

ANALES

DE LA

REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

AÑO 2004 - TOMO CXXI

CUADERNO PRIMERO

SOLEMNE SESIÓN

SESIONES CIENTÍFICAS



Edita: REAL ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

Depósito Legal: M. 5.020.—1958
I.S.S.N. 0034-0634

Fotocomposición e impresión: Taravilla. Mesón de Paños, 6 - 28013 Madrid

VI SESIÓN CIENTÍFICA

DÍA 2 DE MARZO DE 2004

PRESIDIDA POR EL EXCMO. SR.
D. AMADOR SCHÜLLER PÉREZ

EFFECTOS DE LAS HORMONAS SOBRE EL ENVEJECIMIENTO DEL SISTEMA NERVIOSO, EL SISTEMA INMUNITARIO Y LA PIEL EN RATAS

EFFECTS OF HORMONES ON THE AGAIN OF THE CNS, THE IMMUNITARY SYSTEM AND THE SKIN IN RATS

Por el Excmo. Sr. D. JESÚS A. FERNÁNDEZ-TRESGUERRES HERNÁNDEZ

Académico de Número *

Resumen

En una comunicación que tuvo lugar en la RANM hace dos años se presentaron una serie de datos que apoyaban el papel de la GH, la melatonina y los estrógenos en la prevención del envejecimiento de una serie de sistemas fisiológicos que incluían el hueso, el metabolismo hepático y el sistema vascular. También se aportaron datos iniciales del efecto beneficioso, que dichas hormonas parecían ejercer sobre el SNC. En la comunicación de hoy

* Con la colaboración de C. Castillo, V. Salazar, L. M. Garcá Segura (Instituto Cajal. CSIC. Madrid), E. Vara (Depto. de Bioquímica. Fac. Med. UCM), M. de la Fuente (Depto. de Fisiología Animal. Fac. Ciencias Biológicas. UCM), A. C. F. Tresguerres y C. Ariznavarreta (Depto. de Fisiología. Fac. Medicina Univ. Complutense).

se presentan los resultados obtenidos desde entonces sobre dicho SNC, sobre el sistema inmunitario y sobre la piel.

Se han estudiado un total de 140 ratas machos y hembras que se han ido sacrificando desde los dos meses hasta los 24 con intervalos de 6. Otro grupo de 64 ratas de ambos sexos se han sometido a distintos tratamientos. Los machos se trataron con GH y melatonina durante 10 semanas sacrificándose a los 24 meses. Las hembras se dividieron en dos grupos: Intactas y castradas a los 12 meses de edad. Las primeras se trataron con GH y melatonina y las segundas además con estrógenos y Phytosoya. Todas se trataron durante 10 semanas entre los 22 y 24 meses de edad.

Se determinó el número de neuronas en el hilus del giro dentado en cortes de cerebro sometidos a tinción de Nissl. También se determinó la neurogénesis utilizando tinciones con BrdU. Se determinó la actividad inmunitaria midiendo la actividad de las células NK, la quimiotaxis y la actividad proliferativa en respuesta a Con A en leucocitos en cultivo obtenidos de ganglios axilares y bazo de las ratas anteriormente descritas, así como la liberación de Il 2 al medio.

Se ha podido ver una disminución del número de neuronas con la edad tanto en machos como en hembras y en estas no se pudo observar ningún efecto de la castración. También se observó una gran disminución de la neurogénesis con la edad en ambos sexos. El tratamiento con GH determina un incremento del número total de neuronas sin modificar la neurogénesis por lo que se supone es debido a una disminución de la apoptosis. Esto parece confirmarse con la disminución de los nucleosomas y el incremento de Bcl2 que se ha comprobado en homogeneizados de cerebro.

Las funciones inmunitarias estudiadas experimentan una disminución, edad dependiente que empeora con la ovariectomía. El tratamiento con GH incrementa las funciones deterioradas al igual que los estrógenos y en algunos casos también la melatonina. La piel sufre un proceso de deterioro con la edad, traducido en una disminución del espesor epidérmico, un incremento de la grasa dérmica y una disminución de los fibroblastos que también se recupera parcialmente con GH y melatonina.

Los queratinocitos en cultivo procedentes de animales viejos muestran un aumento de nucleosomas y una disminución de Bcl2 que se restablece con GH y melatonina.

Abstract

In a previous communication to the RANM two years ago, some data were presented supporting the role of GH, melatonin and estrogens in the prevention of aging of bone, liver metabolism and vascular activity. Additional data were presented about the beneficial effect of these hormones on the Central nervous System (CNS). In the present communication results obtained since that time on the CNS, the immunitary system and the skin will be presented.

A total of 140 male and female rats have been investigated. Animals have been decapitated every 6 months starting with 2 and finishing with 24 months. Another group of 64 rats from both sexes has been submitted to different treatments over 10 weeks, between 22 and 24 months of age. Males have been treated with GH and melatonin. Females were divided in two

groups: intact and castrated at 12 months of age. The first group was treated with GH and melatonin and the second with these two and additionally with estradiol and with Phytosoya. Total number of neurones in the hilus of the dentate gyrus has been counted in Nissl stained cerebral cuts. Neurogenesis was estimated by staining with BrdU. Immunitary function was estimated measuring NK activity, chemiotaxis and lymphoproliferative activity in response to Concanavaline A in cultures of leucocytes obtained from axillary nodes and spleen of the animals as well as liberation of IL2 to the medium. An age dependent reduction in the number of neurones has been registered in male and female rats, without influence of the ovariectomy. A dramatic reduction in neurogenesis has been also detected in both sexes. GH stimulates total number of neurones but does not modify neurogenesis, so a reduction in apoptosis has been considered. This seems to be supported by the reduction in nucleosomes and the increase in Bcl2 observed in cerebral homogenates. Immunitary functions show an age dependent reduction that gets worse with ovariectomy. GH treatment enhances all affected functions as well as estrogens and in some cases melatonin. The skin is also deteriorated by age and that is translated in a reduction of epidermal thickness, an increase in dermical fat and a lowering in the numer of fibroblasts. All these alterations are recovered with GH and melatonin. Keratinocytes from old animals in culture show an increase in nucleosomes and a reduction in Bcl2 that is restaured with GH and melatonin.

INTRODUCCIÓN

Las lesiones degenerativas del SNC son causas frecuentes e importantes de muerte y de enfermedad en nuestra sociedad. Las causas de las alteraciones que aparecen a lo largo de la vida en el SNC son múltiples, y muchas de ellas son objeto todavía de estudio, al no estar claras su etiología ni su patogenia. En cualquier caso, las enfermedades son más frecuentes en los individuos de edad avanzada, y en la mujer a partir de la menopausia. En estas etapas de la vida, los niveles de varias hormonas disminuyen de forma significativa, entre ellas las hormonas gonadales y la hormona de crecimiento (GH) (Roshan et al., 1999, Toogood and Shalet, 1998).

