

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES
FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ALTERACIONES CEREBRALES DE LA RATA EN EL ENVEJECIMIENTO:
IMPLICACIÓN DEL SISTEMA HORMONA DE CRECIMIENTO-FACTOR DE
CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO I (GH/IGF-I) Y DEL PÉPTIDO
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)**

TESIS DOCTORAL

MARÍA SÁNCHEZ-GRANDE SÁNCHEZ
Madrid, 2012

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES
FACULTAD DE MEDICINA
Dpto. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ALTERACIONES CEREBRALES DE LA RATA EN EL ENVEJECIMIENTO:
IMPLICACIÓN DEL SISTEMA HORMONA DE CRECIMIENTO-FACTOR DE
CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO I (GH/IGF-I) Y DEL PÉPTIDO
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)**

Tesis presentada para optar
al grado de Doctor en Biología por

María Sánchez-Grande Sánchez

Directores de Tesis
Dra. Lucinda Cacicedo Egüés
Dr. Franco Sánchez-Franco

Madrid, 2012

A mis padres

A mi hermana

AGRADECIMIENTOS

Hasta la fecha este trabajo representa lo más difícil que he hecho en la vida. Todo el que haya escrito una tesis sabe lo que hacer una tesis significa. Una tesis puede convertirse en un desafío intelectual, profesional, personal y emocional comparable a escalar la montaña más alta del planeta.

Cada tesis es única. Única por su contenido, única por la experiencia vital de la persona que la llevó a cabo. Para mí han sido 9 años de una lucha sin cuartel, mi desierto personal. Durante estos años, en numerosas ocasiones he sentido una gran soledad, una gran incapacidad, una gran incertidumbre, un gran vacío y una falta de dirección absoluta.

Puedo decir que muchas veces pensé que esto no acabaría nunca, y que he vivido verdaderos momentos de desesperación y agonía por no conseguir finalizar este proyecto. Finalmente aquí estoy, escribiendo lo que será la última página de este manuscrito y, de alguna manera, la última página de esta etapa.

En numerosas ocasiones pensé en abandonar, si no lo hice fue gracias a todas las personas que me acompañaron en los peores momentos, alentándome, animándome y haciéndome creer que finalmente podría con ello.

Dicho esto, aquí vienen mis más sinceros agradecimientos a todos los que de una u otra manera han formado parte de este trabajo:

GRACIAS a mis directores de tesis la Dra. Cacicedo y el Dr. Sánchez Franco. Gracias especiales a la Dra. Cacicedo por su paciencia, comprensión y apoyo durante todos estos años. Gracias por el gran esfuerzo realizado este último año con la corrección de este trabajo.

GRACIAS a Manuela, Estrella, Ana, Pilar y Sonia, compañeras y amigas del Laboratorio del Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal. Sin vosotras habría sido imposible. Gracias por haberme cuidado tanto y haberme dado tanto cariño. Sé que vaya donde vaya nunca tendré unas compañeras como vosotras, siempre os voy a llevar en el corazón.

GRACIAS a Esther, Sonsoles, Puri, Gumer, David y Carmela del Laboratorio del Servicio de Endocrinología del Hospital Carlos III. El tiempo que pasé en vuestro laboratorio fue decisivo para terminar este trabajo. Gracias por haberme ayudado en todo lo que he necesitado, por vuestro apoyo científico y por vuestra gran amistad.

GRACIAS a Toni, Lali, Diana y Paino, jefes del Servicio de Neurobiología del Hospital Ramón y Cajal. Gracias por haberme ayudado en todo momento con vuestra experiencia, conocimiento y palabras de aliento.

GRACIAS a Ana, Carlos y Conso de la sección de Cirugía Experimental del Hospital Ramón y Cajal. Gracias por vuestra ayuda en todo lo referente al manejo de los animales. Gracias por vuestro continuo interés en este trabajo.

GRACIAS a Nuria, Silvia, Izaskun, Carol, Rafa y Amalia, compañeros y amigos de investigación. Gracias por haber estado siempre dispuestos a escucharme y a echarme una mano con cualquier problema.

GRACIAS a Paloma. Sin ti, simplemente, no habría habido tesis. Gracias por haberme ayudado a reconducir mi vida.

GRACIAS a mi abuela Juana y a mi abuela María. Gracias por todo vuestro cariño, consejos y aliento durante toda mi vida. Gracias por estar siempre ahí para mí.

GRACIAS a mis padres, los pilares de mi vida. Esta tesis no es solo mía, es vuestra también. Gracias por todo vuestro esfuerzo y dedicación hacia mí. Gracias por darme siempre vuestro gran amor y vuestro apoyo incondicional, sé que a veces ha sido difícil. Os quiero.

