be associated with the alterations observed in several physiological processes. GH and melatonin in addition to sexual hormones seem to be the most important. Aging in the CNS determines some changes in its structure and function that can be studied by the observation of the total number of neurones in the hippocampus and by estimating neurogenesis. In addition oxidative stress processes and inflammation, that could explain apoptosis and functional damage to the brain can be also investigated. In this chapter data are presented supporting the positive role of GH and melatonin treatments in partially reverting the age associated brain damage. The molecular mechanisms that could explain the observed effects, has been emphasized.

Male and female rats of 22 months of age have been treated with GH, melatonin or placebo for 10 weeks. Young animals of both sexes of 2 months without treatment have also been included as controls. Results show that he number of neurones in the hippocampus remains stable until 22 months of age and then an apoptotic process starts that reduces its number, the fall being signifi-

cant at 24 months of age. Also a reduction in neurogenesis can be observed in the same structure but starting much earlier. At the same time markers for oxidative stress, such as lipoperoxides and iNO synthase or inflammation such as TNF alpha, NFkB, and interleukins 1 and 6 are increased in brain homogenates. GH treatment prevents the observed fall in the number of neurones but without enhancing neurogenesis so it can be only explained by a reduction of apoptosis. This seems to be confirmed by the observed increase in Bcl2, sirtuin, glutathione peroxidase, and the reduction in nucleosomes and caspases 3 and 9. At the same time, markers for oxidative stress and inflammation show a marked reduction. Melatonin on the contrary stimulates neurogenesis and has a less important effects on apoptosis so that the total number of neurones continues to fall. However a significant reduction on oxidative stress and inflammation has been also detected. In conclusion both hormonal treatments were able to ameliorate aging associated alterations in the hippocampus of the CNS by blocking molecular mechanisms of oxidative stress and inflammation

## INTRODUCCIÓN

El cerebro presenta dos fases de desarrollo: una primera fase en que experimenta un crecimiento rápido hasta alcanzar los 20-25 años; y una segunda fase en que el crecimiento no sólo se frena, sino que incluso se produce una involución. Durante el envejecimiento el cerebro sufre una serie de alteraciones estructurales, tanto macroscópicas como histológicas y bioquímicas. Según múltiples autores, a partir de los 50 años el volumen cerebral disminuye alrededor de un 2% por década y, como consecuencia, el volumen de la cavidad extracerebral aumenta de manera progresiva y paralela a partir de esta edad. A los 80 años, alcanza una pérdida de entre un 10-15% de su peso máximo en la juventud, observándose un aumento en el tamaño de los surcos, una disminución de las circunvoluciones cerebrales así como un significativo aumento del tamaño de los ventrículos cerebrales.

Estudios recientes indican que el grado de déficit cognitivo y la presencia de marcadores neuropatológicos (como las placas neuríticas) en enfermos de Alzheimer, podría estar relacionado con la degeneración o incluso atrofia de neuronas colinérgicas Aparte de las alteraciones celulares descritas anteriormente en la porción basal del prosencéfalo, se ha observado la presencia de terminales colinérgicos altamente engrosados en el neocortex de animales viejos, que pueden asociarse en forma de placas adoptando una morfología muy similar a la de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, a pesar de que distintas pruebas tintoriales demuestran que carecen de sustancia amiloidea (1). En con-

clusión, parece que con la edad se producen una serie de alteraciones a nivel neuronal, como la degeneración y atrofia de las células colinérgicas, que están directamente relacionadas con la aparición de ciertos déficits cognitivos observados durante el envejecimiento, tanto en humanos como en la rata.

A pesar de que en la mayor parte de las áreas cerebrales no existe una pérdida neuronal masiva con la edad (2, 3), se ha observado la existencia de una reducción muy significativa del número de neuronas en el hilus del giro dentado del hipocampo en los ancianos (4) así como en ratas machos Fischer 344 de 24 meses de vida (5).

Por otra parte, varios autores sugieren que la pérdida de capacidades cognitivas con la edad, sea debida no sólo a un descenso en el número de neuronas del hipocampo, sino a una pérdida de sinapsis en este área cerebral, lo que conllevaría una clara pérdida de capacidad funcional por parte de esta estructura cerebral (6).

El SNC es un tejido diana para varias hormonas entre las que se encuentra la GH (7). El defecto de GH se asocia a alteraciones del sueño, con pérdida de memoria, sensación de bienestar disminuida y otras alteraciones cognitivas (8, 9,10). Tanto memoria como las performances cognitivas de los pacientes con déficit de GH se mejoran con el tratamiento de sustitución con GH (8,11, 12, 13, 14,15).

En varios modelos animales la GH protege el cerebro y la médula espinal de los distintos tipos de degeneración y es capaz de promover la supervivencia de las neuronas tras un insulto hipóxico-isquémico (16, 17, 18, 19). Este efecto neuroprotector de la GH sugiere que la disminución de esta hormona con la edad (20) o en otras circunstancias, puede afectar al cerebro y contribuir al deterioro del mismo (21, 22, 23).

El hipocampo es un área cerebral relacionada con la memoria episódica y espacial (24) que se deteriora con la edad de forma paralela a las habilidades cognitivas (23,25). Se ha visto una disminución significativa con la edad en el número de neuronas de esta zona, y concretamente en el hilus del giro dentado, tanto en humanos como en la rata Fischer 344 (5). También nuestro grupo ha podido comprobar dicha disminución en las ratas Wistar, tanto machos como hembras. El tratamiento con GH a dosis que consiguen restaurar los niveles de IGF I plasmáticos hasta alcanzar los que presentan los adultos jóvenes, es capaz de evitar la disminución del número de neuronas con la edad (26, 27). El mecanismo neuroprotector de la GH parece más bien relacionado con la disminución de la apoptosis de las neuronas que con el incremento de la neurogénesis. En ambos casos está mediada por el estímulo de IGF-I, bien sea el de origen hepático, que pasa

a la circulación y cruza la barrera hemato-encefálica, o el generado directamente en el tejido nervioso bajo el estímulo de la GH (28, 29).

La melatonina ha demostrado tener efectos protectores en diversas enfermedades y modelos experimentales en los que el daño inducido por los radicales libres juega un papel fundamental, protegiendo del daño oxidativo a las macromoléculas celulares (DNA, lípidos y proteínas) (30). En este sentido, la melatonina es capaz de reducir el daño oxidativo en modelos de isquemia/reperfusión en diversos órganos incluyendo el SNC, o bien tras exposición a tóxicos (cianuro, paraquat, ciclofosfamida) toxinas bacterianas o a metales pesados. Tambien protege frente a la proteína β-amiloide (como modelo de enfermedad de Alzheimer), al MPTP (como modelo de Parkinsonismo), o a la excitotoxicidad inducida en el SNC por ácido kaínico, etc. (31, 32,33). De hecho ha llegado a utilizarse como tratamiento coadyuvante en isquemia/reperfusión transitoria en el cerebro (32).

Nuestro grupo ha investigado también el efecto de la melatonina sobre el SNC observando que no es capaz de evitar la disminución del número de neuronas en el hilus del giro dentado como hacía la GH pero si estimula significativamente la neurogenesis (27).

## HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)

La GH es la hormona más abundante en la hipófisis (5 - 10 mg / glándula). Hay varias formas moleculares, pero la forma principal tiene 191 aminoácidos (Pm 22.650 kDa) y se sintetiza en las células acidófilas. Su gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 (34).

La GH de mamíferos es activa en numerosas especies, pero en el ser humano solo es activa la procedente de humanos o de primates (35), o sea que presenta específicificidad de especie.

Los niveles plasmáticos basales de GH oscilan entre 1 y 5 ng/ml, aunque durante la pubertad se producen incrementos importantes. Su secreción es pulsátil, con picos cada 3-4 horas que son más frecuentes pero menores en las hembras (36). La máxima secreción de GH tiene lugar en las dos primeras horas de sueño nocturno, durante el sueño de ondas lentas.

Básicamente, la secreción de GH está regulada por el hipotálamo, a través de tres péptidos: *La Somatostatina (SS), la Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH),* y la *Ghrelina*. Esta última recientemente descubierta es un peptido de 28 aminoacidos aislado originalmente de la pared gástrica (37) pero que

también está presente en el hipotalamo y que es el ligando natural del receptor de la hexarelina (38), sustancia que también estimula la secreción de GH.

La secreción episódica de GH resulta de la interacción entre las secreciones de GHRH estimulante y de SS inhibidora donde posiblemente esta última tenga un papel preponderante (39). Parece que este patrón secretor pulsátil es tanto o más importante para las acciones hormonales periféricas que la cantidad total de GH secretada.

La secreción de GH se estimula por el estrés, el ejercicio físico, la hipoglucemia,y algunas drogas, como la bromocriptina; mientras que el aumento de la glucosa sanguínea inhibe su secreción. El descenso de ácidos grasos libres (AGL) estimula la secreción de GH y anula su pulsatilidad.

La secreción de GH también está influida por el sistema endocrino (40):

Los péptidos opioides al igual que otros, como la galanina y la leptina, estimulan la secreción de GH.

Las hormonas tiroideas modulan la expresión del gen de GH; por eso los individuos hipotiroideos presentan también un defecto de crecimiento.

Los glucocorticoides en dosis bajas estimulan la secreción de GH, pero los niños tratados crónicamente con dosis farmacológicas muestran una marcada deficiencia de talla (41).

Respecto a los esteroides sexuales, existe un claro dimorfismo sexual en cuanto a su influencia sobre la secreción de GH, que puede ser la causa de las diferencias en el patrón de crecimiento de ambos sexos. Cuando los esteroides sexuales se secretan durante la pubertad, los cartílagos de crecimiento de los huesos largos se cierran y el crecimiento termina.

También diversos *neurotrasmisores* suprahipotalámicos influyen en su secreción.

Tras su secreción, la GH se une en el plasma a proteínas transportadoras (GH-BP). La GH se elimina fundamentalmente por el riñón, pero solo se filtra la fracción no unida a proteínas (42).

## MECANISMO DE ACCIÓN DE LA GH

El receptor para la GH (GHR) es una proteína codificada por un gen situado en el cromosoma 5. Su cantidad es escasa durante la época postnatal, y va aumentando a lo largo del primer año de vida. Una molécula de GH interac-

ciona con dos de GHR, que al dimerizarse pone en marcha una cascada de señales celulares mediante mecanismos JAK y STAT dependientes (42).

En respuesta a la secreción de GH, se sintetizan y liberan en numerosos tejidos (hígado, hueso, músculo, etc.) péptidos con actividad hormonal que median una gran parte de las acciones de la GH. Se les denominó somatomedinas, pero hoy se prefiere el nombre de Insulin-like Growth Factors (IGFs), debido a que presentan una marcada analogía con la insulina. Las más importantes son la IGF I y la IGF II. El 95 % de la IGF circula unida a diversas proteínas transportadoras (IGFBPs), de las cuales la más importante es la IGFBP-3, cuyos niveles están controlados también por la propia concentración de GH, y nos sirven como marcador de su actividad.

De cualquier forma, el papel más destacado de la IGF lo lleva a cabo la generada en cada tejido en respuesta a la GH y que actúa de forma paracrina (43).

El receptor de IGF se encuentra en la superficie de las células y es semejante al receptor de la insulina en su estructura y en la secuencia de aminoácidos (44). Esta similitud hace que exista una importante interacción entre ambas hormonas, sobre todo a concentraciones elevadas.

La IGF media muchas de las acciones de la GH, existiendo una teoría dual de las acciones de ambas hormonas, de forma que en el crecimiento óseo por ejemplo, la GH estimula la diferenciación de diversos tipos celulares, mientras que la IGF-I tendría efectos mitogénicos y multiplicadores sobre las células diferenciadas. Así, actuaría de forma paracrina en el cartílago de conjunción, estimulando la multiplicación de los condrocitos.

Las acciones de la IGF son distintas dependiendo de la duración del estímulo (42): Las acciones agudas producen efectos semejantes a los de la insulina, mientras que las crónicas o prolongadas incluyen síntesis de DNA y proliferación celular. Es lo que sucede durante el crecimiento óseo y del resto de tejidos.

## Efectos de la GH

La GH es una hormona anabólica, que estimula la incorporación de aminoácidos en el músculo, la síntesis proteica y la formación de colágeno extracelular, e inhibe el catabolismo proteico. Ésto provoca un balance positivo de nitrógeno y de fósforo y una caída en los niveles sanguíneos de urea y de aminoácidos (45). En los adultos, la GH colabora en el mantenimiento de la composición corporal y promueve la reparación de los tejidos (46). La GH es una

hormona lipolítica que induce la rotura de triglicéridos formándose glicerol y AGL, que sirven de sustratos para la neoglucogénesis. También estimula la oxidación de ácidos grasos en lugar de carbohidratos o proteínas, efecto que es más importante en periodos de ayuno. También se sabe que, en cantidades elevadas, tiene efecto diabetogénico.