El envejecimiento cerebral está asociado a un incremento del compartimento glial. Se ha descrito la aparición de un aumento de la densidad de los astrocitos, así como hipertrofia de los mismos (David et al., 1997). En el mismo sentido la formación continua de nuevas neuronas en el cerebro es un hecho cierto, especialmente en animales jóvenes, y aunque la significación fisiológica de este hecho no está totalmente aclarada (Trejo et al., 2001), las estrategias terapéuticas para potenciar este proceso en la vejez, cuando la emergen-

cia de nuevas neuronas parece disminuir o desaparecer totalmente, abren un campo nuevo y muy prometedor.

Las hormonas del eje somatotropo, GHRH, GH, IGF-I que son responsables del crecimiento somático durante la infancia y la pubertad, tienen también una serie de funciones metabólicas en el adulto joven que incluyen efectos sobre los lípidos, las proteínas y los hidratos de carbono. Así, la GH estimula el desarrollo muscular, favorece la pérdida de tejido graso, aumenta la densidad mineral ósea y modifica el metabolismo de los glúcidos. La disminución de la secreción de GH con la edad tiene un efecto negativo sobre estas funciones. Además la GH tiene otras actividades, que incluyen efectos importantes a nivel cerebral (Nyberg, 2000). El tratamiento con esta hormona aumenta la capacidad psicológica en adultos con déficit de GH (Bauman et al., 1995, Gustafsson et al., 1999) y se han descrito también efectos beneficiosos sobre memoria, alerta mental, motivación y capacidad de trabajo. La terapéutica con GH modifica asimismo los niveles de neurotransmisores del LCR (Johansson et al., 1995). Hay receptores para GH en neuronas, glia y células endoteliales (Lobie et al., 1993) y hay respuesta cerebral de incremento de IGF-I en respuesta a la GH incluso en ratas viejas (López Fernández et al., 1996).

Se ha descrito la presencia de IGF-I (Torres Alemán et al., 1994), sus proteínas transportadoras y su receptor en el cerebro y cerebelo y se ha sugerido que desempeña allí un papel trófico en el desarrollo de los mismos. El mismo grupo (Trejo et al., 2001) ha demostrado que la administración de IGF a ratas sedentarias adultas incrementa el número de neuronas nuevas en el hipocampo, y que el ejercicio, que incrementa la secreción de GH, incrementa la captación de IGF desde la sangre en diversas áreas cerebrales. La ausencia de IGF-I (KO mice) da lugar a hipomielinización neural, disminución del número de oligodendrocitos y reducción del tamaño total cerebral (Beck et al., 1995).

Otras hormonas con efectos beneficiosos claramente establecidos en el organismo en general y en el cerebro en particular son los estrógenos, donde también ejercen funciones neuroprotectoras (Azcoitia et al., 1999, García Segura et al., 2001). La disminución de la secreción de estrógenos durante la menopausia determina una alteración del perfil lipídico y un aumento de las alteraciones cerebro-vasculares (Chowienzyk et al., 1990, Lüscher et al., 1996). El tratamiento con estrógenos mejora todos estos procesos. Además se

ha comprobado que su asociación con GH mejora mucho el anabolismo proteico. El papel de ambas hormonas pudiera potenciarse así mismo en el caso del SNC.

Los cambios asociados a la edad que sufre el sistema inmunitario pueden estar relacionados con el aumento de la morbi-mortalidad asociada al incremento de susceptibilidad a la infección, cáncer y enfermedades autoinmunes. Las funciones del sistema inmunitario más alteradas con la edad son aquellas relacionadas con los linfocitos T (Solana et al., 1999, Malaguarnera et al., 2001, Pawelec et al., 2002). También se producen cambios en las células Natural-killer (Solana and Pawelec, 1998, De la Fuente et al., 2001). Existen diferencias en la función inmunitaria de machos y hembras, probablemente debido a la acción de las hormonas sexuales (Olsen and Kovacs, 1996; Gaillard and Spinedi, 1998). Por tanto, parece interesante estudiar la evolución de la capacidad funcional del sistema inmunitario con la edad, así como las diferencias entre machos y hembras ovariectomizadas, con el fin de establecer el papel de los estrógenos en dicho proceso. Asimismo, resulta conveniente estudiar el efecto de la administración sustitutiva de estrógenos a hembras ovariectomizadas. Por otra parte, se sabe que la GH y su mediador IGF-1 ejercen acciones sobre las células del sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria (Heemskerk et al., 1999; Jeay et al., 2002). Éstos hechos justifican el interés del estudio de los efectos de la administración de GH en ratas viejas.

También la piel está afectada por la edad, y dicho efecto es más evidente en hembras carentes de estrógenos. Histológicamente, el cambio que más llama la atención es el adelgazamiento de la unión dermo-epidérmica y la pérdida de volumen dérmico. En la dermis, los niveles de colágeno y sustancia fundamental están disminuidos, conduciendo a cambios en el grosor cutáneo. Existe variabilidad en el grosor de la pared de los vasos, dilatación de los vasos linfáticos y pérdida del lecho vascular, especialmente de las asas capilares verticales que ocupan las papilas dérmicas. Dentro de estos cambios también existe una disminución de la celularidad (Yaar and Gilchrest, 2001). En la epidermis existe una reducción del número de células de Langerhans y de melanocitos, así como de la síntesis de melanosomas, que lleva a una disminución de la pigmentación. El número de folículos pilosos disminuye con la edad, pero su estructura permanece inalterable (Montagna and Carlisle, 1990). La piel es uno de los órganos diana de la GH (Triboutot, 1995), y por ejem-

plo la administración de GH en niños con déficit de la hormona, aumenta el grosor de la dermis y disminuye la rigidez cutánea (Schulman, 2002). Estos efectos parecen mediados por la interacción con los receptores de GH que se expresan en la epidermis, estructuras anexas, fibroblastos dérmicos, adipocitos, células de Schwann y células musculares (Oakes et al., 1992; Edmondson et al., 1999).

La piel es uno de los órganos diana no reproductivos más importantes donde los estrógenos tienen efectos significativos (Phillips et al., 2001). Con la menopausia la piel parece adelgazar, hecho que parece estar relacionado con la disminución del contenido colágeno cutáneo (Brincat et al., 1983; Ravnkar et al., 1985; Stubbs et al., 1978). También disminuye la retención de agua y aumentan la sequedad y las arrugas finas (Callens et al., 1996; Dunn et al., 1997; Pierard-Franchimont et al., 1995). El envejecimiento en mujeres sanas se asocia con una disminución de la tasa de reparación de heridas, con disminución de los niveles de colágeno tipo 1. Todos estos cambios relacionados con la edad pueden ser revertidos mediante la administración de terapia hormonal sustitutiva con estrógenos (Ashcroft et al., 1997).