GRACIAS a mi hermana Nuria, el otro pilar de mi vida. Esta tesis también es tuya. Te doy las gracias por estar siempre a mi lado, por tu gran generosidad y por todo tu amor. Te quiero muchísimo. Gracias a Iván por tu amistad y cariño.

GRACIAS a Dios, fortaleza de mi vida. Gracias por haberme permitido conocer un poco más de tu perfección y por haberme dado la dirección y la fuerza interior necesaria para superar todas las dificultades.

A todos, GRACIAS

Indice

Clave de Abreviaturas	1
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	5
<hr/>	
1.- GENERALIDADES DEL SISTEMA GH/IGF-I	5
2.- GH Y CEREBRO	7
2.1.- Receptor de GH en el cerebro.....	9
2.2.- Mecanismo de acción de GH: vías de señalización intracelular.....	10
2.3.- Expresión de GH en el cerebro	11
2.4.- Papel fisiológico de GH en el sistema nervioso central	12
Acciones neurotróficas durante el desarrollo embrionario.....	12
Acciones neuroprotectoras	13
2.5.- Sistema GH/IGF-I y envejecimiento	14
2.6.- Sistema GH/IGF-I y envejecimiento cerebral.....	15
2.7.- Sistema GH/IGF-I y alteraciones cognitivas en el envejecimiento	16
2.8.- Tratamiento con GH en el envejecimiento: acciones de GH en el cerebro viejo	17
3.- SECRETAGOGOS DE GH	18
3.1.- Ghrelina	18
3.2.- Regulación de GH por los secretagogos de GH.....	19
3.3.- Receptor de secretagogos de GH en el cerebro.....	19
3.4.- Mecanismo de acción de los secretagogos de GH.....	20
3.5.- Papel fisiológico de los secretagogos de GH en el sistema nervioso central.....	21
Acciones neurotróficas	21
Acciones neuroprotectoras.....	21
3.6.- Secretagogos de GH y envejecimiento.....	22
3.7.- Tratamiento con ghrelina y secretagogos de GH en el envejecimiento.....	23

4.- MIELINA.....	24
4.1.- Estructura de la vaina de mielina	24
4.2.- Composición de la mielina	24
4.3.- Función de la vaina de mielina.....	25
4.4.- Oligodendrogénesis.....	26
4.5.- Mielinización del cerebro.....	27
4.6.- Papel de GH en la mielinogénesis en el período perinatal	28
4.7.- Secretagogos de GH y mielina.....	29
4.8.- Alteraciones de la vaina de mielina en el envejecimiento cerebral.....	30
4.9.- Repercusiones funcionales de la alteración de la vaina de mielina en el envejecimiento.....	30
4.10.- Remielinización en el envejecimiento.....	31
5.- NEUROINFLAMACIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO	33
5.1.- Inflamación sistémica.....	33
5.2.- Inflamación cerebral.....	33
5.3.- Inflamación y desmielinización cerebral.....	34
5.4.- Inflamación e hipófisis.....	35
5.5.- Sistema GH/IGF-I e inflamación.....	36
5.6.- Secretagogos de GH e inflamación.....	37
6.- MEMORIA Y ENVEJECIMIENTO.....	38
6.1.- Eje GH/IGF-I y memoria.....	38
6.2.- Secretagogos de GH y memoria	39
6.3.- CREB y memoria	40
6.4.- BDNF y memoria	41
7.- FACTORES NEUROTRÓFICOS Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL.....	42
7.1.- PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.....	42

7.1.1.- VIP: distribución y acciones en el sistema nervioso	42
7.1.2.- Mecanismos de señalización intracelular de VIP: activación de CREB	43
7.1.3.- VIP y envejecimiento cerebral.....	43
7.1.4.- VIP y mielinización.....	44
7.1.5.- VIP e inflamación.....	45
7.2.- FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO	45
7.2.1.- BDNF: localización y acciones.....	45
7.2.2.- Receptores de BDNF: TrkB y P75 ^{NTR}	46
7.2.3.- BDNF y envejecimiento cerebral.....	47
7.2.4.- BDNF y mielinización.....	48
7.2.5.- BDNF e inflamación	49
7.2.6.- BDNF e hipófisis	50

OBJETIVOS 53

MATERIAL Y MÉTODOS 55

1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1.- Estudios *in vitro*..... 55

1.2.- Estudios *in vivo*

2.- DISEÑOS EXPERIMENTALES..... 55

2.1.- ESTUDIOS *IN VITRO*: estudio del proceso de oligodendrogénesis *in vitro*..... 55

2.1.1.- Estudio del efecto de GH sobre la oligodendrogénesis *in vitro*..... 55

2.1.2.- Estudio de las vías de señalización implicadas en la inducción de O4 y MBP por GH..... 56