La principal función de la GH es el fomento del crecimiento durante la infancia y adolescencia, en colaboración con otros factores como la nutrición y las hormonas sexuales y tiroideas. Como hemos visto, la GH es una hormona anabólica, que estimula la incorporación de aminoácidos y la síntesis proteica en las células, produciendo un aumento de tamaño y multiplicación de las mismas. Actuando sobre los cartílagos de crecimiento, induce un incremento de tamaño de los huesos largos durante la infancia y hasta la pubertad, momento en el que estos se cierran, osificándose por acción de las hormonas sexuales. También estimula el crecimiento muscular.

El déficit de secreción de GH en la infancia produce enanismo por falta de estímulo sobre los cartílagos de conjuncion, mientras que el exceso produce gigantismo. Si hay hiperproducción de GH antes de que los cartílagos de crecimiento se hayan cerrado, los huesos largos crecen más de lo normal. La consecuencia es una talla excesivamente alta y disarmonía corporal. En el adulto, el exceso de producción de GH no puede estimular el crecimiento pero si produce acromegalia (47).

De la misma forma se ha descrito un síndrome específico debido al déficit de GH del adulto (48). Se caracteriza por una alta incidencia de dislipemia, intolerancia a la glucosa, obesidad de tipo central, debilidad muscular, fatiga, disminución de la densidad ósea (49) hipertensión y alteraciones neuropsiquiátricas (13) Éstos individuos desarrollan aterosclerosis tempranamente, incrementándose la morbi-mortalidad cardiovascular (50,51). La terapia sustitutiva en estos pacientes ha demostrado tener claros efectos beneficiosos, mejorando ostensiblemente los parámetros previamente deteriorados (13, 52, 53, 54, 55, 56, 57). De ahí que ya esté aprobada la terapia sustitutiva con GH en este tipo de pacientes en varios países, entre ellos España.

## DISMINUCIÓN FISIOLÓGICA DE LA SECRECIÓN DE GH CON LA EDAD (SOMATOPAUSIA)

La secreción de GH y los niveles plasmáticos de IGF-I disminuyen con la edad de forma parecida a como veremos mas adelante que hace la melatonina,

presentando los ancianos niveles muy disminuidos respecto de los de individuos jóvenes (51). Este hecho, unido a los cambios metabólicos y de composición corporal que acompañan al envejecimiento, como disminución de masa muscular y ósea, aumento de la adiposidad, etc., ha llevado a relacionar dichos cambios metabólicos con la disminución de GH e IGF-I, llegándose a acuñar el término "somatopausia" para referirse a este fenómeno(58). Por tanto, podría considerarse el envejecimieto como una forma fisiológica de "déficit de GH del adulto".

Se ha intentado dilucidar el posible mecanismo de esta disminución de la secreción de GH. La hipótesis más verosímil parece ser aquella que apunta al hipotálamo como punto en el que se genera la somatopausia. Así, la disminución de la liberación de GHRH (59) y/o un aumento de la producción de SS (60) podrían ser los responsables de la disminución de los niveles de GH. Es también necesario recordar que la secreción de GH depende del sueño de ondas lentas (61). Con la edad, se produce una disminución de la duración de esta fase del sueño, provocado entre otros por una disminución de la secreción de la melatonina (62). Este fenómeno podría estar relacionado con la disminución de la producción de GH que se observa con la edad.

A partir del trabajo de Rudman y cols. (63), que se ha convertido en un "clásico", se ha planteado la terapia sustitutiva con GH en ancianos, y la mayoría de los estudios demuestran sus efectos beneficiosos. Así, la administración de GH a dosis bajas en hombres mayores de 60 años restaura los niveles de IGF-I hasta prácticamente los que existen en jóvenes (64) y, como veremos, parece tener efectos beneficiosos evidentes. Por ejemplo modifica la composición corporal y los niveles de lípidos plasmáticos en ancianos, ya que aumenta la masa magra, disminuye la masa grasa, reduce los niveles de colesterol y mejora la relación HDL/LDL (63,65). Pero esta terapia no está exenta de efectos secundarios que han de ser tenidos en cuenta. Así, tratamientos a dosis elevadas durante períodos de tiempo prolongados pueden producir disminución de la sensibilidad a la insulina e intolerancia a la glucosa, síndrome del túnel carpiano y retención de líquidos, si bien estos síntomas son poco frecuentes y de entidad menor a las dosis usuales(63,66).

Los experimentos con animales corroboran estos datos. Así, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que el tratamiento con GH a ratas viejas, tanto machos como hembras, disminuye la proporción de grasa corporal y aumenta la masa magra (67,68). Además de tener efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular (69) sobre la piel (70) y sobre la función inmunitaria (71,72).

## MELATONINA

La melatonina es una hormona de naturaleza indólica secretada básicamente por la glándula pineal, aunque también está presente en otros tejidos, donde ejerce probablemente un efecto local o paracrino. La melatonina está íntimamente implicada en la regulación de los ritmos biológicos, si bien en los últimos años ha sido objeto de mayor atención por parte de la comunidad científica a raíz del descubrimiento de sus propiedades antioxidantes.

La glándula pineal (73) está constituida fundamentalmente por *pinealocitos*, que constituyen el 80% del componente celular de la glándula en los mamíferos. En el hombre adulto, pesa 100-200 mg. Es un importante regulador de los ritmos biológicos anuales y circadianos, y constituye el nexo entre las señales luminosas del medio ambiente y los sistemas nervioso central y endocrino, a través de la secreción de la hormona *melatonina*, cuya producción está regulada por el estado de iluminación ambiental.

La melatonina se sintetiza a partir de triptófano, primeramente a través de su hidroxilación y decarboxilación a serotonina, y luego mediante la N-acetilación y O-metilación de la serotonina a melatonina. Se secreta desde la glándula pineal hacia la circulación, donde presenta un ritmo circadiano, con máximos durante el periodo de oscuridad. La producción de melatonina responde primariamente a estímulos lumínicos así, dicha producción está regulada por la longitud del fotoperiodo y es evidente durante la oscuridad. (32, 73). De esta forma, la información sobre el estado de luz/oscuridad ambiental llega a la glándula pineal y determina el ciclo de la síntesis de melatonina.

Dada su naturaleza hidro y lipofílica y su pequeño tamaño, atraviesa todas las membranas celulares con facilidad, llegando hasta el "último rincón" del organismo, como pueden ser las mitocondrias (73). Como se comentó anteriormente, la melatonina presenta un ritmo circadiano, con valores máximos nocturnos, con un pico máximo entre las 2 y las 6 de la mañana. La amplitud del ritmo de melatonina está influenciado por factores como la edad, disminuyendo de forma progresiva hasta ser muy baja en ancianos (73, 74).

## ACCIONES DE LA MELATONINA

La función más conocida de la melatonina es su papel como regulador de los ciclos biológicos, a través de la codificación de la señal luminosa constituida por la longitud del fotoperiodo en una señal bioquímica. Se constituye así en uno de los

sincronizadores internos más importantes, al modular la actividad del núcleo supraquiasmático, que parece ser el "marcapasos central" o "reloj biológico" (32).

En este sentido, la melatonina parece estar implicada en fenómenos como la sincronización circadiana, la inducción del sueño, la regulación de la temperatura corporal y también la regulación del sistema inmunitario (73, 74).

Las propiedades antioxidantes de la melatonina dependen tanto de su efecto directo sobre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno como de su acción sobre la expresión y actividad de enzimas involucrados tanto en la defensa antioxidante como en la generación de radicales libres. Descritas por primera vez a principios de la década de los 90 (75,76), se sabe que la melatonina actúa como neutralizador directo de diversas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como el radical $^{\bullet}OH$, el $H_2O_2$, el $^1O_2$, el ión $ONOO^-$, el radical $LOO^{\bullet}$, el peroxinitroso (ONOOH), incluso el NO (32,74, 77,78,79), a través de mecanismos independientes de receptor.

El hecho de que la melatonina sea una molécula pequeña lipo- e hidrofílica hace que atraviese las barreras biológicas y las membranas celulares con facilidad, difundiendo a todos los compartimentos intracelulares y concentrándose especialmente en el núcleo y la mitocondria, lugares en los que la producción de radicales libres es más intensa y el daño oxidativo, de repercusiones más importantes. En definitiva, la melatonina es capaz de llegar hasta el mismo lugar donde se generan los radicales libres, neutralizándolos antes de que puedan difundir y dañar estructuras celulares. Pero, además de sus acciones como neutralizador directo de radicales libres, la melatonina también actúa como antioxidante indirecto, induciendo la síntesis y reciclaje enzimático del glutatión reducido (GSH) mediante la estimulación de la actividad de los enzimas implicados en estos procesos Glutation peroxidas (GPx,) glutatión reductasa (GRd) y glutatión 6 fosfato deshidrogenasa (G6P-DH,) que genera el NADPH que emplea la GRd como cofactor a través de mecanismos mediados por receptor. Además, también estimula la expresión de la superoxidodismutasa (SOD) y la actividad de la catalasa, que son otros enzimas implicados en los procesos de detoxificación de radicales libres (30, 74, 78, 79). Nuestro grupo ha corroborado todos estos resultados habiendo demostrado una acción especifica a nivel tanto hepático, como cardiaco (80,81), y dérmico (70).

## MELATONINA Y ENVEJECIMENTO

En humanos, los niveles de melatonina en plasma comienzan un descenso a partir de los 25-35 años, y a la edad de 40-60 años se tienen unos niveles que son

un 35-50% de los presentes en individuos jóvenes (74, 82) Y casi más llamativo que la reducción de los niveles es la disminución del pico nocturno (83), limitando su capacidad de sincronización de los ritmos circadianos. De hecho, a partir de los 40-50 años comienzan a alterarse y desincronizarse nuestros ritmos, lo que genera alteraciones funcionales, conductuales y de adaptación, que constituyen signos de envejecimiento (74). Paralelamente a esta disminución de la secreción de melatonina, se produce un incremento de la tasa de producción de radicales libres, y una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes, como SOD, GRd, y GPx, que están en parte regulados por la propia melatonina. El papel relevante de la melatonina en la regulación del estrés oxidativo parece cada día más evidente.

Por último, mencionar que se ha encontrado una correlación entre los niveles séricos de melatonina y la capacidad antioxidante total del suero en humanos y en ratas, y ambos parámetros disminuyen de forma paralela con la edad. Por tanto, parece que la reducción de los niveles séricos de melatonina se correlacionan con una disminución de la capacidad del suero para neutralizar los radicales libres y especies reactivas (84). Asumiendo reducciones tisulares similares en los niveles de melatonina, cabe especular que uno de los factores por los que los individuos viejos presentan un mayor daño oxidativo podría ser la disminución de la producción de melatonina inducida por la edad (78).

## EFECTOS DE LA GH Y LA MELATONINA SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO EN EL ENVEJECIMIENTO

### Efecto del tratamiento con GH

Los efectos neuroprotectores de la GH se han visto considerablemente consolidados a la luz de los hallazgos obtenidos por numerosos grupos en los últimos años. La GH es un reconocido factor neuroprotector no sólo del SNC sino también de la médula espinal en animales jóvenes (16, 17,18, 19) e incluso es capaz de impedir la pérdida neuronal en el hipocampo tras una lesión de hipoxia-isquemia de carácter unilateral (19).

En nuestro laboratorio hemos estudiado el efecto de la GH sobre el SNC y mas concretamente se ha determinado el número de neuronas en el hilus del giro dentado en cortes de cerebro sometidos a tinción de Nissl. También se ha determinado la neurogénesis utilizando tinciones con Bromodesoxi Uridina (BrdU). La utilización del disector óptico permite contar las neuronas en cortes del hilus del giro dentado del hipocampo teñidos con azul de Nissl. Se ha visto que en esta estructura existen diferencias en el número de neuronas entre machos y hembras a

FIGURA 1.-A. *Evolucion del numero de neuronas totales del hilus del giro dentado con la edad y efecto del tratamiento con GH*. B. *Efecto de la edad sobre la neurogénesis en funcion del numero de células BrdU positivas y ausencia de efcto del tratamiento con GH*.

favor de los primeros a todas las edades estudiadas ($p<0.01$). (26, 85). Dentro de cada sexo, el número de neuronas en el hilus se mantiene en un nivel similar entre los 3 y los 22 meses de edad. Por el contrario, hay una pérdida neuronal significativa entre los 22 y los 24 meses de similar magnitud en ambos sexos ($p<0.01$) similar a la reportada anteriormente por Shetty y Turner (5). (Fig. 1A)

No se han encontrado diferencias significativas en el número de neuronas entre las ratas hembras castradas y sin castrar (26) a pesar de lo que podría pensarse de los datos de la literatura (86, 87).