En estudios previos de nuestro grupo hemos podido observar el efecto beneficioso que la GH presenta a nivel vascular, óseo e inmunitario en ratas machos de 22 meses (Castillo et al., 2003), y el efecto asimismo beneficioso de los estrógenos en ratas viejas hembras castradas. En lo que al sistema nervioso se refiere, hemos hecho un estudio preliminar donde parece observarse un efecto de la GH y de la melatonina sobre el número de neuronas del hilus del giro dentado, pero no sabemos si ello es debido a un aumento de la neurogénesis o a una disminución de la apoptosis. Se hace, pues, necesaria la investigación más profunda de los mecanismos involucrados en estos efectos. La medida de la neurogénesis utilizando el marcaje del ADN con BrdU puede ayudar a comprender estos procesos.

La familia de Bcl2 está constituida por proteínas tanto inductoras como represoras de la apoptosis. la expresión de Bcl2 suprime la apoptosis, mientras que la expresión de otro de sus miembros, el Bax, la induce. El Bax antagoniza el efecto de Bcl2 y acelera la muerte celular por apoptosis. el balance entre proteínas inductoras y represoras constituye uno de los mecanismos de control más importantes en la regulación de los mecanismos de muerte celular por apoptosis. También las caspasas 3 y 9 son agentes proapoptóticos, y hay que

tener en cuenta además el posible papel desempeñado por la $\text{NF}\kappa\beta$, siendo temas de enorme trascendencia para entender el posible papel beneficioso de la GH, la melatonina y los estrógenos en el SNC. Además la GH y los estrógenos pueden compartir un mismo sistema de transducción a través de MAP-quinasas, lo cual podría explicar efectos aditivos o antagónicos en algunas de sus funciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

EXPERIMENTO 1.—Se usaron ratas, machos y hembras, de 2, 6, 12, 14, 18, 22 y 24 meses de edad. Los animales procedían de Harlan Ibérica (Barcelona) y se mantuvieron a temperatura constante ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), con un ciclo regular de 12 horas luz/oscuridad y dieta estándar de laboratorio, con libre acceso a la comida y al agua. Se trató a las ratas siguiendo las indicaciones de las Directivas 86/6091 EEC de la Comunidad Europea. Los machos se sacrificaron en grupos de $n = 7/8$ a diferentes edades. Las hembras también fueron decapitadas a las mismas edades que los machos en grupos de $n = 6/7$. Otras 24 hembras fueron castradas a los 12 meses de edad, divididas en 4 grupos y sacrificadas a los 14, 18, 22 y 24 meses de edad, respectivamente.

EXPERIMENTO 2.—Se utilizaron ratas hembras y machos de 22 meses, divididas en los siguientes grupos:

Machos: viejos tratados con vehículo, viejos tratados con hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH; 2 mg/kg/d, dividida en dos inyecciones s.c.), y otro tratado con melatonina (1 mg/kg/día en el agua de bebida).

Hembras: Viejas intactas controles y viejas intactas tratadas con GH, viejas ovariectomizadas a los 12 meses de edad, tratadas con vehículo, viejas ovariectomizadas tratadas con estradiol (125 μg /semana, s.c.), viejas castradas tratadas con Phytosoya (60 mg/kg/día en el agua de bebida) y ratas viejas ovariectomizadas tratadas con GH y estradiol a las mismas dosis anteriormente mencionadas. Los tratamientos fueron administrados durante 10 semanas. Se utilizaron ratas de 3 meses de edad intactas de ambos sexos como grupos de referencia.

Estudios histológicos y de la población neuronal

Durante los tres días anteriores al sacrificio los animales fueron inyectados con Bromodesoxi Uridina (BrdU) que incorporada al ADN de las células, actúa como marcador del número de nuevas neuronas y células gliales en el hilus y las capas granular y subgranular del giro dentado del hipocampo. Dicho marcador se visualiza mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-BrdU de ratón.

Para estudiar la población neuronal del hilus del giro dentado del hipocampo se ha seguido el método descrito por Trejo et al. (2001) mediante la utilización de un disector óptico.

El cerebro fue fijado con PFA al 4 % en tampón fosfato 1 M para la disección de la mitad rostral-septal del hipocampo derecho, siendo cortado el cerebro a 1.30 mm. del bregma, y ventralmente a 4.50 mm. (Paxinos and Watson, 1982). Las áreas fueron cortadas seriamente en sentido rostro-caudal con un vibratomo (Leica) en secciones de 50 μ m que fueron colocadas en un baño de tampón fosfato 0.1 M flotando libremente. Los cortes se mantuvieron separados para mantener el orden de las secciones, las cuales se sometieron a tinción de Nissl que permite, en esta área, la distinción morfológica de las neuronas con respecto a las células gliales.

Muestras de piel para histología

Se han cogido muestras del lomo, de la axila y de mucosa de la boca que no sea la lengua. Como medio de fijación se ha utilizado Formol al 4 % y se han analizado las muestras en el departamento de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre donde se ha valorado: atrofia epidérmica, esclerosis de los vasos, fibras elásticas (tinción específica), colágeno, células de Langherhans (inmunohistoquímica S100 y CD1A) y folículos pilosos (densidad y tamaño de los mismos).

Aislamiento de queratinocitos para medición de indicadores de envejecimiento

El aislamiento de queratinocitos se ha realizado por digestión de la muestra de piel durante 2 h. si se trata del lomo o durante 1:30

si se trata de axila, en una solución con dispasa al 0.5 % agitada a 200 rpm a 37° C. Después se lleva a cabo una segunda digestión durante 15 min. en una solución con dispasa al 0.5 % y tripsina al 0.1 %.

Una vez acabada la digestión se procede al raspado de la muestra hasta obtener el mayor número de células posible y se filtra a un tubo falcón. Tras centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. a 4° C, el sobrenadante se decanta y el pellet se resuspende con 0.5 ml. de RPMI 16.40. El resultado se reparte en placas de 35 × 10 cm. equitativamente, añadiendo 2 ml. RPMI 16.40 y se cultiva bajo atmósfera de 5 % CO₂, 95 % O₂ a 37° C.

Tras 24 h. de cultivo se retira el medio con las células no adheridas, y tras adición de medio fresco, las células se cultivan de nuevo otras 24 h. en presencia o ausencia de TNF, Vit E, GH y melatonina. Al finalizar el período de cultivo, células y medio se recogen separadamente para posterior determinación de: Bcl2 y nucleosomas.