2.1.2.1.- Experimentos destinados al estudio del efecto de GH sobre la activación de las vías MAPK y PI3K y el factor de transcripción CREB

56

2.1.2.2.- Experimentos destinados al estudio del efecto ejercido por el bloqueo de distintas rutas de señalización sobre la inducción de O4 y MBP por GH. Efecto de los inhibidores LY294002 y PD098059	56
2.1.3.- Estudio del efecto de GHRP-6 sobre la inducción de MBP <i>in vitro</i>	56
2.1.4.- Estudio del efecto de VIP sobre la oligodendrogénesis <i>in vitro</i>	58
2.1.4.1.- Experimentos destinados al estudio del efecto ejercido por el bloqueo de distintas rutas de señalización sobre la inducción de O4 y MBP. Efecto de los inhibidores LY294002, PD098059 y H89	58
2.1.4.2.- Experimentos destinados al estudio del efecto de VIP sobre la activación del factor de transcripción CREB	58
2.2.- ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	59
2.2.1.- Estudio del efecto del tratamiento intracerebroventricular con GH en la expresión de MBP y VIP en el cerebro de rata vieja.....	59
2.2.2.- Estudio del efecto del tratamiento con GH subcutánea en el cerebro de rata vieja..	60
2.2.3.- Estudio <i>in vivo</i> del papel de IGF-I en la reversibilidad de la hipomielinización por GH del cerebro de rata vieja	61
2.2.4.- Estudio del efecto del tratamiento subcutáneo con GHRP-6 en el cerebro de rata vieja	62
2.2.4.1.- Efecto de GHRP-6 en la expresión de MBP en el cerebro de rata vieja analizada por inmunohistoquímica	62
2.2.4.2.- Efecto del tratamiento con GHRP-6 subcutáneo: estudios por Western immunoblot y por RT-PCR a tiempo real en el cerebro de rata vieja	63
2.2.5.- Estudio <i>in vivo</i> del papel de IGF-I en la reversibilidad de la hipomielinización del cerebro de rata vieja por GHRP-6.....	64
2.2.6.- Estudio del efecto de VIP en el cerebro de rata vieja y los mecanismos implicados.....	66
2.2.6.1.- Efecto del tratamiento subcutáneo con VIP en el cerebro de rata vieja.....	66
2.2.6.2.- Estudio <i>in vivo</i> del papel del BDNF como mediador de los efectos de VIP sobre el cerebro de rata vieja.	66
2.2.6.3.- Estudio <i>in vivo</i> del papel de IGF-I como mediador de los efectos del VIP sobre el cerebro de rata vieja.....	66
2.2.7.-Efecto del tratamiento con GH y/o GHRP-6 en la capacidad cognitiva de ratas viejas: estudios comportamentales.....	67

3.- MÉTODOS.....	69
3.1.- CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE CEREBRO DE FETO DE RATA.....	69
3.1.1.- Material biológico.....	69
3.1.2.-Técnica del cultivo.....	69
3.1.3.- Medios de cultivo.....	70
3.1.4.- Protocolo de incubación.....	70
3.2.- INMUNOCITOQUÍMICA.....	70
3.2.1.- Fijación y preparación de los cultivos celulares.....	70
3.2.2.- Inmunocitoquímica.....	71
3.3.- INMUNOHISTOQUÍMICA.....	71
3.3.1.- Fijación y preparación de los tejidos.....	71
3.3.2.- Inmunohistoquímica.....	72
3.4.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN INMUNOBLOT.....	72
3.4.1.- Obtención de extractos de células procedentes de cultivo.....	73
3.4.2.- Obtención de los extractos de tejidos.....	73
3.4.3.- Cuantificación de proteínas.....	73
3.4.4.- Electroforesis y transferencia de las proteínas.....	73
3.4.5.- Detección de las proteínas (Inmunoblot).....	74
3.5.- ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS.....	75
3.6.- ESTEREOTAXIA.....	76
3.7.- RADIOINMUNOENSAYO DE IGF-I.....	76
3.8.- CUANTIFICACIÓN DEL ARNm POR RT-PCR A TIEMPO REAL.....	76
3.8.1.- Extracción y cuantificación de ARN total.....	76
3.8.2.- Transcripción reversa.....	77