Si estudiamos las células BrDU positivas que suponen un indicador de neurogénesis, pasamos de alrededor de 3000 nuevas células a los 2 meses de edad a 80 células nuevas a los 24 meses con pocas diferencias entre sexos, y de nuevo sin que la ovariectomía tenga un efecto importante (88). (Fig. 1B)

En todos nuestros estudios el tratamiento con GH se administra durante 10 semanas a los 22 meses de vida tanto a, ratas machos como también a dos gru-

pos de ratas hembras, uno castrado desde los 12 meses y otro que permanece intacto. Los parámetros analizados en el grupo de los machos son el número total de neuronas del hilus del giro dentado tras el tratamiento, el recuento de células BrdU(+) en el giro dentado y la estimación de los niveles de nucleosomas y de Bcl-2 en un homogenado cerebral. En las hembras tanto castradas como intactas, se analizan estos mismos parámetros pero se va un poco más lejos al realizar algunas determinaciones bioquímicas que permiten sugerir la participación de ciertos mecanismos de acción a nivel molecular como consecuencia del tratamiento crónico con GH. Así, en los dos grupos de hembras se han realizado determinaciones de los niveles de expresión de caspasa 3 y 9 en sus isoformas activa e inactiva; de la expresión de dos enzimas antioxidantes como son Mn-SOD y GPx y por último, de la expresión de sirtuina (Sir2).

El tratamiento con GH (7) permite observar un incremento significativo de las neuronas totales a los 24 meses pero no aumenta el número de células BrDU positivas por lo que el efecto parece ser antiapoptótico (26) como ya habían sugerido otros autores (28, 89) (Figs. 1 A y B). Esto parece confirmarse con la disminución que puede observarse en los indicadores de apoptosis como son los nucleosomas, la caspasa 9 y la caspasa 3 y el incremento de las sustancias antiapoptoticas como Bcl 2 o Sirtuina como ha podido verse en homogeneizados de cerebro.Hay que señalar un hecho muy significativo, este fenómeno se aprecia por igual en los tres grupos de animales analizados, es decir en machos, hembras intactas y hembras ovariectomizadas (Figs. 2 A y B).

En el grupo de hembras castradas observamos, por otra parte, dos fenómenos. En primer lugar, que los niveles de caspasa-3 y caspasa-9 en hipocampo son significativamente menores que en las hembras intactas de su misma edad. Esto podría indicar que en ausencia de estrógenos endógenos, la apoptosis que reflejan los niveles elevados de nucleosomas debe tener lugar por mecanismos distintos a la participación de caspasa-3 y caspasa-9, que sería interesante estudiar en el futuro. Además no se aprecia efecto alguno del tratamiento con GH sobre los niveles de caspasa-9 y caspasa-3. Este hecho es fácilmente explicable, pues si la expresión de ambas es baja en los animales no tratados hace difícil pensar que estén interviniendo en el proceso de apoptosis en el hipocampo y es lógico no obtener un descenso adicional tras el tratamiento. Asimismo, esta ausencia de respuesta a la administración de la GH podría deberse a la disminución de la presencia de estrógenos, pues no ocurre en las hembras castradas y sí en las intactas que mantienen sus estrógenos endógenos ováricos.

Los mecanismos implicados en este fenómeno de neuroprotección de la GH a nivel del hipocampo en animales viejos deben aún ser estudiados en profun-

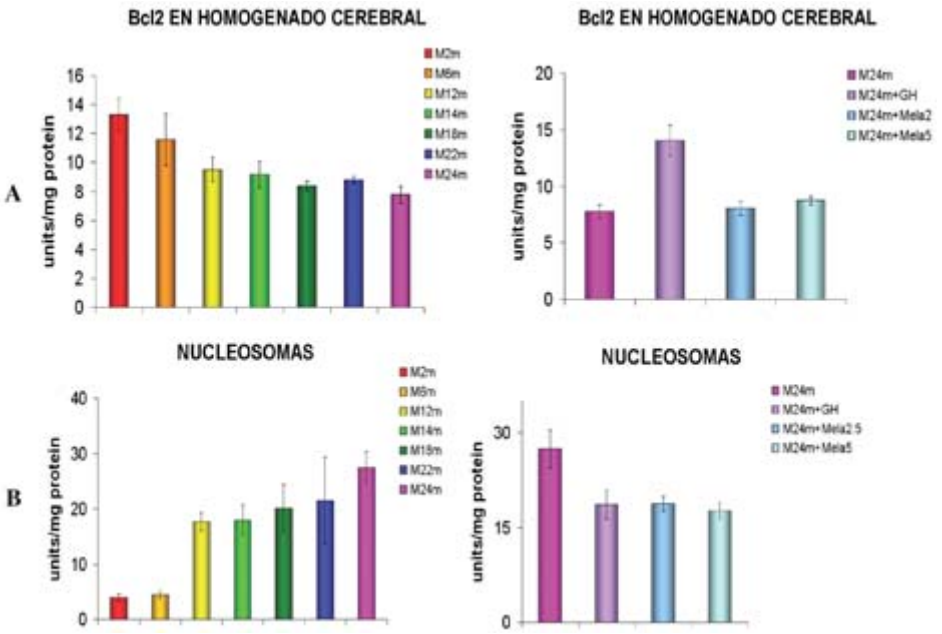



FIGURA 2.-A. *Evolucion de los niveles de BCL2 en homogenado de cerebro de rata y efecto estimulante de la GH sobre estos, con ausencia de efecto de la melatonina*. B. *Evolución de los nucleosomas como indicadores de apoptosis en el cerebro y disminución de los mismos tras el tratamiento con GH o melatonina*.

didad pero podemos apuntar algunas hipótesis. En animales jóvenes, los efectos neuroprotectores de la GH parecen estar mediados, por lo menos en parte, por la activación de los receptores de GH (19). Es decir, habría que pensar en una posible acción directa de la GH sobre las neuronas a través de sus receptores en las diversas estructuras cerebrales. En relación a esta posibilidad encontramos varios estudios que apoyan esta idea. Vázquez y cols. (90) han demostrado que la GH es capaz de ejercer una acción mitogénica induciendo un aumento en la expresión del péptido c-myc, un marcador del ciclo celular que sincroniza la transición de la fase GO-G1 del ciclo celular a la fase S, en la síntesis del ADN. Esta sincronización de las células en la misma fase (fase S) del ciclo celular podría hacerlas más resistentes a los daños infligidos por estrés oxidativo al que a lo largo de la vida se ve expuesto el cerebro senescente. Otro posible mecanismo de neuroprotección sería la proliferación de las células gliales causada por la GH, debido al papel fundamental ejercido por la glía en el intercambio de iones entre las células de la corteza y el espacio intercelular (91). De hecho, se sabe que *in vitro* la glía ejerce una función protectora al captar el glutamato extracelular y disminuye así su toxicidad para las células presentes en los cultivos (92).

Por otro lado, hay que tener en consideración que la administración de GH a ratas viejas incrementa la expresión de IGF-I en el cerebro (29), incluyendo el hipocampo (28), y sus niveles circulantes en sangre (93). Numerosos estudios han demostrado que el IGF-I revierte la disminución de receptores tipo NMDA asociada al envejecimiento y en particular el de sus subtipos NMDAR2a y NMDAR2b (94) e incrementa la función del receptor D2 mejorando tanto la memoria espacial como la de trabajo (95). Un estudio de Lynch y cols. (96) en el que analizan la utilización de glucosa por el cerebro tras la administración de IGF-I, muestra como este aumenta su tasa de utilización en determinadas regiones cerebrales. Por lo tanto, se puede decir que el IGF-I ayuda a evitar la disminución de la función glutamatergica en el cerebro senescente (96). En resumen, de todos los estudios previamente citados, podemos deducir que el IGF-I, junto con otros factores neurotróficos, juega un papel fundamental en la prevención del envejecimiento cerebral.

Dado que el IGF-I es un reconocido factor neuroprotector para las neuronas hilares (97, 98), es lógico suponer que el incremento de su producción local puede mediar efectos neuroprotectores de la GH. Se debe considerar la posibilidad de que la GH ejerza su neuroprotección de forma indirecta a través del incremento de IGF-I. De los datos de Carson et al (99) y Beck et al (100) se deduce que número y tamaño neuronal dependen de los niveles de IGF-I. Más concretamente, Trejo y cols. (101,102) aportan datos de observaciones recientes en los que ratones deficientes en IGF-I presentan una reducción en el número de neuronas. Asimismo, estos autores sugieren que la supervivencia neuronal parece depender de la kinasa sérica Akt, molécula relacionada con la vía de supervivencia neuronal estimulada por IGF-I (103). Por lo tanto, el restablecimiento con GH de los niveles de IGF-I disminuidos con el envejecimiento es capaz de generar neuroprotección (104,105,106, 107). Esto mismo ocurre en el hígado donde tras observarse una disminución de IGF 1 en los hepatocitos con la edad, se puede ver que viene acompañado de un aumento del estrés oxidativo. Esto se traduce en un incremento significativo de la peroxidacion lipídica (LPO), del oxido nitrico (NO), del monoxido de carbono (CO) y del guanosilmonofosfato cíclico (cGMP), con una disminución significativa del adenosil trifosfato (ATP). La administración de GH restablece los niveles de IGF 1 hasta conseguir alcanzar los de animales jóvenes por lo que la administración de GH ejerce efectos beneficiosos contra los cambios relacionados con la edad (108).

De cualquier forma el efecto mas importante observado tras la administración de la GH, consiste en la inhibición de la apoptosis en los cerebros de los animales viejos. Tanto en machos como en hembras castradas e intactas, se observa un

claro descenso en el número de nucleosomas, es decir, un descenso en el grado de apoptosis que se produce en el homogenado de cerebro total. De la misma forma, se aprecia como los niveles de Bcl-2 se incrementan de forma muy marcada en todos los animales que reciben el tratamiento con GH. Este incremento puede deberse a la puesta en marchas de varias vías de señalización intracelulares que pueden activarse por la GH directamente o a través del IGF-I, cuyos niveles tanto plasmáticos como de expresión en SNC aumentan tras la administración de GH sistémica (28). Resulta muy complejo evidenciar qué efectos tienen lugar por acción directa de la GH y cuáles están mediados por el IGF-I.

Se sabe desde hace tiempo que la principal vía por la que el IGF-I inhibe la apoptosis es a través de la PI3-quinasa, que a su vez fosforila a la Akt/proteína quinasa B (Akt/PKB) (28, 109, 110). La activación de esta vía tiene lugar tanto a través de IGF-I como a través de GH (28) y da lugar a tres fenómenos. Por un lado se fosforila Bad (111), y dado que en su forma fosforilada no es capaz de unirse a las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, deja a esta última libre y capaz de ejercer sus efectos, bloqueando la inducción de la apoptosis. Este podría ser el responsable de que por un lado exista un descenso en los procesos apotóticos en nuestro homogenado cerebral como así lo reflejan los niveles de nucleosomas, y que por otro lado aumenten los niveles de Bcl-2, dado que al disminuir los niveles de Bad capaz de unirse a él, va a existir mayor cantidad de Bcl-2 libre capaz de ejercer sus efectos antiapotóticos. Asimismo, se sabe que Akt/PKB es capaz de activar al factor de transcripción CREB (112) y éste a su vez estimula la expresión de Bcl-2 (113). Por lo tanto, a través de la activación de Akt/PKB por parte del IGF-I se produce un aumento en los niveles de Bcl-2. Este podría ser uno de los mecanismos por los que aumentan los niveles de Bcl-2 en los cerebros de nuestras ratas viejas tratadas con GH. El otro fenómeno que tiene lugar como consecuencia de la fosforilación de PI3-quinasa y Akt/PKB es la inhibición de la caspasa-9. Hay que señalar a este respecto que la propia Bcl-2 es, a su vez, responsable de los niveles bajos de caspasa-9, dado que al ejercer sus efectos anti-apoptóticos y proteger la integridad de la membrana mitocondrial no permite la salida al citosol del citocromo C, con lo que bloquea la activación de la caspasa 9 iniciadora de la apoptosis.

En nuestro estudio obtenemos resultados que concuerdan con este hecho, dado que en el grupo de hembras intactas tratadas con GH podemos apreciar como en el hipocampo la expresión de caspasa-9 tanto activa como inactiva está claramente disminuida en comparación con los de las hembras de su misma edad que no reciben tratamiento alguno. El descenso igualmente evidente de los niveles de las isoformas activa e inactiva de la caspasa-3 en el hipotálamo, podría

deberse probablemente al hecho de que al estar disminuidos los niveles de caspasa-9 no se produce el reclutamiento de la caspasa-3 para llevar a cabo los fenómenos de apoptosis en la neurona.

Hay que mencionar también como mecanismo de inhibición de apoptosis la activación de las MAPKs, por GH que dan lugar a la activación de CREB y también estimula la expresión de Bcl-2 (110). Ambos mecanismos explicarían el aumento de Bcl-2 en los animales de este estudio que son tratados con GH. Por otro lado, existen evidencias en la literatura de que Bad puede llegar a fosforilarse, o por lo menos a estabilizarse en su forma fosforilada, a través de la activación de MAPK (114), lo que también impediría que ejerza sus efectos pro-apoptóticos.

Por último, hay otro mecanismo que permite la inhibición de la apoptosis a través de la acción del IGF-I, que implica la activación de Raf-1 y su posterior translocación a la mitocondria (109), lo que daría lugar a la fosforilación de Bad en colaboración con la Bcl-2 (115, 116).

Desde otro punto de vista a nivel del hipocampo se produce con la edad un incremento de los indicadores de inflamación como son un aumento de TNF alfa y de IL 6 así como de NFkB. Este incremento, también observado en el envejecimiento de otros tejidos como el hígado (117, 118, 119) disminuye de forma significativa tras el tratamiento con GH (Figs. 3 A y B).