Determinación de proteínas

Se realizó mediante el método de Bradford.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar, siendo «n» el número de preparaciones de queratinocitos utilizadas, cada una procedente de una muestra diferente.

Las comparaciones entre medias se llevaron a cabo mediante métodos no paramétricos, utilizando el test de Friedman de análisis de varianza por grupos, seguido del test de Wilcoxon para comparación de pares de medias en caso de resultar significación en el primero. Se consideraron significativas las diferencias cuando la «p» fue inferior a 0,05.

Recolección de suspensión de linfocitos

Los animales fueron sacrificados por decapitación, siguiendo las líneas marcadas por las Directivas 86/6091 EEC de la Comunidad Europea. Se extirparon asépticamente el bazo y los ganglios axila-

res, se les quitó la grasa, se menudearon con unas tijeras y fueron suavemente prensados a través de una red (Sigma). Se centrifugaron las suspensiones de células en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) con una densidad de 1.070 g/ml. El material en la interfase se resuspendió en un medio RPMI 1640 enriquecido con L-glutamina (Gibco) y suplementado con un 10 % de suero fetal inactivado por calor (Gibco) y Gentamicina (100 µg/ml, Gibco), se lavó, y el número de células se determinó y ajustó a 1×10^6 células/ml.

La viabilidad celular, medida regularmente antes y después de cada experimento mediante un test de exclusión Tripan-Blue, fue superior al 95 % en todos los experimentos.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo a 37° C en una atmósfera humidificada con el 5 % de CO₂.

Quimiotaxis

El ensayo se realizó siguiendo una modificación del método de Boyden (Boyden, 1962) anteriormente descrito (De la Fuente et al., 2000). Se usaron cámaras con dos compartimentos separadas por un filtro (Millipore) con poros de 3 µm de diámetro. En el compartimento superior se depositaron alicuotas de 300 µl de suspensiones de leucocitos, mientras que en el inferior eran de 400 µl de quimioatrayente fMet-Leu-Phe (Sigma) en concentración de 10⁻⁸ M. Las cámaras se incubaron durante 3 horas, los filtros se fijaron y tiñeron, y se contó el número de linfocitos en la cara inferior del filtro, el cual pasa a ser considerado Índice de quimiotaxis (CI).

Prueba de Linfoproliferación

La proliferación de linfocitos como respuesta al mitógeno Concanavaline A (ConA) se probó siguiendo el método previamente descrito (Del Río et al., 1994). Los resultados se expresan en porcentajes de proliferación en respuesta a ConA, siendo el 100 % la captación de timidina observada en los pocillos de control.

Prueba de actividad NK

Se usó una prueba enzimática clorimétrica para la medida de la citotoxicidad de las células objetivo (Cytotox 96 TM Promega, Boeringer Ingelheim) basada en la determinación de LDH usando sales de azul

de tetrazolio, como se ha descrito anteriormente (Ferrández et al., 1999).

Prueba de liberación de IL-2

La concentración de interleukina-2 (IL-2) se determinó sobre los sobrenadantes de cultivos de linfocitos en presencia de ConA siguiendo el método previamente descrito (Medina et al., 2000). Tras 48 horas de incubación con ConA (1 $\mu\text{g/ml}$), se cosecharon los sobrenadantes y se mantuvieron congelados a -20°C hasta la realización de la prueba. El IL-2 se midió usando un equipo ELISA.

Análisis estadístico

Los datos se han expresado como la media \pm SD de los valores. Se comprobó la normalidad de las muestras con el test Kolmogorov-Smirnov. Los datos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de variación de dos vías (ANOVA) y el test de Tukey para hacer comparaciones de muestras paramétricas. Se estableció $P < 0.05$ como nivel mínimo de significancia.

RESULTADOS 1

La quimiotaxis de linfocitos procedentes de ganglios axilares y bazo de hembras y machos muestra, en general, un descenso con la edad, mostrando las hembras índices de quimiotaxis más altos ($p < 0.001$) que los machos. En las hembras, los valores observados en el bazo de los animales adultos de 6 meses de edad mostraron una reducción estadísticamente significativa en comparación con los de todas las demás edades, mientras que en los ganglios axilares los valores, a los 6 meses, eran significativamente mayores que los valores constatados a los 14, 18, 22 y 24 meses de edad. En los machos de 14, 18 y 22 meses, el descenso resultó ser estadísticamente significativo con respecto a los adultos en las células de los ganglios axilares. Los machos mostraron valores de quimiotaxis significativamente inferiores a las hembras en los ganglios axilares a los 2, 6, 12, 14 y 18 meses de edad, y a los 2, 6, 12 y 14 también en el bazo. Por el contrario, las células de los animales de 24 meses mostraron mayor quimiotaxis en machos que en hembras.

Se observó un descenso con la edad en el porcentaje de respuesta linfoproliferativa a la ConA para ganglios axilares y bazo respectivamente. Sin embargo, mientras en las hembras este descenso empezaba a producirse en la edad adulta en las células de ambos órganos, en los machos este cambio relacionado con la edad sólo aparece en los ganglios axilares. En el bazo el descenso aparece en los animales de 18 meses de edad. Los machos mostraron niveles inferiores que las hembras, pero este cambio sólo pudo ser claramente observado en los ganglios axilares, y el descenso estadísticamente significativo en los machos en comparación con las hembras se constató a los 2, 6, 12, 14 y 24 meses de edad. En el bazo, los machos mostraron valores inferiores a las hembras sólo a los 2 y a los 24 meses de edad. El análisis de la varianza mostró que en el bazo la respuesta linfoproliferativa a ConA está influida sólo por el envejecimiento, mientras que en los ganglios axilares ambos factores, edad y sexo, influyen en esa respuesta de manera similar. Se ha visto que los machos muestran una respuesta linfoproliferativa inferior a las hembras.

La actividad NK disminuye con la edad, siendo los valores más altos a los 6 meses de edad (adultos). El descenso aparece a los 12 meses de edad en los ganglios axilares y en el bazo a los 14 meses en los machos y a los 18 meses en las hembras. De nuevo, los machos muestran valores inferiores a las hembras, habiéndose hallado diferencias estadísticamente significativas a los 2, 18, 22 y 24 meses de edad en las células de ambos órganos. El análisis de varianza muestra que la actividad NK en el bazo sólo está influida por el envejecimiento, mientras que en los ganglios axilares la función se ve afectado tanto por la edad como por el sexo, mostrando las hembras niveles de actividad NK más altos que los machos.