3.8.3.- PCR cuantitativa.....	77
3.8.4.- Cuantificación y análisis de datos.....	78
RESULTADOS	81
<hr/>	
A.- SISTEMA GH/IGF-I EN EL ENVEJECIMIENTO.....	81
1.- ALTERACIONES HIPOFISARIAS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS	81
1.1.- Expresión del ARNm de GH en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	81
1.2.- Expresión del ARNm de IGF-I en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	82
2.- CAMBIOS PERIFÉRICOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6 EN LOS NIVELES CIRCULANTES DEL IGF-I	82
3.- CAMBIOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS.....	83
3.1.- Expresión del ARNm del receptor de GH (R-GH) en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	83
3.2.- Expresión del ARNm de IGF-I en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	83
3.3.- Expresión del ARNm del receptor del IGF-I (R-IGF-I) en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	85
3.4.- Expresión de los ARNms de los R-GHS en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	86
B.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GH SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENESIS	88
1.- EFECTO DE GH SOBRE LA OLIGODENDROGENESIS EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS	88
1.1.- Efecto de GH sobre el número de precursores de OD y de OD maduros	88
1.2.- Activación de MAPK y Akt: estudio tiempo-respuesta.....	89
1.3.- Efecto de los inhibidores PD y LY en la inducción de O4 y MBP por GH.....	90
1.4.- Efecto de GH sobre la activación de CREB	91

2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GH SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO	92
2.1.- Efecto del tratamiento con GH i.c.v. sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas.....	92
2.2.- Efecto del tratamiento subcutáneo con GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas.....	95
2.3.- Mediación del IGF-I en los efectos de GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas.....	96
2.4.- Efecto de GH sobre la activación de CREB en el cerebro de ratas viejas.....	98
C.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GHRP-6 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE OD EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS	99
1.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE OD EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS	99
2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO	100
2.1.- Efecto del tratamiento con GHRP-6 subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas	100
2.2.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por GHRP-6 en el cerebro de ratas viejas	102
3.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS	104
D.- ALTERACIONES DE BDNF RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO.....	105
1.- Expresión del ARNm de BDNF en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	105
2.- Expresión del ARNm de BDNF en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	106
E.- ALTERACIONES INFLAMATORIAS EN EL CEREBRO RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO.....	108
1.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6	108
1.1.- Expresión del ARNm de la IL-1 β en el cerebro en ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	108
1.2.- Expresión del ARNm de TNF- α en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	109

1.3.- Expresión del ARNm de la IL-10 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	110
1.4.- Expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	111
2.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LA HIPÓFISIS DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6.....	113
2.1.- Expresión de los ARNms de IL-1 β y TNF- α en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	113
2.2.- Expresión del ARNm de CXCL12 en la hipófisis en ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	114
F.- ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA MEMORIA EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6.....	116
G.-VIP Y ENVEJECIMIENTO	118
1.- ALTERACIONES DE LAS CÉLULAS VIPÉRGICAS CEREBRALES EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH	118
2.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE VIP SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENESIS	119
2.1.- EFECTO DE VIP SOBRE LA OLIGODENDROGENESIS EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS.....	120
2.1.1.- Efecto de VIP sobre el número de precursores de OD y de OD maduros	120
2.1.2.- Efecto de los inhibidores LY, PD y H89 en la inducción de MBP y/o O4 por VIP	121
2.1.3.- Efecto de VIP sobre la activación de CREB: estudio tiempo respuesta.....	123
2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE VIP SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO	124
2.2.1.- Efecto del tratamiento con VIP subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas	124
2.2.2.- Papel de BDNF en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas	125
a) Efecto del bloqueo de BDNF sobre la inducción de MBP por VIP	125
b) Efecto de VIP sobre la expresión de BDNF.....	126
2.2.3.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas	127
a) Efecto del bloqueo del IGF-I sobre la inducción de MBP por VIP	127

b) Efecto del tratamiento con VIP sobre la expresión del IGF-I y del R-IGF-I en el cerebro	128
3.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VIP.....	130
4.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON VIP SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS.....	131
4.1.- Expresión del ARNm de la IL-1 β en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP	131
4.2.- Expresión del ARNm de la IL-6 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP	132
4.3.- Expresión del ARNm de TNF- α en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP	133
4.4.- Expresión del ARNm de TGF- β en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP	134
4.5.- Expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP	135

DISCUSIÓN 137

A.- SISTEMA GH/IGF-I EN EL ENVEJECIMIENTO.....	138
1.-.ALTERACIONES HIPOFISARIAS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS	138
2.- CAMBIOS PERIFÉRICOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6 EN LOS NIVELES CIRCULANTES DEL IGF-I	139
3.- CAMBIOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS.....	140
3.1.- Expresión del ARNm del R-GH en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	140
3.2.- Expresión del ARNm del IGF-I y del R-IGF-I en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	141
3.3.- Expresión de los ARNms de los R-GHS en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6	141
B.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GH SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENESIS.....	142
1.- EFECTO DE GH SOBRE LA OLIGODENDROGENESIS EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS	142