La primera vez que se documentó la interacción de las vías de señalización de IGF-I y estradiol a nivel cerebral fue en 1988 (120) en cultivos primarios de hipotálamos de ratas fetales. Asimismo, se ha comprobado que los receptores de IGF-I y de estradiol cooperan para estimular el crecimiento dendrítico en cultivos primarios de hipotálamo de ratas (121) y en la inducción de plasticidad sináptica en el hipotálamo de ratas hembras adultas (122). Por otra parte, se ha visto una co-localización muy extensa de receptores estrogénicos y de IGF-I en el cerebro de la rata adulta (123). Es más, los receptores de IGF-I se co-localizan con ambas isoformas $\alpha$ y $\beta$ de los ERs. Esta abundante coexpresión de los receptores estrogénicos y del IGF-I sugiere que pueda existir interacción de sus vías de señalización en varias regiones del SNC.

Evidencias experimentales de la interacción que ocurre entre el IGF-I y los estrógenos se encuentran en numerosos estudios *in vitro* en los que cultivos celulares neuronales son expuestos a agentes que o bien inhiben la síntesis de IGF-I o las vías de señalización de la PI3K y las MAPK o incluso son incubados con antagonistas del receptor estrogénico (121, 124). La conclusión es que la activación coordinada, por parte de ambas sustancias de las vías de señalización, es necesaria para la supervivencia neuronal.

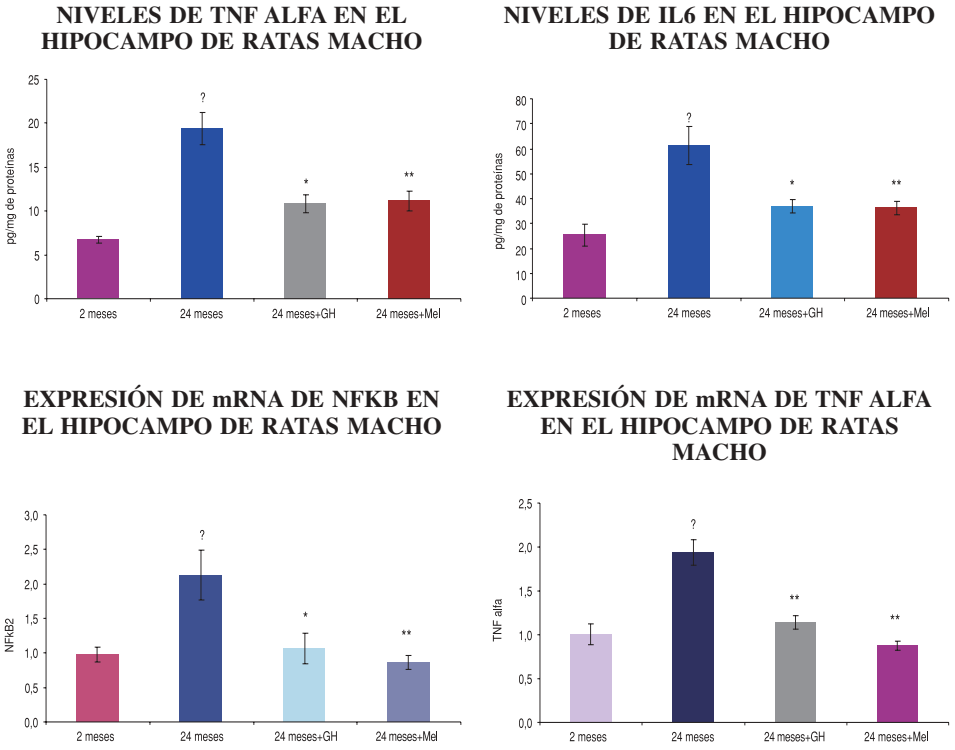



FIGURA 3. *Efecto de la GH y la melatonina sobre marcadores de inflamación en el hipocampo. En todos los casos hay un incremento significativo con la edad que disminuye marcadamente tras ambos tratamientos.*

Si tenemos en cuenta que el estradiol aumenta los niveles locales de IGF-I que a su vez activan a sus propios receptores, se va a producir un incremento de la neuroprotección. Otras moléculas que podrían estar involucradas en la convergencia de las acciones del IGF-I y del estradiol son las de las proteínas de la familia de las Bcl-2, dado que ambas sustancias son capaces de inducir la expresión de dicha proteína anti-apoptótica en el cerebro de la rata adulta (125;126, 127, 128).

Un hecho particularmente interesante con respecto a la interacción del IGF-I y el estradiol es la localización de los ERs involucrados en la neuroprotección. Los receptores para IGF-I se detectan en el hilus del giro dentado y disminuye su número tras la provocación de lesiones como la que produce el ácido kaínico (129). Por el contrario, ni los ERα ni ERβ se expresan

en las neuronas hilares. Se cree por lo tanto, que los efectos neuroprotectores de los estrógenos estén mediados por los efectos transinápticos de neuronas que se proyectan hacia el hilus. Se ha demostrado co-localización de receptores de IGF-I y ERβ en astrocitos presentes en el hilus, sugiriendo que probablemente las células de la glia tendrían un papel en la coordinación de las acciones de estas dos sustancias para llevar a cabo sus efectos neuroprotectores.

Como se menciona al inicio de este apartado, se ha realizado también un estudio de la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo en los tres grupos de animales. Tras el recuento de células BrdU(+) en los animales tratados con GH se aprecia que no hay modificación alguna en comparación con los animales controles. Es decir, ni en machos ni en hembras intactas o castradas la GH es capaz de estimular la neuronogénesis. Estos datos no concuerdan con los datos presentes en la bibliografía disponible. Dos de los estudios más significativos (130, 131) han demostrado en los últimos años que la administración tanto intracerebroventricular como periférica de IGF-I aumenta la neuronogénesis en ratas adultas y viejas respectivamente. Ante esta aparente contradicción con nuestros resultados hay que matizar dos cuestiones: por un lado la vía de administración de la IGF-I y por otro la duración del tratamiento. Los animales del estudio de Aberg (130), tienen una edad mucho menor que los nuestros (4 meses) y la duración del tratamiento con este factor, es de sólo 20 días en el mayor de los casos. El estudio de Lichtenwalner *et al*. (131), utiliza animales de 28 meses pero la vía de administración es completamente diferente al realizarse de forma intracerebroventricular y por lo tanto alcanzarse concentraciones de IGF-I muchísimo más elevadas que las que podemos conseguir nosotros mediante la administración periférica de GH. Por otro lado, este tratamiento dura también en el mayor de los casos 42 días. Por lo tanto, en estos experimentos se ha estudiado los efectos de tratamientos mas agudos mientras que nosotros lo hemos hecho en un tratamiento crónico y cuasi fisiológico administrado durante 10 semanas, tiempo durante el que han podido producirse fenómenos que impidan a la GH y al IGF-I ejercer sus efectos promotores de la neuronogénesis hipocampal.

Este fenómeno sugiere un posible efecto inhibidor de la GH sobre la neurogénesis cuando se administra de forma crónica, inhibición que incluso llega a imponerse sobre el comprobado efecto inductor del estradiol, cuando ambos se administran conjuntamente. Posiblemente nos encontremos de nuevo frente a un entrecruzamiento de vías de señalización de IGF-I y estrógenos que consigue anular los efectos de estos últimos.

En el presente trabajo se ha estudiado asimismo el efecto que tiene la administración de GH sobre la expresión de dos de las enzimas implicadas en la protección antioxidante celular: Mn-SOD y GPx. En las hembras castradas los niveles de Mn-SOD permanecen inalterados, conservando por lo tanto niveles parecidos a los de las hembras de su misma edad intactas y, en consecuencia, también a los de las hembras jóvenes de 2 meses. Es decir, la expresión de Mn-SOD en nuestro estudio no se ve afectada ni por el proceso de envejecimiento ni por la presencia o ausencia de estrógenos endógenos.

El caso de la GPx es diferente: por un lado, se observa como en las hembras de 24 meses castradas se produce un significativo descenso en su expresión. Por otro lado, tras el tratamiento con GH los niveles de expresión de GPx aumentan hasta cerca de 4 veces más que en las hembras castradas no tratadas. Estos dos hechos podrían significar que por un lado, el envejecimiento en ausencia de estrógenos endógenos implica un evidente descenso en la expresión de la enzima antioxidante GPx y que, por otro, el tratamiento con GH es capaz de estimular la expresión de esta enzima hasta valores próximos a los de las hembras intactas jóvenes de 2 meses. Posiblemente la importancia biológica de este hallazgo radique en que el incremento de GPx tras la administración de GH pueda ser considerada uno de los mecanismos implicados en la conservación del número total de neuronas observado en nuestro estudio.

Existen datos en la bibliografía que respaldan los efectos generados por la administración de GH en relación con las defensas antioxidantes. GH e IGF-1 han demostrado ser capaces de reducir el estrés oxidativo y mejorar las defensas antioxidantes en diversos modelos experimentales en los que el daño oxidativo está implicado, como la cirrosis hepática inducida por CCl4 (132) o el daño térmico (133). En estos modelos y en otros de envejecimiento hepático investigados por nuestro grupo (108), la administración de GH o IGF-1 es capaz de reducir la peroxidación lipídica, mantiene los niveles de GSH, aumenta la actividad de enzimas antioxidantes, mejora la función mitocondrial aumenta la producción de ATP y preserva la función hepática. Por otra parte, se ha demostrado que la disminución en la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo intermediario y de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial inducida por la edad puede ser revertida con la administración de GH (134).

En resumen, la mejoría de uno de los mecanismos antioxidantes de los que disponen las células como es la GPx, parece señalar que la administración de GH podría ejercer un efecto beneficioso sobre el daño oxidativo restableciendo las defensas antioxidantes disminuidas con el envejecimiento. Sin embargo, existe una gran controversia en referencia a la posible relación entre envejecimiento, estrés

oxidativo y GH. Varios estudios han mostrado un incremento del estrés oxidativo y una reducción de las defensas antioxidantes y de la expectativa de vida en ratones transgénicos que sobreexpresan GH, mientras que aquellos que carecen de GH, IGF-1 o de sus efectos (135, 136, 137, 138) presentan el efecto contrario. Todos estos datos no son concluyentes, ya que los resultados presentados no muestran un claro patrón de exceso de estrés oxidativo inducido por las hormonas del eje somatotropo (136, 137). De hecho, otros trabajos llevados a cabo en ratones knock-out para el receptor de GH, un modelo de "déficit aislado" de GH, no han sido capaces de demostrar que la mayor expectativa de vida de estos animales se deba a una mayor actividad de enzimas antioxidantes y un menor daño oxidativo; es más, estos animales presentan algunos indicios de mayor daño oxidativo que los ratones normales (139). Algunas de las discrepancias respecto de los efectos beneficiosos o dañinos de la GH sobre el envejecimiento pueden estar relacionadas con el diferente efecto de esta hormona en función de la dosis administrada o los niveles plasmáticos alcanzados: cantidades fisiológicas pueden ejercer efectos beneficiosos (69, 108, 117, 140, 141), mientras que un exceso patológico puede conducir a una situación de enfermedad y envejecimiento acelerado (,135,138, 142,143,) como ocurre en la acromegalia. Y, por último, no se debe olvidar que algunos de estos modelos animales han sido manipulados genéticamente, lo cual puede estar introduciendo algún sesgo en los resultados obtenidos. Con el régimen empleado en el presente estudio en el que se ha intentado restablecer niveles fisiológicos , no solo no se ha detectado un incremento de la morbi-mortalidad respecto de los animales no tratados , sino una mejoría evidente de la función no solo cerebral sino también de muchos otros parámetros fisiológicos.

Se han analizado también resultados relativos a la expresión de la Sir2 en el cerebro de dos subpoblaciones de hembras viejas intactas y ovariectomizadas. En las primeras la expresión de Sir2 permanece similar a la de las hembras de 2 meses y el tratamiento con GH no produce modificación alguna sobre su grado de expresión. Sin embargo, en el caso de las hembras viejas castradas apreciamos como la expresión de Sir2 disminuye de forma muy marcada en comparación con las hembras intactas de su misma edad . Nuevamente, por tanto, nos encontramos frente a un caso de "desprotección" en las hembras que carecen de estrógenos endógenos. En estas hembras el tratamiento con GH sí produce un aumento muy significativo de la expresión de Sir2. Estos hallazgos conducen a realizar diversas consideraciones: por un lado, que el envejecimiento produce un descenso en la expresión de Sir2 sólo en las hembras que presentan una depleción crónica de estrógenos endógenos y no en las hembras viejas intactas. Por otro lado, el tratamiento de GH aún en ausencia de estrógenos endógenos es capaz de revertir los valores de expresión de Sir2 prácticamente a

valores similares a los de las hembras intactas, y en consecuencia a los de las hembras jóvenes de 2 meses. De cualquier forma, no existen datos previos en la literatura a este respecto.