Se ha detectado un descenso en liberación de IL-2 (pg/ml) con la edad en los ganglios axilares y el bazo de las hembras. En el bazo se han observado en todas las edades diferencias estadísticamente significativas comparadas con los valores constatados a los 6 meses de edad, y en los ganglios axilares se han medido valores inferiores a los 14, 18 y 24 meses de edad. El descenso es menos evidente en los machos envejecidos, en los cuales sólo se han visto diferencias significativas en las células de los ganglios axilares entre los animales de 6 meses y los de 22 meses de edad. Los machos muestran menores niveles que las hembras en ganglios axilares y bazo a los 2, 6 y 12 meses de edad. El análisis de varianza muestra que en el

bazo y los ganglios axilares la liberación de IL-2 está influida por la edad tanto en machos como en hembras, habiéndose hallado, en ambos órganos, los valores más altos entre las hembras.

En las hembras castradas, la quimiotaxis de leucocitos del bazo desciende respecto de los valores hallados en hembras no castradas, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en las de 14 meses de edad (454 ± 93 en las intactas, 306 ± 61 en las castradas).

En contraste, en los animales de 18, 22 y 24 meses no se han hallado diferencias significativas. En los ganglios axilares la quimiotaxis también fue inferior en las hembras ovariectomizadas, con diferencias significativas con respecto de los controles realizados en las intactas a los 14 y 24 meses de edad. Otras funciones que se han estudiado estaban también más reducidas en ganglios en las hembras ovariectomizadas que en las intactas.

La linfoproliferación de leucocitos de los ganglios axilares de las hembras ovariectomizadas muestran valores similares a los constatados en los machos.

Las hembras viejas tanto castradas como intactas fueron divididas en varios grupos experimentales que recibieron diferentes tratamientos hormonales crónicos, observándose efectos sobre los parámetros anteriormente estudiados. Respecto a la respuesta linfoproliferativa en los leucocitos de ganglio, se aprecia una tendencia al incremento en el tanto por ciento de respuesta en las hembras tanto intactas como castradas que recibieron GH únicamente, no llegando a ser nunca esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, en las hembras castradas que recibieron valerianato de estradiol (Eos) y GH combinada con Eos, se aprecia un marcado incremento ($p < 0.01$).

En relación a la capacidad quimiotáctica de los leucocitos de ganglio se observa una respuesta mucho más eficaz a todos los tratamientos en todos los grupos experimentales. Los tratamientos de GH tanto en hembras viejas castradas como no castradas produjo un aumento muy evidente ($p < 0.01$) en dicho parámetro, al igual que el tratamiento con Eos únicamente. El tratamiento de GH combinada con Eos dio lugar a un incremento algo más moderado ($p < 0.05$) en la capacidad quimiotáctica.

En lo que respecta a la actividad NK de los leucocitos de ganglio, los efectos de los tratamientos son mucho más evidentes en las hembras viejas castradas, siendo mucho más marcado ($p < 0.01$) el aumento en la actividad NK en los grupos que recibieron GH sola

y Eos solo, mientras que el grupo que recibió el tratamiento combinado de ambas hormonas presentó un incremento algo más moderado ($p < 0.05$). Sin embargo las hembras intactas presentan únicamente una cierta tendencia al aumento de este parámetro, no llegando a ser estadísticamente significativa la diferencia con el grupo control de su misma edad.

RESULTADOS 2

La reducción en el número de neuronas en el hilus de los animales de 24 meses era evidente en un primer examen histológico que se confirmó mediante análisis morfológico cuantitativo.

El hilus de las hembras muestra menor contenido neuronal que el de los machos a todas las edades estudiadas ($p < 0.01$). Dentro de cada sexo, el número de neuronas en el hilus se mantuvo en un nivel más o menos similar entre los 3 y los 22 meses de edad. No se observaron diferencias significativas en el número de neuronas del hilus de los machos a los 3, 6, 12, 14, 18 y 22 meses ($p > 0.2$). Lo mismo cabe decir en cuanto a las hembras ($p > 0.2$). Por el contrario, hubo una pérdida neuronal significativa entre los 22 y los 24 meses en ambos sexos ($p < 0.01$). La pérdida neuronal fue de similar magnitud tanto en machos como en hembras. Entre los 22 y los 24 meses, las hembras mostraron una pérdida media de 10.875 neuronas hilares (32 %), mientras en los machos la pérdida era de 12.653 (25 %). Más aún, el análisis de los datos con ANOVA de dos colas muestra que no hay interacción entre los factores edad y sexo, indicando que la pérdida neuronal con la edad no se ve afectada por el sexo de los animales.

También se observó una disminución del número de células BrdU positivas, que aparecen teñidas de marrón en un fondo de células teñidas de azul Nissl.

El estudio cuantitativo de dicha evolución muestra una disminución muy marcada de la neurogénesis con la edad, tanto en machos como en hembras.

En lo que se refiere a los efectos observados en los grupos experimentales sometidos a diferentes tratamientos hormonales crónicos, cabe destacar dos aspectos principales. Por un lado, las consecuencias derivadas del tratamiento crónico con GH; en los dos grupos de hembras viejas tanto castradas como no castradas se

observa un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el número total de neuronas en el hilus del giro dentado al igual que ocurre en los machos.

Por otro lado, en lo que se refiere a los tratamientos crónicos en hembras viejas castradas con valerianato de estradiol (Eos), con Phytosoya® o con un tratamiento combinado de GH y Eos, no se aprecia ningún cambio estadísticamente significativo sobre el número total de neuronas, existiendo quizás una leve tendencia al incremento en el caso del tratamiento combinado de GH y Eos. Sin embargo, considerando la proliferación celular en la capa subgranular, sí se llegan a apreciar cambios estadísticamente significativos en el número de células BrdU (+) tras los tratamientos en las hembras viejas castradas. se observa un incremento muy marcado ($p < 0.01$) en el número de células BrdU (+) tras el tratamiento crónico con Eos solos, pasándose de un número aproximado de dicho tipo de células de 75 a más de 175 en el área hipocampal estudiada. El tratamiento crónico con Phytosoya es quizás el que produce un efecto más espectacular ($p < 0.001$), produciéndose un incremento de estas células hasta aproximadamente 225. Sin embargo, el tratamiento combinado de Eos y GH en hembras viejas castradas no ejerce efecto alguno sobre el número de células BrdU (+).

RESULTADOS 3

Se puede observar una disminución significativa ($p < 0.01$) del espesor de la epidermis en los machos viejos unido a un aumento muy significativo de la grasa dérmica y una gran reducción en el número de fibroblastos a la vez que se observa una desestructuración de las fibras dérmicas.

Los queratinocitos muestran un incremento de edad dependiente de los nucleosomas y una disminución de Bcl2. Tanto el incremento de los primeros como la disminución de la segunda se restablecen con los tratamientos con GH y melatonina.

CONCLUSIONES

De todos los datos anteriormente expuestos podemos deducir las siguientes conclusiones.