1.1.- Efecto de GH sobre el número de precursores de OD y de OD maduros.....	142
1.2.- Participación de las vías PI3K y MAPK en los efectos de GH sobre la oligodendrogénesis <i>in vitro</i>	143
1.3.- Efecto de GH sobre la activación de CREB.....	144
2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GH SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO.....	145
2.1.- Efecto del tratamiento con GH i.c.v. sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas.....	145
2.2.- Efecto del tratamiento subcutáneo con GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas	145
2.3.- Mediación de IGF-I en los efectos de GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas	146
2.4.- Efecto de GH sobre la activación de CREB en el cerebro de ratas viejas	147
 C.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GHRP-6 SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENESIS	 148
1.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE OD EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS.....	148
2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO.....	149
2.1.- Efecto del tratamiento con GHRP-6 subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas	149
2.2.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por GHRP-6 en el cerebro de ratas viejas.....	149
3.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CREB EN CEREBRO DE RATAS VIEJAS.....	150
 D.- ALTERACIONES DE BDNF RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO	 150
1.- Expresión del ARNm del BDNF en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	150
2.- Expresión del ARNm del BDNF en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.....	151
 E.- ALTERACIONES INFLAMATORIAS EN EL CEREBRO RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO	 152
1.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6	152

2.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LA HIPÓFISIS DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6.....	154
F.- ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA MEMORIA EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6	154
G.- VIP Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL	155
1.- ALTERACIONES DE LAS CÉLULAS VIPÉRGICAS CEREBRALES EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH.....	155
2.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE VIP SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENESIS.....	156
2.1.- ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE VIP SOBRE EL PROCESO DE OLIGODENDROGENESIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	156
2.1.1.- Efecto de VIP sobre el número de precursores de OD y de OD maduros	156
2.1.2.- Efecto de los inhibidores LY, PD y H89 en la inducción de MBP y/o O4 por VIP.....	157
2.1.3.- Efecto de VIP sobre la activación de CREB	157
2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE VIP SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO.....	157
2.2.1.- Efecto del tratamiento con VIP subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas.....	157
2.2.2.- Papel de BDNF en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas	158
2.2.3.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas	159
3.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VIP.....	159
4.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON VIP	159
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	165

Clave de Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNF	Factor neurotrófico dependiente de actividad
ADNP	Proteína neuroprotectora dependiente de actividad
Akt	Proteína quinasa específica de serina/treonina
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Control
C.V.	Control vieja
CaMKIV	Calcio calmodulina quinasa IV
CBP	Proteína de unión a CREB
CNP	Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CREB	Proteína de unión a CRE
DAB	Diaminobenzidina
DGH	Deficiencia de GH
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPX	Di-N-butil phthalato en xileno
E	Día de preñez
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
EEA	Encefalitis experimental autoinmune
Elk-1	Factor de transcripción de la familia E twenty-six (ETS)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FGFβ	Factor básico de crecimiento de fibroblastos β
Fos	Factor de transcripción codificado por el proto-oncogén c-Fos
GAS	Sitio activado por interferón gamma
GC	Galactocerebrósido
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GH	Hormona de crecimiento
GHBP	Proteínas transportadoras de GH
GHRH	Hormona liberadora de GH

GHRP-6	Hexapéptido liberador de GH
GHS	Secretagogos de GH
Grb2	Proteína de unión a receptor de factor de crecimiento-2
H³	Tritio
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanolulfónico
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IFN-γ	Interferon gamma
IGFBP	Proteínas de unión de IGFs
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina I
IgG	Inmunoglobulina G
IL10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-1α	Interleuquina 1 α
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
iNOS	Sintetasa del óxido nítrico inducible
IP	Inositol fosfato
IRS	Sustrato del receptor de insulina
JAK	Proteína quinasa de la familia Janus
Jun	Factor de transcripción codificado por el gen c-Jun
kDa	Kilodalton
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacáridos
LTP	Potenciación a largo plazo
LY	LY294002
m	Meses
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MBP	Proteína básica de mielina
MEK	Quinasa de MAPK/ERK
MMSE	Minimental state examination
MOPS	Ácido 3-(N-morpholino)propanoulfónico
Myc	Factor de transcripción codificado por el gen c-Myc
n.s.	No significativo
NFI	Factor nuclear I
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
O4	Antígeno O4

OD	Oligodendrocito
p	Probabilidad de error
P10	Día postnatal 10
P12	Día postnatal 12
P75^{NTR}	Receptor P75 de las neurotrofinas
PAC1-R	Receptor del polipéptido activador de la adenil ciclasa 1
PACAP	Polipéptido activador de la adenil ciclasa de pituitaria
PB	Tampón fosfato
PBS	Tampón fosfato salino
PD	PD098059
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK	Fosfoinosítidos
PI3K	Fosfatidilinositol-3' quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
Pit-1	Factor de transcripción específico de hipófisis
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLP	Proteína proteolipídica
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
preOD	Pre oligodendrocitos
PRL	Prolactina
PVDF	Polivinil difluoruro
r.p.m.	Revoluciones por minuto
Ras	Proteína codificada por el gen ras
R-GH	Receptor de GH
R-GHS	Receptor de secretagogos
R-IGF-I	Receptor de IGF-I
Rsk	Proteína quinasa ribosomal S6
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
s.c.	Subcutáneo
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser133	Serina 133
SFB	Suero fetal bovino
SHC	SH2-containing domain protein
SNC	Sistema nervioso central
SNCa	Suero normal de cabra
SNP	Sistema nervioso periférico
SOS	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
SRE	Elemento de respuesta al suero