Hay que resaltar que estos resultados pueden posiblemente esclarecer otro de los mecanismos a través de los que actúa la GH para permitir una mayor supervivencia del número total de neuronas hilares que observamos en nuestros animales. Es decir, el aumento de la expresión de la Sir2 generado por el tratamiento con GH podría estar directamente relacionado con la conservación de la población de neuronas hilares que se aprecia en nuestro estudio. Como ya comentamos en la introducción, existen varios hallazgos que sugieren la posibilidad de que Sir2 incremente la capacidad para detoxificar especies reactivas de oxígeno, consiguiendo aumentar la resistencia al daño oxidativo y que este se atenúe en consecuencia (144). En la misma línea, varios autores (145, 146, 147) demuestran que la activación de Sir-2 ejerce un efecto neuroprotector. De hecho, en uno de estos estudios (148) se ha conseguido demostrar como la SIRT1 es capaz de proteger a las neuronas de la apoptosis inducida por la proteína p53. Por todo ello, no sería de extrañar que este fuera un mecanismo importante de neuroprotección en las neuronas hilares.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran como el tratamiento de GH ejerce un claro efecto neuroprotector a través de la inhibición de la apoptosis en el tejido del SNC estudiado y los mecanismos antiapoptóticos que desencadena pueden implicar a varias vías de señalización intracelular como la de la PI-3-quinasa-Akt/PKB, la de la activación de la MAPK o la de la traslocación mitocondrial de Raf1. Todas ellas se encuentran relacionadas y van a tener como consecuencia última la modificación de los niveles de las moléculas implicadas en la cascada de la apoptosis, ya sea disminuyendo la expresión de las caspasas o aumentando los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2 anti-apoptóticas y disminuyendo los de las pro-apoptóticas. También puede observarse una disminución de los indicadores de estrés oxidativo como es el caso de LPO, iNOS o de aumento de los antioxidantes como Sir 2 y de la inflamación reflejada en valores de citoquinas o TNFα.

**Efecto del tratamiento con Melatonina sobre el SNC**

Ya se ha descrito anteriormente como ciertos parámetros del SNC de los animales viejos de 24 meses. evolucionan de forma negativa con el envejecimiento. Se ha visto como el número de neuronas hilares del hipocampo de las ratas

machos de 24 meses era significativamente menor que el de las ratas más jóvenes de 22 meses. Se han evaluado los efectos del tratamiento crónico con melatonina sobre este parámetro y no se produce modificación alguna tras las 10 semanas de tratamiento. Es decir, la melatonina no es capaz de mantener el número de neuronas hilares en valores similares a los presentados por animales más jóvenes, permaneciendo prácticamente iguales a los de los machos de su misma edad que no han sido tratados. Sin embargo al analizar las células BrdU(+) reflejo de la neuronogénesis en el hipocampo de los animales de experimentación, se observa que el tratamiento con melatonina aumenta considerablemente y de forma estadísticamente significativa la proliferación celular (Fig. 4A).

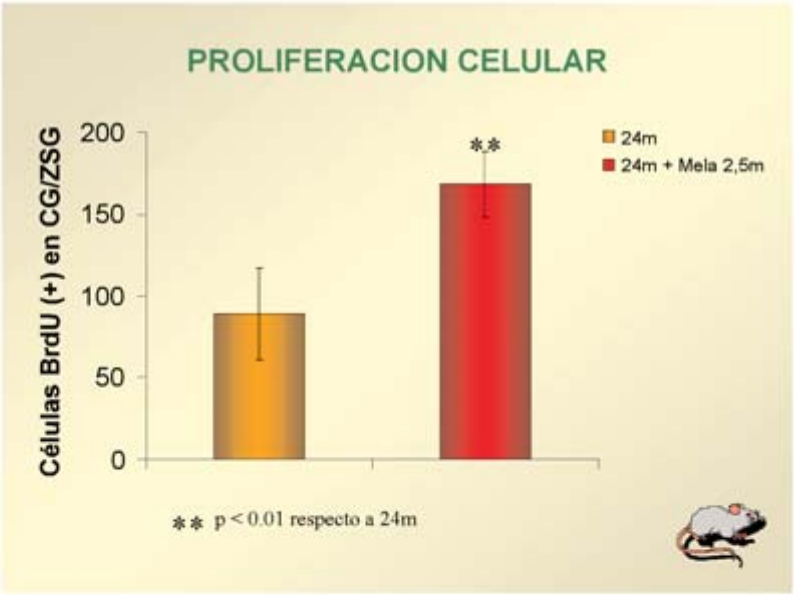
Se pudo comprobar igualmente como con el paso del tiempo aumenta el número de nucleosomas hasta alcanzar valores máximos a los 24 meses. En el caso de los animales tratados con melatonina, observamos como el tratamiento es capaz de reconducir los niveles a valores significativamente menores que los de los machos de 24 m. que no han sido tratados, queriendo esto decir, que la melatonina de alguna forma disminuye la apoptosis en el hipocampo.

La proteína anti-apoptótica Bcl-2 en estos mismos homogenados cerebrales disminuyen con la edad hasta alcanzar valores mínimos en los animales de 24 meses. Tras el tratamiento crónico con melatonina, sorprendentemente, no se aprecia un incremento en los niveles de esta proteína Sin embargo este hecho no resulta contradictorio con el descenso en los niveles de nucleosomas, dado que la apoptosis no tiene por qué deberse obligatoriamente a un aumento de la protección frente a la apoptosis por parte de la proteína Bcl-2. Sin embargo si que disminuyen los indicadores de inflamación en el hipocampo (Figs. 3 A B) de la misma forma que con GH y en forma similar a la observada en otros tejidos (80, 81, 141).

En conclusión, los efectos neuroprotectores observados por el tratamiento con melatonina en los SNC de nuestras ratas machos de 24 meses se resumen en un aumento significativo de la neuronogénesis y un descenso en los fenómenos de apoptosis a pesar de no producirse a través del incremento de proteína anti-apoptótica Bcl-2, una disminución del estrés oxidativo y un descenso de la inflamación (Figs. 3 A y B).

Hasta hace poco tiempo, el único efecto que se conocía de la melatonina sobre la proliferación celular provenía de estudios en líneas celulares de cáncer de mama, en los que la melatonina actuaba de forma directa suprimiendo su proliferación (149). Sin embargo estudios recientes han demostrado esto no es siempre así. Danilova y cols. (150) demuestran que la melatonina estimula la proliferación celular en el embrión del pez cebra, y que el mecanismo responsable

A




B

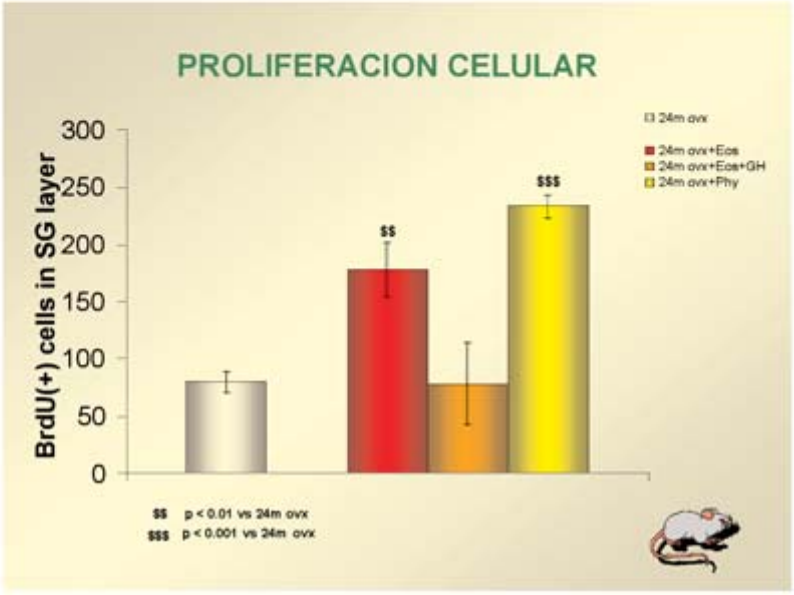



FIGURA 4. *Efecto del tratamiento con Melatonina sobre la proliferación celular en el hipocampo (A). Efecto similar de los estrógenos y Fitoestrógenos (B).*

actúa a través de receptores específicos para la misma. De hecho, estudios previos que aportan datos muy prometedores como promotora de la proliferación celular (151, 152), sugieren la implicación directa del receptor MT2, teniendo en cuenta que los esplenocitos de ratones knock-out para el receptor MT1, consiguen proliferar en respuesta a su administracion. Por lo tanto, es muy probable que el efecto estimulador de la melatonina sobre la proliferación celular, dependerá del tipo de receptor que predomina en el tejido en cuestión: es decir, la relación MT1/MT2 en un tejido. Esto determinaría su grado de proliferación celular en respuesta al tratamiento. Se ha descrito también otro posible mecanismo de estimulación de la proliferación celular. Si el efecto celular predominante tras la activación de los receptores MT, es el descenso de los niveles de AMPc, y éste por otra parte, es un conocido intermediario de la regulación del ciclo y la proliferación celular, todo ello sugiere la posible implicación de la vía del AMPc en la estimulación de la proliferación melatonina dependiente (150, 153). Por último, existe un reciente trabajo publicado por Kim y cols. (154) en el que se estudia el efecto de la melatonina en el giro dentado del hipocampo de ratas que han sido separadas de sus madres antes del destete. Es capaz de estimular de forma evidente y significativa la proliferación neuronal en el giro dentado de los animales tratados.

Con respecto a los efectos sobre la apoptosis, nuestros datos resultan concordantes con los hallazgos de otros autores. De hecho, en el estudio de Osborne y cols. (155) realizado en células pigmentarias epiteliales de la retina, la melatonina es capaz de reducir de forma significativa la apoptosis sin evidenciarse valores elevados de Bcl-2. Por lo tanto, una de las posibilidades que se nos plantean es la de que la inhibición de la apoptosis o bien no se realice a nivel de la vía mitocondrial y se haga a nivel de la vía de activación de los receptores de muerte o bien que, aún llevándose a cabo a nivel de la vía mitocondrial, no necesite de la participación de las proteínas Bcl-2. Si la actuación de la melatonina se realiza a nivel de la vía extrínseca, es decir, la vía de activación de los receptores de muerte, esta sustancia podría intervenir a cualquier nivel de dicha vía de activación.

Esta ruta se inicia con la participación de la caspasa-8 que, tras ser reclutada por los receptores de muerte una vez activados por la unión a su ligando, activa a la pro-caspasa-3 que se convierte en caspasa-3 y es la molécula que finalmente ejecuta el programa de muerte celular. Se podría por lo tanto especular que la acción de la melatonina se lleva a cabo a cualquiera de estos niveles, ya sea a nivel de la unión de los receptores de muerte con sus ligandos, que son moléculas estructuralmente relacionadas que pertenecen a la superfamilia del

factor de necrosis tumoral (TNF); o bien a nivel de cualquiera de los pasos intermedios entre la formación de la caspasa-8 y la ejecución por parte de la caspasa-3. Hemos visto nosotros como disminuyen precisamente los niveles de TNFα en distintos tejidos de los animales tratados con melatonina ( 80,117). Por otro lado, la melatonina podría actuar directamente sobre la vía mitocondrial que, a groso modo, se basa en la liberación del citocromo C por parte de la mitocondria tras haber sufrido algún tipo de daño o desgaste (como el daño oxidativo por la exposición a radiaciones ionizantes o a toxinas), que posteriormente activa a la caspasa-9 que termina activando a su vez a la caspasa-3, que finalmente ejecuta la muerte celular. Es por lo tanto muy posible, como hemos podido comprobar que una posible intervención de la melatonina, como potente antioxidante endógeno, es evitar la liberacion del citocromo C por la mitocondria para impedir el proceso de apoptosis(140 y 141 )protegiendo así frente al estrés oxidativo tan elevado que presentan las mitocondrias del tejido cerebral de animales tan viejos. Esta opción ha sido también sugerida por Sainz y cols. (156), que apunta a que la capacidad protectora anti-apoptótica de la melatonina se debe a su actuación no sólo como antioxidante directo o indirecto de los radicales libres presentes en el interior de la célula, sino también como activador del complejo mitocondrial I y IV. Asimismo, el grupo de Acuña et al (157, 158) han observado efectos similares.

En cualquier caso parece lógico pensar que el principal mecanismo antiapoptótico que la melatonina utiliza en el caso de los cerebros senescentes, esté basado en sus propiedades antioxidantes. De hecho, el SNC es un órgano especialmente vulnerable a la acción de los radicales libres y los cerebros de estos animales tan viejos, están expuestos a ellos en mayor medida que en animales más jóvenes. Esta especial y elevada vulnerabilidad del SNC se debe a varios factores como el elevado consumo de oxígeno que en él tiene lugar; el abundante tejido lipídico que contiene, constituido en su mayor parte por ácidos grasos poliinsaturados; la elevada proporción de superficie ocupada por membranas celulares en comparación con el citoplasma; la morfología axonal que resulta más proclive a las lesiones oxidativas; y en particular, la escasa capacidad antioxidante endógena del propio cerebro habida cuenta de la situación de riesgo oxidativo tan pronunciada en la que se encuentra.