Los queratinocitos en cultivo primario procedentes de ratas de edades superiores a 6 meses de ambos sexos presentan un incremento gradual de nucleosomas que es máximo a los 24 meses (Sastre et al., 2000), a la vez que muestran una disminución de Bcl2. El tratamiento a las ratas macho con GH determina una disminución significativa de los nucleosomas y un incremento en los niveles de Bcl2 lo que representa una mejoría de su situación funcional.

El conteo de neuronas utilizando el disector óptico en los cortes del hilus del giro dentado del hipocampo teñidos con Nissl permite observar una diferencia en el número de neuronas entre machos y hembras a favor de los primeros (Andrade et al., 2000) con una caída en el número que es evidente entre los 22 y 24 meses de edad (Shetty y Turner, 1999). No existen diferencias significativas en el número de neuronas entre las ratas hembras castradas y sin castrar a pesar de lo que podría pensarse de los datos de la literatura (Wooley y McEwen, 1992, Gould et al., 1990).

Si estudiamos las células BrdU positivas que suponen un indicador de neurogénesis pasamos de alrededor de 3.000 nuevas células a los 2 meses de edad a 80 nuevas células a los 24 meses con pocas diferencias entre sexos, y de nuevo sin que la ovariectomía tenga un efecto importante (Hilton et al., 2003).

El tratamiento con GH (Nyberg, 2000) 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 (Frago et al., 2002, Les Greves et al., 2002).

Por el contrario, estradiol y phyto-soya no incrementan el número de neuronas totales en las ratas castradas pero sí lo hacen de su neurogénesis (Azcoitia et al., 1999).

La función inmunitaria es mejor en términos generales en las hembras que en los machos (Verthelyi, 2001), perdiéndose estas diferencias con la castración (Keller et al., 2001). La actividad de las células NK presenta un máximo a los 6 meses disminuyendo después progresivamente con la edad (Pawelec et al., 2002; De la Fuente, 2002). También disminuyen la actividad quimiotáctica y la linfoproliferativa de los leucocitos en ambos sexos (Malaguarnera et al., 2001; Ortega et al., 2000). En las ratas hembra se observa una disminución adicional de los tres parámetros inmunológicos con la castración (Pfeilschifter et al., 2002).

El tratamiento con GH incrementa las tres funciones de mane-

ra significativa tanto en animales íntegros como en castrados. En éstos últimos el estradiol y la Phytosoya ejercen también un efecto muy evidente sobre las funciones inmunitarias (Shames, 2002).

BIBLIOGRAFÍA

- ANDRADE, J. P., MADEIRA, M. D., PAULA-BARBOSA, M. M. (2000): «Sexual dimorphism in the subiculum of the rat hippocampal formation». *Brain Res.* 875: 125-137.
- ASHCROFT, G. S., DODSWORTH, J., VAN BOXTEL et al. (1997): «Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels». *Nat. Med.* 3: 1209-1215.
- 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.
- BAUMAN, 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.
- BECK, K. D., POWEL-BRAXTON, L., WINDNER, H. R. VALVERDE, J., HEFTI, F. (1995): «IGFI gene disruptin results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons». *Neuron* 14: 717-730.
- BOYDEN, S. V. (1962): «The chemotaxis effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes». *J. Exp. Med.* 115: 453-466.
- BRINCAT, M., MONIZ, C. F., STUDD, J. W. E. et al. (1993): «Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women». *Br. Med. J.* 287: 1337-1338.
- CALLENS, A., VAILLANT, L., LECOMTE, P. et al. (1996): «Does hormonal skin aging exist? A study of the influence of different hormone replacement therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques». *Dermatology* 193: 289-294.
- CASTILLO, C., CRUZADO, M., ARIZNABARRETA, C., GIL-LOYZAGA, P., LAHERA, V., CACHOFEIRO, V., TRESGUERRES, J. A. F. (Sep. 2003): «Body composition and vascular effects of growth hormone administration in old female rats». *Experimental Gerontology* 38(9): 971-9.
- CHOWIENCZYK, P. J., WATTS, G. F., COCHCROFT, J. R., BRETT, S. E., RITTER, J. M. (30 jul. 1994): Sex differences in endothelial function in normal and hypercholesterolaemic subjects». *Lancet* 344(8918): 305-6.
- DAVID, J. F., GROZALI, F., BIANCO, C. F., WATTER, A., DELAINE, S., BONIFACE, B., DI MENZA, C., DELACOURTE, A. (1997): «Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain». *Neurosci. Lett* 235: 53-56.
- DE LA FUENTE, M. (Aug. 2002): «Effects of antioxidants on immune system ageing». *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 Suppl. 3: S5-8.
- DE LA FUENTE, M., DEL RÍO, M., VÍCTOR, V. M., MEDINA, S. (2001): «Neuropeptide Y effects on murine natural killer activity: changes with ageing and cAMP involvement». *Regul. Pept.* 101: 73-79.

- DE LA FUENTE, M., CARAZO, M., CORREA, R., DEL RÍO, M. (2000): «Changes in macrophage and lymphocyte functions in guinea-pigs after different amount of vitamin E ingestion». *British J. Nutr.* 84: 25-29.
- DEL RÍO, M., HERNANZ, A., DE LA FUENTE, M. (1994): «Bombesin, gastrin-releasing peptide, and neuromedin C modulate murine lymphocyte proliferation through adherent accessory cells and activate protein kinase C». *Peptides* 15: 15-22.
- DUNN, L. B., BAMESYN, M., MOORE, A. et al. (1997): «Does estrogen prevent skin aging?» *Arch. Dermatol.* 133: 339-342.
- EDMONDSON, S. R., RUSSO, V. C., MCFARLANE, A. C., WRAIGHT, C. J., WERTHER, G. A. (1999): «Interactions between growth hormone, insulin-like growth factor I, and basic growth factor in melanocyte growth». *J. Clin. Endocrinol Metab.* 84: 1638-44.
- 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.
- GAILLARD, R. C., SPINEDI, E. (1998): «Sex-and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism». *Domestic Animal Endocrinology* 15: 345-352.
- GARCÍA SEGURA, L. M., AZCOITIA, I., DON CARLOS, LL. (2001): «Neuroprotection by estradiol». *Progres in Neurobiol* 63(1): 29-60.
- 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* 10: 1286-1291.
- GUSTAFSSON, K., HAGBERG, H., BENGSSON, B. A., BRANTSING, C., ISGAARD, J. (1999): «Possible protective role of GH in hypoxia-ischemia in neonatal rats». *Pediatr. Res.* 45: 318-323.
- HEEMSKERK, v. H., DAEMEN, M. A., BUURMAN, W. A. (Mar. 1999): «Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation». *cytokine Growth Factor Rev.* 10(1): 5-14.
- HILTON, G. D., NÚÑEZ, J. L., MCCARTHY, M. M. (2003): «Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats». *Neuroscience* 116: 383-391.
- JEAY, S., SONENSHEIM, G. E., POSTEL-VINAY, M. C., KELLY, P. A., BAIXERAS, E. (25 feb. 2003): «Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways». *Mol. Cell. Endocrinol.* 188(1-2): 1-7.
- JOHANSSON, J. O., LARSSON, G., ELMGREN, A., HYNYSJÓ, L., LINDHAL, A., LUNDBERG, P. A., ISAKSSON, O., LINDSTEDT, S., BENGSSON, B. A. (1995): «Treatment of GH deficient adults with recombinant h GH increases concentrations of GH in the cerebrospinal fluid and affects neurotransmitters». *Neuroendocrinology* G1: 57-66.
- KELLER, E. T., ZHANG, J., YAO, Z., QI, Y. (Apr. 2001): «The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (Macaca mulatta) model of menopause». *J. reprod. Immunol.* 50(1): 41-55.