SRF	Factor de respuesta al suero
SS	Somatostatina
STATs	Transductores de señales y activadores de la transcripción
T4	Tiroxina
TGF-β	Factor de crecimiento transformador β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TrkB	Receptor tirosina quinasa B de neurotrofinas
TSH	Hormona tirotrópica
u.d.a.	Unidades densitométricas arbitrarias
U.A.	Unidades arbitrarias
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VPAC	Receptor de VIP

Introducción

1.- GENERALIDADES DEL SISTEMA GH/IGF-I

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona proteica de naturaleza polimórfica (Lewis, 1992) que es sintetizada, almacenada y secretada por las células somatotropas de la adenohipófisis (Pasteels et al., 1972). La forma mayoritaria de la GH es una proteína de 191 aminoácidos, lineal y no glicosilada con dos puentes disulfuro y un peso molecular de 22 kDa (Niall et al., 1973; Nicoll et al., 1986). Ésta constituye el 90% de todas las variantes y sus efectos son el prototipo de las acciones atribuidas a GH. Existe otra variante de GH de 20 kDa, que presenta una delección de 15 aminoácidos entre las posiciones 32 a 46 de la variante de 22 kDa, y representa aproximadamente el 10% del total (Baumann et al., 1985). El resto corresponde a otras formas moleculares oligoméricas (Gorden et al., 1973) con actividad biológica variable (Baumann, 1991).

La secreción de GH está regulada por un sistema complejo de interacciones. En este control destacan dos neuropéptidos hipotalámicos con acciones contrapuestas: la hormona liberadora de GH (GHRH) y la somatostatina (SS) (Müller et al., 1987). GHRH estimula la expresión del gen y la secreción de GH, mientras que la SS inhibe su secreción (Brazeau et al., 1973; Guillemin et al., 1982; Gelato y Merriam, 1986; Mayo et al., 1995, 1996). La ghrelina, el ligando endógeno del receptor de los secretagogos de GH (R-GHS), es el neuroregulador descrito más recientemente (Kojima et al., 1999). La ghrelina segregada por el estómago actúa sobre la hipófisis para estimular la secreción de GH. Además, la ghrelina sintetizada en el hipotálamo regula la secreción de GH aumentando la liberación de GHRH, amplificando su acción a nivel de las células somatotropas, reduciendo la liberación de SS y antagonizando la señalización de sus receptores (Smith, 2005). Por último, la propia GH, que interviene en la regulación de GHRH y SS (Berelowitz, Firestone, et al., 1981) y el IGF-I, principal mediador de las acciones de GH, actúan tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (Berelowitz, Szabo, et al., 1981; Yamashita y Melmed, 1986; Hartman et al., 1993) regulando la secreción de la GH mediante mecanismos de retrocontrol negativo.

La secreción de GH es pulsátil en humanos y en todas las especies de mamíferos estudiadas hasta la fecha (Tannenbaum y Martín, 1976). En muchas especies, la edad y el sexo, determinan en gran medida la síntesis y secreción de GH y su pulsatilidad (Jansson et al., 1985; Isaksson et al., 1988; Gattford et al., 1998). El patrón de secreción de GH exhibe un dimorfismo sexual, donde los machos presentan niveles bajos de GH basal con pulsos de secreción amplios de frecuencia regular (cada 3-4 horas) y las hembras niveles basales más elevados con pulsos de secreción irregulares y de baja amplitud (Edén, 1979; Jansson et al., 1985). En las especies de mamíferos estudiadas las concentraciones de GH, son elevadas durante el periodo perinatal y disminuyen progresivamente durante la infancia (Rieutort, 1974, 1981; Strosser y Mialhe, 1975; Gluckman et al., 1979; de Zegher et al., 1993). Un segundo aumento en las concentraciones de GH ocurre durante la pubertad tanto en hembras como en machos (Strosser y Mialhe, 1975; Ojeda y Jameson, 1977; Edén, 1979; Zadik et al., 1985). A partir de este momento la secreción de GH comienza a declinar alcanzando niveles bajos en la senescencia (Corpas et al., 1993).

Además de en las células somatotropas de la hipófisis anterior, se han observado ciertos niveles de expresión de GH en áreas del SNC (Gossard et al., 1987; Yoshizato et al.