A pesar de esto, el SNC cuenta con una batería de sistemas de defensa celular para contrarrestar las acciones deletéreas de los radicales libres de oxígeno. Hay antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos capaces de disminuir la concentración de radicales libres y reparar el daño celular oxidativo provocado. En el cerebro encontramos enzimas como la catalasa, la peroxidasa o la superóxido dismutasa; an-

tioxidantes de bajo peso molecular como los carotenoides o el ácido ascórbico; y, por último, agentes quelantes directos de radicales libres que funcionan como protectores biológicos específicos de moléculas esenciales, capaces de neutralizar las especies reactivas (159). Por su parte la melatonina presenta ciertas características biológicas que la convierten en una sustancia particularmente apropiada para el desempeño de tareas neuroprotectoras en el cerebro. De hecho se trata de una sustancia tanto hidrofílica como lipofílica, capaz por tanto de atravesar todo tipo de barreras morfofisiológicas y de entrar en células y compartimentos subcelulares sin problema alguno. Por lo tanto, se trata de una sustancia capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y penetrar de forma sencilla hasta compartimentos celulares fundamentales para la funcionalidad de la neurona como pueden ser las mitocondrias o el núcleo. Fue Ianas (75) el primero en sugerir que la melatonina pudiera ser una sustancia quelante de radicales libres, es decir, una molécula con propiedades antioxidantes directas sobre diversos radicales libres tales como el radical peroxilo, el radical hidroxilo o su precursor, el peróxido de hidrógeno. La melatonina presenta otra característica que le confiere una particular utilidad como antioxidante, y es la de ser capaz de generar la denominada cascada antioxidante, por la que los intermediarios de las reacciones de neutralización de la melatonina, son a su vez potentes antioxidantes capaces de neutralizar a su vez más radicales. No hay que olvidar, por otra parte, el fundamental papel que desempeña la melatonina en la estimulación de la actividad de varias enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa o la glutatión reductasa (159).

Con respecto a este último aspecto hay que señalar que uno de los parámetros estudiados ha sido la expresión en cerebro de dos enzimas antioxidantes: Mn-SOD y GPx. Las mediciones se han llevado a cabo en hembras intactas de 2 y 24 meses., en hembras castradas de 24 meses y en hembras castradas e intactas de 24 meses tratadas con melatonina. En las hembras intactas, no se aprecian diferencias en la expresión de Mn-SOD ni de GPx en las hembras de 24 meses. con respecto a las hembras jóvenes de 2 meses Es decir, el envejecimiento no es capaz de modifica la expresión de ninguna de estas dos enzimas antioxidantes en el caso de las hembras intactas. El tratamiento con melatonina en estos animales tampoco ejerce efecto alguno, y la expresión de GPx y Mn-SOD no se altera. En las hembras castradas de 24 meses., la expresión de Mn-SOD es casi idéntica a la de las hembras de su misma edad que permanecen intactas. El tratamiento con melatonina tampoco modifica la expresión de la Mn-SOD en las hembras viejas castradas. O sea, que la expresión de Mn-SOD no disminuye ni por la edad ni por la castración y, por otro lado, que el tratamiento con melatonina no altera su expresión. Sin embargo la expresión de GPx en las hembras de 24 meses sí disminuye de forma drástica tras la castra-

ción en comparación con las hembras intactas. El tratamiento con melatonina en las hembras castradas, no ejerce efecto alguno sobre su expresión, manteniéndose los mismos niveles que en las hembras castradas no tratadas. Todo esto lo que sugiere es que las hembras intactas son capaces de conservar el nivel de expresión de GPx, mientras que en las hembras castradas disminuye. La melatonina, a pesar de tener la capacidad de estimular la expresión y actividad de un gran número de enzimas antioxidantes (entre las que la bibliografía demuestra que se encuentra la GPx), no consigue activar la expresión de la GPx en los homogenados cerebrales de la hembras castradas de 24 meses. Esto hace pensar en una posible implicación de los estrógenos endógenos, sin los cuales los niveles de GPx no consiguen mantenerse en las hembras castradas y terminan cayendo, y sin los que la melatonina no es capaz de estimular de forma efectiva la expresión de esta misma enzima.

Habíamos tambien visto anteriormente que a nivel del hipocampo se produce con la edad un incremento de los indicadores de inflamación como son un aumento de TNF alfa y de IL 6 así como de NFkB. Este incremento, también había sido observado en el envejecimiento de otros tejidos como el hígado (117,118,119). El tratamiento con melatonina disminuye de forma significativa todos estos parámetros ( Fig 3 A y B ).

## CONCLUSIONES

De los datos anteriormente mencionados se deduce que la mayoría de las alteraciones que aparecen a nivel cerebral con el paso del tiempo, ocurren en función del incremento del estrés oxidativo y de la inflamación.

La disminución de GH y melatonina que ocurren con el envejecimiento pueden ser al menos parcialmente responsables de dichas alteraciones ya que tienen un papel antiinflamatorio y antioxidante bien establecido. De esta forma su administración exógena a niveles fisiológicos, como tratamiento de sustitución terapéutica, es capaz de revertir al menos en parte algunas de las alteraciones observadas.

## BIBLIOGRAFÍA

(1) Keuker, J.I., Luiten, P.G., Fuchs E. 2003. Preservation of hippocampal neuron numbers in aged rhesus monkeys. Neurobiology of Aging. v. 24, p. 157-165.

(2) Long, J.M., Mouton, P.R., Jucker, M., Ingram, D.K. 1999. What counts in brain aging? Design-based stereological analysis of cell number. J. Gerontol. A Biol Sci. Med. Sci., v. 54, p. B407-417.

(3) Merrill, D.A., Chiba, A.A., Tuszynski, M.H. 2001. Conservation of neuronal number and size in the enthorinal cortex of behaviorally characterized aged rats: J. Comp Neurol., v. 438, p. 445-456.

(4) West, M.J., Slomianka, L., Gundersen H.J. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in thesubdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. Anat. Rec., v. 231, p. 482-497.

(5) Shetty, A.K., Turner, D.A. 1999. Vulnerability of the dentate gyrus to aging and intracerebroventricular administration of kainic acid. Exp. Neurol, 158: 491-503.

(6) Geinisman, Y., Ganeshina, O., Yoshida, R., Berry, R.W., Disterhoft, J.F., Gallagher, M. Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. Neurobiol Aging. 2004; 25(3): 407-16.

(7) Nyberg, F. 2000. G.H. in the Brain: Characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. Frontiers in Neuroendocrinology, 21: 330-348 .

(8) Bjork, S., Jonsson, B., Westphal, O., Levin, J.E. 1989. Quality of life of adults with growth hormone deficiency: a controlled study. Acta Paediatr Scand Suppl., 356: 55-59.

(9) Hayashi, M., Shimohira, M., Saisho, S., Shimozawa, K., Iwakawa, Y. 1992. Sleep disturbance in children with growth hormone deficiency. Brain Dev., 14: 170-174.

(10) Rosen, T., Eden, S., Larson, G., Wilhelmsen, L., Bengtsson, B.A. Cardiovascular risk factors in adult patients with growth hormone deficiency. Acta Endocrinol (Copenh). 1993; 129: 195-200.

(11) Bengtsson, B.A., Eden, S., Lonn, L., Kvist, H., Stokland, A., Lindstedt, G., Bosaeus, I., Tolli, J., Sjostrom, L., Isaksson, O.G. 1993. Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. J Clin Endocrinol Metab., 76: 309-317.

(12) Burman, P., Broman, J.E., Hetta, J., Wiklund, I., Ehrfurt, E.M., Hagg, E., Karlsson, F.A. 1995. Quality of life in adults with GH deficiency. Responses to treatment with rh GH in a placebo controlled 21 months trial. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80: 3585-3590.

(13) Burman, P., Deijen, J.B. 1998. Quality of life and cognitive function in patients with pituitary insufficiency. Psychother Psychosom., 67: 154-167.

(14) Deijen, J.B., de Boer, H., van der Veen, E.A. 1998. Cognitive changes during growth hormone replacement in adult men. Psychoneuroendocrinology, 23: 45-55.

(15) Gibney, J., Wallace, J.D., Spinks, T., Schnorr, L., Ranicar, A., Cuneo, R.C., Lockhart, S., Burnand, K.G., Salomon, F., Sonksen, P.H., Russell-Jones, D. 1999. The effects of 10 years of recombinant human growth hormone (GH) in adult GH-deficient patients. J. Clin Endocrinol Metab., 84: 2596-2602.

(16) Gustafson, K., Hagberg, H., Bengtsson, B.A., Brantsing, C., Isgaard, J. 1999. Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. Pediatr Res., 45: 318-323. .

(17) Nyberg, F., Sharma, H.S. 2002. Repeated topical application of growth hormone attenuates blood-spinal cord barrier permeability and edema formation following spinal cord injury: an experimental study in the rat using Evans blue, ([125]) I-sodium and lanthanum tracers. Amino Acids, 23: 231-239.

(18) Scheepens, A., Williams, C.E., Breier, B.H., Guan, J., Gluckman, P.D. 2000. A role for the somatotropic axis in neural development, injury and disease. J. Pediatr Endocrinol Metab., 13 Suppl 6: 1483-1491.

(19) Scheepens, A., Sirimanne, E.S., Breier, B.H., Clark, R.G., Gluckman, P.D., Williams, CE. 2001. Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. Neuroscience, 104: 677-687.

(20) Lamberts, S.W., van den Beld, A.W., van der Lely, A.J. 1997. The endocrinology of aging. Science, 278: 419-424.

(21) Erickson, C.A., Barnes, C.A. 2003. The neurobiology of memory changes in normal aging. Exp Gerontol., 38: 61-69.

(22) Gallagher, M., Bizon, J.L., Hoyt, E.C., Helm, K.A., Lund, P.K. 2003. Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment. Exp Gerontol., 38: 71-77.

(23) Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. 2003. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. Prog Neurobiol., 69: 143-179.

(24) Burgess, N., Maguire, E.A., O'Keefe, J. 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron, 35: 625-641.

(25) Morrison, J.H., Hof, P.R. 2002. Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. Prog Brain Res., 136: 467-486.

(26) Azcoitia, I., Perez-Martín, M., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Garcia-Segura, L.M., Tresguerres, JAF. 2005. Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. Neurobiology of Aging, 26: 697-703.

(27) Salazar Nussio, V. Efectos del tratamiento con GH sobre el envejecimiento del SNC. Tesis Doctoral UCM, 2005.

(28) Frago, L.M., Paneda, C., Dickson, S.L., Hewson, A.K., Argente, J., Chowen, J.A. 2002. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-

like growth factor I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. Endocrinology, 143: 4113-4122.

(29) López-Fernández, J., Sánchez Franco, F., Velasco, B., Tolón, R.M., Paros, F., Cacicedo, L. 1996. GH induces SS. and IGF-I gene expressión in the cerebral hemispheres of aging rats. Endocrinology, 137: 4384-4391.

(30) Reiter, R.J., Tan, D.X., Cabrera, J., *et al*. 1999. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. Biological Signals and Receptors, 8: 56-63.

(31) Reiter, R.J. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. Prog Neurobiol., 56: 359-384.

(32) Reiter, R.J. 2003. Melatonin: clinical relevance. Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 17: 273-285.

(33) Manda, K., Bhatia, A.L. 2003. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. Cell Biol Toxicol., 19: 367-372.

(34) Luskey, K.L. 1992. Growth and development. In textbook of Endocrine Physiol. Eds. J.E. Griffin and S.R. Ojeda. Oxford University Press, pp. 211-223.

(35) Hadley, M.E. 1992. Pituitary Hormones. In Endocrinology. Edit. Prentice-Hall International Editions. McE. Hadley ed.

(36) Tannenbaum, G.S., Ling, N. 1984. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. Endocrinology., 115(5): 1952-7.

(37) St Pierre, D.H., Wang, L., Tache, Y. 2003. Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. News Physiol Sci., v. 18, p. 242-246.

(38) Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., Kangawa, K. 2001. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the GH secretagogue receptor. Trends in Endocrinol. & Metabolism, 12: 118-121.

(39) Devesa, J., Tresguerres, JAF. Control de la secreción de GH. En: Retrasos del crecimiento, 2.ª ed. Moreno y Tresguerres eds. Ed. Díaz de Santos, Madrid (1996), pp. 45-60).

(40) Arce ,Vázquez V., Devesa Múgica, J. Hormona de crecimiento. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E., Devesa Múgica J., Moreno Esteban B. (eds.). Editorial Síntesis, Madrid 2000; pp. 337-378.

(41) Lima, L., Arce, V., Diaz, M.J., Tresguerres, J.A., Devesa, J. 1993. Glucocorticoids may inhibit growth hormone release by enhancing beta-adrenergic responsiveness in hypothalamic somatostatin neurons. J. Clin Endocrinol Metab., 76(2): 439-44.

(42) García Barros, M., Devesa. J.G.H., Proteínas transportadoras, Receptores, Acciones biológicas. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. Tresguerres JAF,

Aguilar Benítez de Lugo, E., Devesa Múgica, J., Moreno Esteban, B. (eds.). Editorial Síntesis, Madrid 2000; pp. 379-418.