- LE GREVES, M., STEENSLAND, P., LE GREVES, P., NUBERG, G. (2002): «Growth hormone induces agedependent 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* 99: 7119-7123.
- LOBIE, P. E., GARCÍA-ARAGÓN, J., LINCOLN, D. T., BARNARD, R., WILCOX, J. N., WATERS, M. J. (1993): «Localization and ontogeny of GH receptor gene expression en the CNS». *Dev. Brain Des.* 74: 225-233.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J., SÁNCHEZ FRANCO, F., VELASCO, B., TOLÓN, R. M., PAROS, F., CACICEDO, L. (1996): «GH induces SS. and IGF-I gene expression in the cerebral hemispheres of aging rats». *Endocrinology* 137: 4384-4391.
- LÜSCHER, T. F., TANNER, F. C., NOLL, G. (1996): «Lipids and endothelial function: effects of lipid lowering and other therapeutic interventions». *Curr. Opin. Lipidol* 7: 234.
- MALAGUARNERA, L., FERLITO, L., IMBESI, R. M., GULIZIA, G. S., DI MAURO, S., MAUGERI, F., MALAGUARNERA, M., MESSINA, A. (2001): «Immunisenescence: a review». *Arch. Gerontol. Geriatr.* 32: 1-14.
- MEDINA, S., DEL RÍO, M., HERNANZ, A., DE LA FUENTE, M. (2000a): «Age-related changes in the neuropeptide Y effects on urine lymphoproliferation and interleukin-2 production». *Peptides* 21: 1403-1409.
- MEDINA, S., DEL RÍO, M., HERNANZ, A., DE LA FUENTE, M. (2000b): «The NPY effects on murine leukocyte adherence and chemotaxis change with age Adherent cell implication». *Reg. Peptides* 95: 35-45.
- MONTAGNA, M. and CARLISLE, K. (1990): «Structural changes in ageing skin». *British Journal of Dermatology* 112(35): 61-70.
- NYBERG, F. (2000): «GH in the Brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance». *Frontiers in Neuroendocrinology* 21: 330-348.
- OAKES, S. R., HAYNES, K. M., WATERS, M. J., HERINGTON, A. C., WERTHER, G. A. (1992): «Demonstration and localization of growth hormone receptor in human skin and skin fibroblasts». *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 1368-73.
- OLSEN, N. J., KOVACS, W. J. (1996): «Gonadal steroids and immunity». *Endocrine Rev.* 17: 369-384.
- ORTEGA, E., GARCÍA, J. J., DE LA FUENTE, M. (2000): «Modulation of adherence and chemotaxis of macrophage by norepinephrine. Influence of ageing». *Mol. and Cell. Biochem.* 203: 113-117.
- PAWELEC, G., BARNETT, Y., FORSEY, R., GLOBERSON, A., MCLEOD, J., CARUSO, C., FRANCESCHI, C., FÜLOP, T., GUPTA, S., MARIANI, E., MOCCHEGIANI, E., SOLANA, R. (2002): «T cells and ageing». *Frontiers in Bioscience* 7: D1056-D1183.
- PAXINOS, C., WATSON, C. (1982): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York Academic.
- PFEILSCHIFTER, J., KODITZ, R., PFOHL, M., SCHATZ, H. (Feb. 2002): «Changes in pro-inflammatory cytokine activity after menopause». *Endocr. Rev.* 23(1): 90-119.
- PHILLIPS, T. J., MD, DEMIRCIY, Z., MD, and SAHU, M., BA (2001): «Hormonal effects on skin aging». *Geriatric Dermatology* 17(4): 661-672.
- PIERARD-FRANCHIMONT, C., LETAWE, C., GOFFIN, V., et al. (1995): «Skin water holding capacity and transdermal estrogen therapy for menopause: A pilot study». *Maturitas* 22: 151-154.

- RAVNIKAR, V., ELKIND-HIRSCH, K., SCHIFF, I., et al. (1985): «Vasomotor flushes and the release of peripheral immunoreactive luteinising hormone releasing hormone in postmenopausal women». *Fertil Steril* 41: 881-887.
- ROSHAN, S., NADER, S., ORLANDER, P. (1999): «Ageing and hormones». *Eur. J. clin. Invest.* 29: 3-210.
- SASTRE, J., PALLARDO, F. V., VIÑA, J. (2000): «Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis». *IUBMB Life* 45(5): 427-435.
- SHAMES, R. S. (Apr. 2002): «Gender differences in the development and function of the immune system». *J. Adolesc. Health* 30(4 suppl 1): 59-70.
- 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.
- SHULMAN, D. I. (2002): «Metabolic effects of growth hormone in the child and adolescent». *Curr. Opin. Pediatr.* 14(4): 432-436.
- SOLANA, R., ALONSO, M. C., PEÑA, J. (1999): «Natural killer cells in healthy aging». *Exp. Gerontol.* 34: 435-443.
- SOLANA, R., PAWELEC, G. (1998): «Molecular and cellular basis of immunosenescence». *Mech. Ageing Dev.* 102: 115-129.
- STUBBS, W. A., DETITALLA, G., JONES, A., et al. (1978): «Hormonal and metabolic responses to an enkephalin analogue in normal man». *Lancet* ii: 1225-1227.
- THIBOUTOT, D. M. (1995): «Dermatological manifestations of endocrine disorders». *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3082-7.
- TOOGOOD, A. A. and SHALET, S. M. (1998): «Aging and growth hormone status». *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 12: 2-281.
- TORRES-ALEMÁN, I., PONS, S. ARÉVALO, M. A. (1994): «The IGF I system in the rat cerebellum: Developmental Regulation and Role in Neuronal survival and differentiation». *J. of Neuroscience Research* 39: 117-126.
- TREJO, J. L., CARRO, E., TORRES-ALEMÁN, I. (2001): «Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus». *J. Neurosci* 21: 1628-1634.
- VERTHELYI, D. (Jun. 2001): «Sex hormones as immunomodulators in health and disease». *Int. Immunopharmacol.* 1(6): 983-93.
- WOOLLEY, C. S., MCEWEN, B. S. (1992): «Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat». *J. Neurosci* 12: 2549-2554.
- YAAR, M. and GILCHREST, B. A. (2001): «Skin aging, postulated mechanisms and consequent changes in structure and function». *Geriatric Dermatology* 17(4): 617-630.