1998), monocitos (Weigent et al., 1988), linfocitos, timocitos (de Mello-Cohelho et al., 1998), neutrófilos (Kooijman et al., 1997), placenta (Boguszewski et al., 1998) y tejido mamario normal y neoplásico (Mol et al., 1995).

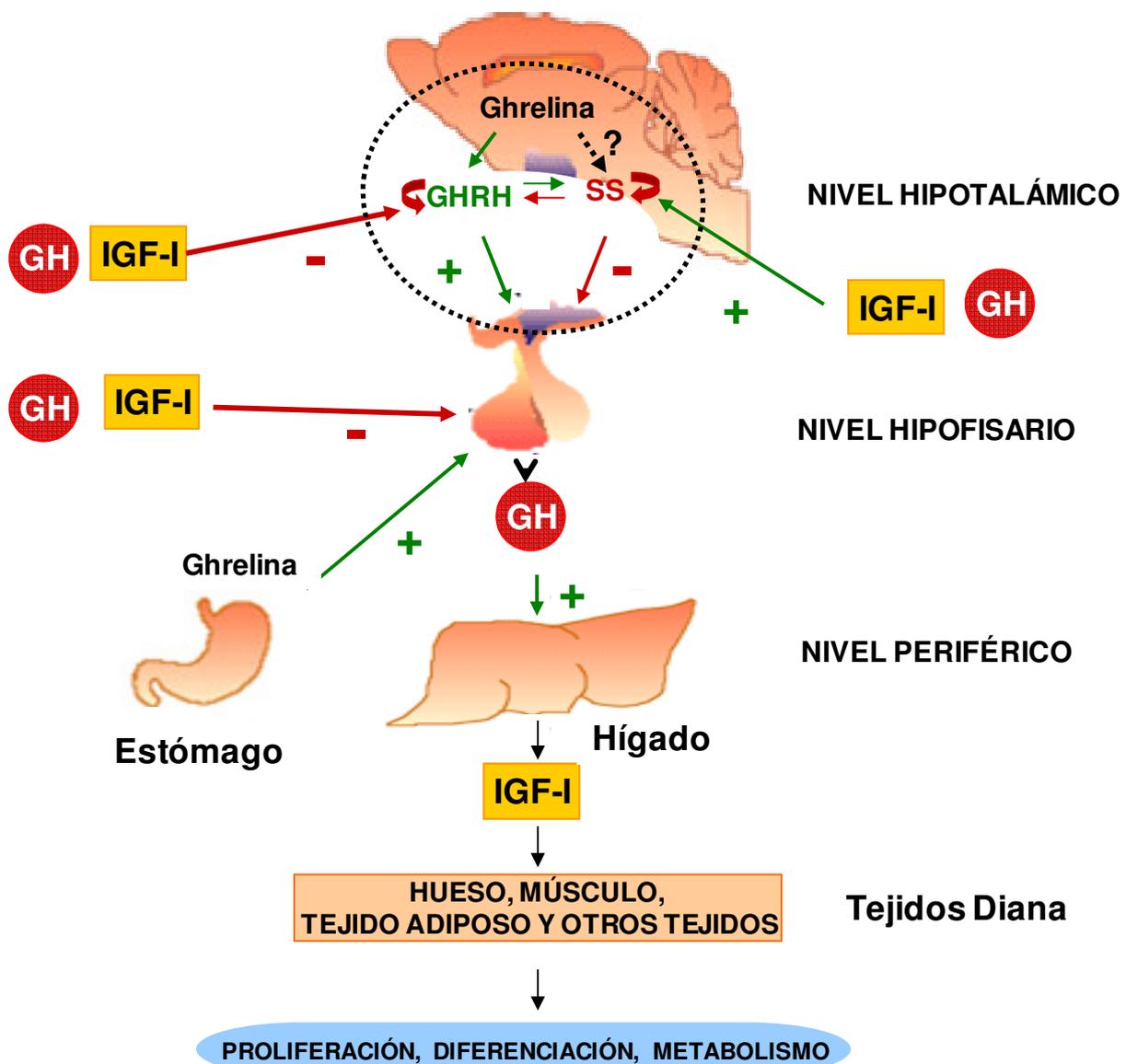


Figura 1. Autorregulación del sistema GH/IGF-I. Representación esquemática de las interacciones entre los distintos componentes del sistema en sus tres niveles: nivel hipotalámico, nivel hipofisario y nivel periférico. Las flechas verdes indican un efecto estimulador y las rojas un efecto inhibitorio.