(43) Tresguerres, JAF. Somatomedinas y sus proteinas transportadoras. Retrasos del crecimiento. 1996, p. 61.

(44) Hughes, J.R., Friesen, H.G. 1985. The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone. Ann. Rev. Physiol., 47: 469-482.

(45) Davidson, M.B. 1987. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. Endocrine Rev., 8: 115-122.

(46) Tresguerres, JAF. Hormona de crecimiento y envejecimiento. 1998. An. R. Acad. Nac. Medicina, CXV: 907-922.

(47) Isaksson, OGP, Lindahl, A., Nilsson, A., Isgaard, J. 1988. Action of growth hormone: current views. Acta Pediat. Scand., 343: 12-18.

(48) Hew, F.L., Oneal, D., Kamarudin, N., Alford, F.P., Best, J.D. Growth hormone deficiency and cardiovascular risk. En: Clinical Endocrinology and Metabolism. (1998) Edit. Bailliere's. S.M. Shalet Ed. Vol. 12 nº 2.

(49) Degerblad, M., Bengstsson, B.A., Bramnert, M., Johnell, O., Manhem, P., Rosen, T., Thoren, M. 1995. Reduced bone mineral density in adults with GH deficiency: Increase bone turnover during 12 months of GH substitution therapy. Eur J. Endocrinol., 133: 180-188.

(50) Rosen, T., Bengtsson, B.A. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. The Lancet 1990; 336: 285-288.

(51) Toogood, A.A., Shalet, S.M. 1998. Aging and growth hormone status. Baillieres Clin. Endocrino.l Metab., 12: 2, 281.

(52) Jorgensen, JOL, Pedersen, S.A., Thuesen, L., Jorgensen, J., Moller, J., Müller, J., Skakkaback, E.N., Christiansen J.S. 1991. Long-term GH treatment in GH deficient adults. Acta Endocrinol., 125: 449-453.

(53) Jorgensen, JOL, Thuesen, L., Müller, J., Ovensen, P., Skakkaback, EN, Christiansen, J.S. 1994. Three years of GH treatment in GH deficient adults: near normalization of body composition and physical performance. Eur. J. Endocrinol., 130: 224-228.

(54) Salomon, F., Cuneo, R.C., Hesp, R., Sönksen, P.H. 1989. The effects of treatment with recombinant human GH on body composition and metabolism in adults with GH deficiency. N. Engl. J. Med., 321: 1797-1803.

(55) Weaver, J.U, Monson, J.P., Noonan, W.G., Edwards, J.A., Evans, K.A. Cunningham, J. "The effect of low dose recombinant hGH replacement on regional fat dis-

tribution, insulin sensitivity and cardiovascular risk factors in hypopituitary adults. J. Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 153-159.

(56) Amato, G., Carella, C., Fazio, S., La Montagna, G., Cittadini, A., Sabini, D., Maricano-Mome, C., Sacca, L., Bellstela, A. 1993. Body composition, bone metabolism and heart structure and function in GH deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. J. Clin. Endocrinol. Metab., 77: 1671-1676.

(57) Nass, R., Huber, R.M., Klaus, V., Müller, O.A., Schopohl, J., Strasburger, C.J. 1995. Effect of hGH replacement therapy on physical work capacity and cardiac and pulmonary function in pacients with hGH deficiency acquired in adulthood. J. Clin. Endocrinol. Metab., 80: 552-557.

(58) Hoffman, A.R., Pyka, G., Lieberman, S.A., Ceda, G.P., Marcus, R. The somatopause. En. Growth hormone and somatomedins during lifespan. Müller E.E., Cocchi D., Locatelli V. (eds.). Springer Berlin (1993) 265-274.

(59) Ono, M., Miki, N., Shizume, K. 1986. Release of inmunoreactive growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin from incubated hypothalamus in young and old male rats. (Abstract). Neuroendocrinology, 43: 111.

(60) Locatelli, V., Cella, S.G., Loche, S., Pintor, C., Müller, E.E. Growth hormone releasing effect of hpGRF-40 in rats at different time intervals following ablation of the mediobasal hypothalamus. Life Sci. 1984; 35(19): 1989-95.

(61) Van Cauter, E., Plat, L. 1996. Physiology of GH secretion during sleep. The Journal of Pediatrics, 128: 532-537.

(62) Copinschi, G., Van Cauter, E. 1995. Effects of ageing on modulation of hormonal secretion by sleep and circadian rhytmicity. Horm Res., 43: 20-24.

(63) Rudman, D., Feller, A.G., Nagraj, H.S., Gergans, G.A., Lalitha, P.Y., Goldberg A.F., Schlenker, R.A., Cohn, L., Rudman, I.W., Mattson, D.E. 1990. Effects of human GH in men over 60 years old. N. Engl. J. Med., 323: I-6.

(64) Cuttica, C.M., Castoldi, L., Gorrini, G.P., Peluffo, F., Delitalia, G., Filippa, P., Fanciulli, G., Giusti, M. 1997. Effects of six-month administration of rhGH to healthy elderly subjects. Aging, 9: 193-197.

(65) Angelopoulos, T.J., Seip, R.L., Cole, T.G. 1998. Effect of short-term recombinant GH administration on plasma lipoproteins in elderly adults. Gerontology, 44: 228-231.

(66) Holloway, L., Butterfield, G., Hintz, R.L., Gesundheit, N., Marcus, R. Effects of recombinant hGH on metabolic indices, body composition and bone turnover in healthy elderly women. J. Clin Endocrinol. Metab. 1994; 79: 470-479.

(67) Ariznavarreta, C., Tresguerres, J.A.F. "Human recombinant growth hormone". En: Novel therapeutic proteins. Dembowsky K. and Stadler P. (eds.). Wiley-VCH (2001) pp. 60-85.

(68) Ariznavarreta, C., Castillo, C., Segovia, G., Mora, F., Azcoitia, I., Tresguerres, JAF. 2003. Growth hormone and aging. Homo, vol. 54: 132-141.

(69) Castillo, C., Cruzado, M., Ariznavarreta, C., Gil-Loyzaga, P., Lahera, V., Cachofeiro, V., Tresguerres, JAF. 2003. Body composition and vascular effects of growth hormone administration in old female rats. Experimental Gerontology, 38(9): 971-9.

(70) Tresguerres, A.F. Efecto de tratamientos Hormonales Crónicos sobre el Envejecimiento Cutáneo. Tesis Doctoral Facultad de Medicina, UCM (2005).

(71) Baeza, I., Alvarado, C., Ariznavarreta, C., Castillo, C., Tresguerres, Jaf. de la Fuente, M. 2008. Effect of GH treatment on lymphocyte functions in old male rats. J. Neuroimmunomodulation, 15: 282-287.

(72) Baeza, I., Alvarado, C., Alvarez, P., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Tresguerres, JAF, De la Fuente, M. 2009. Improvement of leukocyte functions in ovariectomized old rats after treatment with growth hormone, melatonin, estrogens and phytoestrogens. J. Reproductive Immunology, 80: 70-79.

(73) Cardinali, D.P., Brusco, L.I., Cutrera, R.A. Ritmos biológicos. En: Tratado de endocrinología básica y clínica. Tresguerres JAF, Aguilar Benítez de Lugo E., Devesa Múgica J., Moreno Esteban B. (eds.). Editorial Síntesis, Madrid 2000; pp. 163-189.

(74) Acuña-Castroviejo, D., Escames Rosa, G., León López, J., Khady, H.. Melatonina, ritmos biológicos y estrés oxidativo. En: Longevidad. Tratado integral sobre la salud en la segunda mitad de la vida. Salvador-Carulla L., Cano Sánchez A., Cabo-Soler J.R. (eds.). Editorial Médica Panamericana, Madrid 2004; p. 216-224.

(75) Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I. 1991. Melatonin involvement in oxidative processes. Rom J. Endocrinology, v. 29, p.117-123.

(76) Tan, D.X., Reiter, R.J., Manchester, L.C., Yan, M.T., El-Sawi M., Sainz R.M., Mayo J.C., Kohen R., Allegra M., Hardeland R. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad-spectrum antioxidant and free radical scavenger. Curr. Top. Med. Chem., 2: 181-198.

(77) Reiter, R.J., Tan, D.X., Cabrera, J., *et al*. 1999. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. Adv. Exp. Med. Biol., 467: 379-387.

(78) Reiter, R.J., Tan, D.X., Burkhardt, S. 2002. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. Mech Ageing Dev., 123: 1007-1019.

(79) Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. J. Biomed. Sci., 7: 444-458.

(80) Castillo, C., Salazar, V., Ariznavarreta, C., *et al*. 2005. Effect of melatonin administration on parameters related to oxidative damage in hepatocytes isolated from old Wistar rats. J. Pineal Res, 38: 240-246.

(81) Kireev, R.A., Tresguerres, ACF., García, C., Ariznavarreta, C., Vara, E., Tresguerres, JAF. 2008. Melatonin is able to prevent the liver of old castrated female rats from oxidative and proinflammatory damage. J. Pineal Research, 45;394-402.

(82) Kennaway, D.J., Lushington, K., Dawson, D., Lack, L., van den Heuvel, C., Rogers, N. Urinary 6-sulfatoxymelatonin excretion and aging: new results and a critical review of the literature. J. Pineal Res. 1999; 27: 210-220.

(83) Magri, F., Sarra, S., Cinchetti, W., Guazzoni, V., Fioravanti, M., Cravello, L., Ferrari, E. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians. J. Pineal Res. 2004; 36: 256-261.

(84) Benot, S., Goberna, R., Reiter, R.J., Garcia-Maurino, S., Osuna, C., Guerrero, J.M. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. J. Pineal Res. 1999; 27: 59-64.

(85) Andrade, J.P., Madeira, M.D., Paula-Barbosa, M.M. 2000. Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation. Brain Res., v. 875, p. 125-137.

(86) Woolley, C.S., McEwen, B.S. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. J. Neurosci, v. 12, p. 2549-2554.

(87) Gould, E., Woolley, C.S., Frankfurt, M., McEwen, B.S. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. J. Neurosci., v. 10, p. 1286-1291.

(88) Hilton, G.D., Nunez, J.L., McCarthy, M.M. 2003. Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. Neuroscience, v. 116, p. 383-391.

(89) Le Grevès, M., Steensland, P., Le Grevès, P., Nyberg F. Growth hormone induces age-dependent alteration in the expression of hippocampal growth hormone receptor and N-methyl-D-aspartate receptor subunits gene transcripts in male rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99(10): 7119-23.

(90) Vazquez, I., Gomez-De-Segura, I.A., Grande, A.G., Escribano, A., Gonzalez-Gancedo, P., Gomez, A., Diez, R., De Miguel, E. 1999. Protective effect of enriched diet plus growth hormone administration on radiation-induced intestinal injury and on its evolutionary pattern in the rat. Digestive Diseases and Sciences, v. 44, p. 2350-2358.

(91) Haimovitz-Friedman, A., Vlodavsky, I., Chaudhuri, A., Witte L., Fuks Z. 1991. Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. Cancer Res., v. 51, p. 2552-2558.

(92) Noel, F., Tofilon, P.J. 1998. Astrocytes protect against X-ray-induced neuronal toxicity in vitro: Neuroreport, v. 9, p. 1133-1137.

(93) Castillo, C., Cruzado, M., Ariznavarreta, C. *et al*. 2005. Effect of rh GH administration on body composition and vascular function and structure on old Wistar male rats. Biogerontology, 6: 303-312.

(94) Sonntag, W.E., Bennett, S.A., Khan, A.S., Thornton, P.L., Xu, X.W., Ingram, R.L., Brunso-Bechtold J.K. 2000. Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. Brain Research Bulletin, v. 51, p. 331-338.

(95) Thornton, P.L., Bennet, S.A., Sonntag, W.E. 1998. Insulin-like growth factor regulates activity of dopamine D2 receptors in aged animals. Soc. Neurosci, Abstract, v. 24, p. 1765.

(96) Lynch, C.D., Lyons, D., Khan, A., Bennett, S.A., Sonntag W.E. 2001. Insulin-like growth factor-1 selectively increases glucose utilization in brains of aged animals: Endocrinology, v. 142, p. 506-509.

(97) Azcoitia, I., Sierra, A., García Segura, L.M. 1999. Neuroprotective effect of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor I signalling. J. Neurosci. Res., 58(6): 815-822.

(98) Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., Torres-Aleman, I. 2001. Circulating insulin-like growth factor-I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. J. Neurosci, v. 21, p. 5678-5684.

(99) Carson, M.J., Behringer, R.R., Brinster, R.L., Mcmorris, F.A. 1993. Insulin-Like Growth Factor-I Increases Brain Growth and Central-Nervous-System Myelination in Transgenic Mice. Neuron, v. 10, p. 729-740.

(100) Beck, K.D., Powellbraxton, L., Widmer, H.R., Valverde, J., Hefti, F. 1995. Igf1 Gene Disruption Results in Reduced Brain Size, Cns Hypomyelination, and Loss of Hippocampal Granule and Striatal Parvalbumin-Containing Neurons. Neuron, v. 14, p. 717-730.