INTERVENCIONES

Prof. Rubia Vila

Quiero felicitarle por la presentación y por los interesantes resultados que has traído. Pero tengo algunas dificultades, a lo mejor

debido a una pérdida neuronal propia. Cuando se habla de número total de neuronas ¿es que se cuentan?, porque en otro lugar dices que no se puede diferenciar entre neuronas y células de la glia. Creo que, dado que a partir del año 1990 se ha sabido que en el hipocampo existe neurogénesis, es importantísimo poder diferenciar si existe proliferación neuronal o glial. Lo mismo me ocurre con lo siguiente: ¿Existe una disminución de la apoptosis o una proliferación celular? Finalmente, parece que la hormona de crecimiento sirve para muchas cosas. La pregunta es: ¿se equivoca la naturaleza dejando de producirla cuando más falta nos hace, en la vejez?

Prof. Pérez Pérez

Quiero expresar mi más sincera felicitación al Prof. Tresguerres por dos motivos fundamentales: El tema elegido y el excelente desarrollo del mismo.

Desde el punto de vista de la fisiología comparada deseaba preguntarle lo siguiente:

La hormona de crecimiento tiene acción sinérgica con las hormonas sexuales, es factor de maduración y desarrollo de la espermatogénesis y al mismo tiempo determinante de la producción de testosterona en sus distintas fases.

En la hembra también actúa como factor de desarrollo y crecimiento de los folículos hasta su maduración y posteriormente actúa en el mismo sentido en el desarrollo de la mórula, blastocisto, embrión y feto.

En consecuencia, la pérdida mediante declinación progresiva de esta hormona a medida que avanza la edad pone a término el período sexual activo-eficaz.

Por lo que respecta a la melatonina-hormona de la oscuridad es evidente su papel regulador en el ciclo sexual de todas las especies que habitan en el ecosistema terrestre.

La referida hormona por su acción antioxidante preserva al individuo del envejecimiento precoz. En la especie humana se observa que personas que viven en contacto con el medio ambiente (efecto de las radiaciones solares, ultravioletas y radicales libres), envejecen antes en sus rasgos fisionómicos: arrugas, deterioro de la piel, pigmentaciones anómalas, etc.

Ambas hormonas coinciden en la regulación de la sexualidad,

generando períodos de actividad sexual durante los días de luz decreciente y creciente (invierno y primavera).

No encuentro justificada la afirmación, al menos en animales que la castración disminuya las defensas (inmunodeficiencia). El buey, la cerda castrada (por cierto, muy frecuentes) no nos muestran incremento de ninguna patología comparativamente.

Lo que se observa es que las células NK (barredoras, asesinas, etc.) disminuyen con la edad y en orden al mismo efecto que se observa en el factor de crecimiento. Parece ser que las referidas células responsables fundamentalmente de evitar la penetración (fecundación) de gametos de especie heteróloga dejan de funcionar cuando la actividad sexual se extingue (andropausia, menopausia).

Le reitero al Prof. Tresguerres mi felicitación sincera.

Prof. Blázquez Fernández

Enhorabuena por el magnífico estudio que nos ha presentado, así como la extraordinaria iconografía que le acompaña. El papel de las hormonas sobre el envejecimiento y el sistema inmune, así como el estudio de los agentes que modulan la proliferación y la apoptosis de las células nerviosas tienen un gran interés, especialmente en las sociedades con mayores expectativas de vida, donde se manifiestan un elevado número de casos con enfermedades neurodegenerativas. Presumiblemente las células nerviosas descritas con capacidad proliferativa deben ser células gliales, ya que neuronas con esta actividad han sido descritas sólo en pequeño número en el hipocampo. No obstante, las células gliales tienen múltiples acciones sobre las neuronas, entre ellas las nutritivas, por lo que cambios en sus actividades podrían indirectamente afectar las neuronas. Por otra parte, estas células no pueden proliferar, pero determinadas situaciones o agentes pueden estimular su plasticidad, mediante el incremento de sus terminaciones y conexiones con otras neuronas, con lo que aumenta su actividad funcional. Este es el caso de los estudios realizados por el Prof. Facundo Valverde en el Instituto Cajal del CSIC, con animales de experimentación sometidos al efecto de la luz y de la obscuridad, y la demostración de que esto modificaba las arborizaciones y conexiones de las neuronas presentes en la corteza occipital del cerebro. Por ello pienso que el análisis de la plasticidad neuronal en su estudio podría ser de interés. Dado el

papel nocivo que los radicales libres juegan en el envejecimiento de los tejidos, sería también interesante estudiar la contribución de estas sustancias a los datos que nos ha presentado en animales viejos. De nuevo muchas gracias por su excelente conferencia.

PALABRAS FINALES DEL PRESIDENTE

El Prof. Tresguerres ha evocado con su explicación muchas cosas. Allá en los años 60, inicié yo estudios proliferativos después de conocer el enorme trabajo que llegó al Nobel a uno de ellos, a Goldstein y Brown, sobre la actividad proliferativa celular que él intuitivamente enfrentaba esa capacidad de morir, de terminar las células, que poco tiempo después se llamó apoptosis y fue aplicado ese nombre que ya se conocía anteriormente. Entre capacidad proliferativa de todos los tejidos, porque ensayaron a nivel de todos los tejidos, como eran aquellos factores, hormona de crecimiento, etc., que intervenían en la capacidad proliferativa celular y cómo era la apoptosis a nivel de todas esas estructuras. Los hallazgos han sido importantísimos y sobre todo, una vez más, recuerdo el trabajo inicial de Goldstein y Brown que ha dado pie a muchos investigadores y todo vuestro grupo, que lleva incluso algunos años, trabajando sobre la capacidad proliferativa. Deben ustedes seguir, no hace falta decírselo, que ya siguen con una gran actividad en este campo fundamental de la biología molecular y para la clínica médica y quirúrgica. De esa capacidad proliferativa celular controlada, cabe conseguir mejoras muy importantes en campos quirúrgicos que los cirujanos dominan.

Se levanta la sesión.