(101) Trejo, J.L., Carro, E., Lopez-Lopez, C., Torres-Aleman, I. 2004. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. Growth Horm. IGF. Res., v. 14 Suppl. A, p. S39-S43.

(102) Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Alemán, I. 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercice-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. J. Neurosci., 21: 1628-1634.

(103) Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R.J., Cooper, G.M., Segal R.A., Kaplan D.R., Greenberg M.E. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. Science, v. 275, p. 661-665.

(104) Morrison, J.H., Hof, P.R. 1997. Life and death of neurons in the aging brain. Science, v. 278, p. 412-419.

(105) Calhoun, M.E., Kurth, D., Phinney, A.L., Long, J.M., Hengemihle, J., Mouton P.R. 1998. Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. Neurobiology of Aging, v. 19, p. 599-606.

(106) Smith, D.E., Roberts, J., Gage, F.H., Tuszynski, M.H. 1999. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 96, p. 10893-10898.

(107) Tang, Y., Lopez, I., Baloh, R.W. 2001. Age-related change of the neuronal number in the human medial vestibular nucleus: A stereological investigation. Journal of Vestibular Research-Equilibrium & Orientation, v. 11, p. 357-363.

(108) Castillo Carmen, Veronica Salazar, Carmen Ariznavarreta, Elena Vara, Jesus, A.F. Tresguerres. 2004. Effect of recombinant human growth hormone on age-related hepatocyte changes in old male and female wistar rats. Endocrine, 25(1): 33-9.

(109) Peruzzi, F., Prisco, M., Dews, M., Salomoni, P., Grassilli, E., Romano, G., Calabretta, B., Baserga, R. 1999. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor-I receptor in protection from apoptosis. J. Mol. Cell. Biol., v. 19, p. 7203-7215.

(110) Garcia-Segura, L.M., Cardona-Gomez, G.P., Chowen, J.A., Azcoitia, I. 2000. Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. J. Neurocytol, v. 29, p. 425-437.

(111) Datta, S.R., H. Dudek, X., Tao, S., Masters, H.A., Fu, Y., Gotoh, M.E. Greenberg, 1997, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery: Cell, v. 91, p. 231-241.

(112) Du, K., M. Montminy, 1998, CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB: J Biol Chem., v. 273, p. 32377-32379.

(113) Pugazhenthi, S., E. Millers, C., Sable, P., Young, K.A., Heidenreich, L.M., Boxer, JEB Reusch, 1999, Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein: Journal of Biological Chemistry, v. 274, p. 27529-27535.

(114) Scheid, M.P., V. Duronio, 1998, Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of bad and activation of PKB/akt: Involvement of MEK upstream of bad phosphorylation: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 95, p. 7439-7444.

(115) Wang, H.G., T. Miyashita, S. Takayama, T. Sato, T. Torigoe, S. Krajewski, S. Tanaka, L. Hovey, III, J. Troppmair, U.R. Rapp, 1994, Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase: Oncogene, v. 9, p. 2751-2756.

(116) Wang, H.G., U.R. Rapp, J.C Reed, 1996, Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria: Cell, v. 87, p. 629-638.

(117) Kireev, R.A., Tresguerres, A.C., Garcia, C., Borras, C., Ariznavarreta, C., Vara, E., Vina, J., Tresguerres, J.A. Hormonal regulation of pro-inflammatory and lipid peroxidation processes in liver of old ovariectomized female rats. Biogerontology. 2009 Jul 26.

(118) Kamada, M., Irahara, M., Maegawa, M. *et al*. (2001) Postmenopausal changes in serum cytokine levels and hormonereplacement therapy. Am J. Obstet Gynecol 184: 309–314.

(119) Yasui, T., Maegawa, M., Tomita, J., Miyatani, Y., Yamada, M. *et al*. (2007) Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. Maturitas 56: 396-403.

(120) Torres-Aleman, I. Pons, S. Arévalo, M.A. "The IGF I System in the rat cerebellum: Developmental Regulation and Role in Neuronal Survival and differenciation". J. of Neuroscience Research 39: 117-126 (1994).

(121) Duenas, M., I. Torres-Aleman, F. Naftolin, L.M. Garcia-Segura, 1996, Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation: Neuroscience, v. 74, p. 531-539.

(122) Fernández-Galaz, M.D., F. Naftolin, L.M. Garcia-Segura, 1999, Phasic synaptic remodeling of the rat arcuate nucleus during the estrous cycle depends on insulin-like growth factor-I receptor activation: Journal of Neuroscience Research, v. 55, p. 286-292.

(123) Cardona-Gomez, G.P., L. Doncarlos, L.M. Garcia-Segura, 2000, Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain: Neuroscience, v. 99, p. 751-760.

(124) García-Segura, L.M., I. Suarez, S. Segovia, P.A. Tranque, J.M. Cales, P. Aguilera, 1998c, The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids: Brain Res, v. 456, p. 357-363.

(125) García-Segura, L.M., M. Duenas, M.C. Fernandez Galaz, J.A. Chowen, J. Argente, F. Naftolin, I. Torresaleman, 1996, Interaction of the signalling pathways of insulin-like growth factor-I and sex steroids in the neuroendocrine hypothalamus: Hormone Research, v. 46, p. 160-164.

(126) Fernández, A.M., González de la Vega, A. And Torres Alemán, I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. Neurobiology, vol. 95: 1253-1258 (1998).

(127) Dubal, D.B., P.J. Shughrue, M.E. Wilson, I. Merchenthaler, P.M. Wise, 1999b, Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: A potential role for estrogen receptors: Journal of Neuroscience, v. 19, p. 6385-6393.

(128) Wise, P.M., K. Scarbrough, G.H. Larson, J.M. Lloyd, N.G. Weiland, S.F. Chiu, 1991, Neuroendocrine Influences on Aging of the Female Reproductive-System: Frontiers in Neuroendocrinology, v. 12, p. 323-356.

(129) Kar, S., D. Seto, S. Dore, J.G. Chabot, R. Quirion, 1997, Systemic administration of kainic acid induces selective time dependent decrease in [I-125]insulin-like growth factor I, [I-125]insulin-like growth factor II and [I-125]insulin receptor binding sites in adult rat hippocampal formation: Neuroscience, v. 80, p. 1041-1055.

(130) Aberg, MAI, N.D. Aberg, H. Hedbacker, J. Oscarsson, P.S. Eriksson, 2000, Peripheral Infusion of IGF-I Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus: Journal of Neuroscience, v. 20, p. 2896-2903.

(131) Lichtenwalner, R.J., M.E. Forbes, S.A. Bennett, C.D. Lynch, W.E. Sonntag, D.R. Riddle, 2001, Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis: Neuroscience, v. 107, p. 603-613.

(132) Castilla-Cortazar, I., M. Garcia, B. Muguerza, J. Quiroga, R. Perez, S. Santidrian, J. Prieto, 1997, Hepatoprotective effects of insulin-like growth factor I in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis: Gastroenterology, v. 113, p. 1682-1691.

(133) Youn, Y.K., G.J. Suh, S.E. Jung, S.K. Oh, R. Demling, 1998, Recombinant human growth hormone decreases lung and liver tissue lipid peroxidation and increases antioxidant activity after thermal injury in rats: Journal of Burn Care & Rehabilitation, v. 19, p. 542-548.

(134) Tollet-Egnell, P., A. Flores-Morales, N. Stahlberg, R.L. Malek, N. Lee, G. Norstedt, 2001, Gene expression profile of the aging process in rat liver: Normalizing effects of growth hormone replacement: Molecular Endocrinology, v. 15, p. 308-318.

(135) Bartke, A., Brown-Borg, H.M., Bode, A.M., Carlson, J., Hunter, W.S. & Bronson RT. Does growth hormone prevent or accelerate aging? Exp Gerontol 1998; 33: 675-687.

(136) Brown-Borg, H.M., A.M. Bode, A. Bartke, 1999, Antioxidative mechanisms and plasma growth hormone levels - Potential relationship in the aging process: Endocrine, v. 11, p. 41-48.

(137) Brown-Borg, H.M., S.G. Rakoczy, M.A. Romanick, M.A. Kennedy, 2002, Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes: Experimental Biology and Medicine, v. 227, p. 94-104.

(138) Bartke, A. Is growth hormone deficiency a beneficial adaptation to aging? Evidence from experimental animals. Trends Endocrinol Metab 2003; 1: 340-344.

(139) Hauck, S.J., J.M. Aaron, C. Wright, J.J. Kopchick, A. Bartke, 2002, Antioxidant enzymes, free-radical damage, and response to paraquat in liver and kidney of long-living growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice: Hormone and Metabolic Research, v. 34, p. 481-486.

(140) KIREEV, R.A., TRESGUERRES, A.F., VARA, E., ARIZNAVARRETA, C. AND TRESGUERRES, JAF. Effect of chronic treatments with GH, melatonin, estrogens and phytoestrogens on oxidative stress parameters in liver from aged female rats. Biogerontology 8: 469-482 (2007).

(141) KIREEV, R.A., TRESGUERRES, ACF, CASTILLO, C., SALAZAR, V., ARIZNAVARRETA, C., VARA, E., AND TRESGUERRES, JAF. Effect of exogenous administration of melatonin and GH on prooxidant functions of the liver in aging male rats. J. Pineal Research 42;64-70 (2007).

(142) Groesbeck, M.D., A.F. Parlow, W.H. Daughaday, 1987, Stimulation of Supranormal Growth in Prepubertal, Adult Plateaued, and Hypophysectomized Female Rats by Large Doses of Rat Growth-Hormone - Physiological-Effects and Adverse Consequences: Endocrinology, v. 120, p. 1963-1975.

(143) Wolf, E., E. Kahnt, J. Ehrlein, W. Hermanns, G. Brem, R. Wanke, 1993, Effects of Long-Term Elevated Serum Levels of Growth-Hormone on Life Expectancy of Mice - Lessons from Transgenic Animal-Models: Mechanisms of Ageing and Development, v. 68, p. 71-87.

(144) Daitoku, H., M. Hatta, H. Matsuzaki, S. Aratani, T. Ohshima, M. Miyagishi, T. Nakajima, A. Fukamizu, 2004, Silent information regulator 2 potentiates Foxo-1 mediated transcription through its deacetylase activity: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v. 101, p. 10042-10047.

(145) Araki, T., Y. Sasaki, J. Milbrandt, 2004, Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration: Science, v. 305, p. 1010-1013.

(146) Yeung, F., J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, M.D. Keller, D.R. Jones, R.A. Frye, M.W. Mayo, 2004a, Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase: EMBO J., v. 23, p. 2369-2380.

(147) Parker, J.A., M. Arango, S. Abderrahmane, E. Lambert, C. Tourette, H. Catoire, C. Neri, 2005, Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons: Nat. Genet., v. 37, p. 349-350.

(148) Yeung, F., J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, M.D. Keller, D.R. Jones, R.A. Frye, M.W. Mayo, 2004b, Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase: EMBO J., v. 23, p. 2369-2380.

(149) Hill, S.M., D.E. Blask, 1988, Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture: Cancer Res, v. 48, p. 6121-6126.

(150) Danilova, N., V.E. Krupnik, D. Sugden, I.V. Zhdanova, 2004, Melatonin stimulates cell proliferation in zebrafish embryo and accelerates its development: FASEB J., v. 18, p. 751-753.

(151) Shiu, S.Y., L. Li, S.W. Siu, S.C. Xi, S.W. Fong, S.F. Pang, 2000, Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis: Biol Signals Recept., v. 9, p. 172-187.

(152) Drazen, D.L., R.J. Nelson, 2001, Melatonin receptor subtype MT2 (Mel 1b) and not mt1 (Mel 1a) is associated with melatonin-induced enhancement of cell-mediated and humoral immunity: Neuroendocrinology, v. 74, p. 178-184.

(153) Frisch, S.M., 2000, cAMP takes control: Nat. Cell. Biol., v. 2, p. E167-E168.

(154) Kim, M.J., H.K. Kim, B.S. Kim, S.V. Yim, 2004, Melatonin increases cell proliferation in the dentate gyrus of maternally separated rats: Journal of Pineal Research, v. 37, p. 193-197.

(155) Osborne, N.N., M.S. Nash, J.P. Wood, 1998, Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells: Invest Ophthalmol. Vis. Sci., v. 39, p. 2374-2383.

(156) Sainz, R.M., J.C. Mayo, C. Rodriguez, D.X. Tan, S. Lopez-Burillo, R.J. Reiter, 2003, Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells: Cell Mol. Life Sci., v. 60, p. 1407-1426.

(157) Acuña-Castroviejo, D., Martín, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., Khaldy, H., Reiter, R.J. 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. J. Pineal Res. 30: 65-74.

(158) Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Carazo A, Leon, J., Khaldy, H., Reiter, R.J. 2001. Melatonin, mitocondrial homeostasis and mitocondrial related diseases. Curr Topics Med. Chem 2: 133 (2002).

(159) Gupta,Y.K., M. Gupta, K. Kohli, 2003, Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain: Indian J. Physiol Pharmacol., v. 47, p. 373-386.