Los mecanismos por los que GH ejerce sus efectos biológicos son el resultado de la unión de la GH a su receptor (R-GH) y dependen de la presencia en la sangre de proteínas transportadoras de GH (GHBP) que compiten con su receptor en su afinidad por la GH, modulando sus acciones biológicas. Se han descrito dos tipos distintos de GHBP, una de alta afinidad, la GHBP1 (Baumann et al., 1986) y otra de baja afinidad, la GHBP2 (Baumann y Shaw, 1990a) cuya estructura es idéntica a la porción extracelular del receptor de la GH (Barnard et al., 1989; Zhou et al., 1997). La mitad de la GH de 22 kDa, y una cuarta parte de la variante de 20 kDa circulan en forma de complejos GH-GHBP (Baumann et al., 1989; Baumann y Shaw, 1990b).

Además de las acciones directas, muchos de los efectos de GH son ejercidos indirectamente a través de la estimulación de la síntesis y secreción del factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-I (Isaksson et al., 1988; Daughaday, 1989; Xu y Sonntag, 1996). El IGF-I es un pequeño péptido (7,5 kDa) estructuralmente relacionado con la pro-insulina. El IGF-I es el péptido dependiente de GH mejor caracterizado, siendo la GH la responsable principal de los niveles de IGF-I plasmáticos (Clemmons, 2006). Aunque la mayoría del IGF-I plasmático proviene de la síntesis y liberación hepática (Clemmons y Van Wyk, 1984; Schwander et al., 1983) la GH también estimula la síntesis y secreción de IGF-I en otros órganos, incluido el SNC, (D'Ercole et al., 1984, 1986; Hynes et al., 1987; Garcia-Segura et al., 1991), donde el IGF-I puede actuar por mecanismos paracrinós o autocrinós (Murphy y Friesen, 1988; Holly y Wass, 1989; Liu et al., 2000). Aproximadamente el 1% del IGF-I plasmático circula de forma libre, el resto se une a proteínas de unión específicas (IGFBP) que aumentan su vida media (Janssen y Lamberts, 1999). Existen 6 IGFBP específicas de tejido que constituyen un elaborado sistema de transporte y regulación del IGF-I (Daughaday y Rotwein, 1989). El IGF-I libre se une al receptor de IGF-I (R-IGF-I) para ejercer sus acciones biológicas (Bondy et al., 1990).

2.- GH Y CEREBRO

Además de sus acciones clásicas sobre el crecimiento y el metabolismo, la GH ejerce importantes funciones en el cerebro.

La amplia distribución de GH y de su receptor en el SNC fetal (García-Aragón et al., 1992; Lobie et al., 1993) sugiere que la GH pueda ejercer un papel relevante a este nivel. Numerosos estudios han evidenciado que la GH juega un papel clave en el desarrollo y maduración del cerebro actuando como un factor de proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Turnley et al., 2002; Ajo et al., 2003; Sanders y Harvey, 2004).

Estudios en ratones con defectos congénitos de GH han puesto de manifiesto la importancia de GH en el desarrollo cerebral. Los ratones deficientes de GH Snell *dwarf*, con una mutación del gen Pit1, y el ratón Little, con una alteración en el gen del receptor de GHRH, presentan microcefalia con hipomielinización, crecimiento neuronal retardado con una pobre sinaptogénesis y actividad locomotora reducida (Morisawa et al., 1989; Noguchi, 1996). El tratamiento con GH de estos ratones normaliza parcialmente el peso cerebral y el contenido de ADN y ARN, el tamaño neuronal, y el tamaño y la arborización dendrítica, aumentando su densidad (Sugisaki et al., 1985; Noguchi et al., 1988). Por el contrario, los ratones transgénicos que sobreexpresan GH presentan un mayor crecimiento, un elevado peso de la médula espinal y del cerebro y un aumento de las motoneuronas espinales, además de numerosas alteraciones endocrinas (Chen et al., 1997; Bartke et al., 1999). En humanos con síndrome de Laron, causado por una mutación del R-GH, se observa un desarrollo motor retardado, microcefalia y retraso en el desarrollo intelectual (Rosenfeld et al., 1994; Laron, 1999).

En el cerebro adulto, la GH está implicada en la regulación de las funciones cognitivas, del balance energético, la memoria, el aprendizaje, el estado de ánimo, la neuroprotección, la

neurogénesis, el flujo sanguíneo, el sueño y bienestar general (Nyberg, 2000; Scheepens et al., 2000; Aberg et al., 2009).

En los últimos años las acciones de GH en el cerebro han recibido una gran atención, especialmente en el contexto de la deficiencia de GH (DGH) en humanos. Los niños con DGH sufren alteraciones del sueño y son psicológicamente inmaduros (Hayashi et al., 1992). Los pacientes adultos con DGH adquirida presentan fatiga, falta de concentración, baja energía, alteraciones de la memoria, irritabilidad y una falta de bienestar generalizada (Björk et al., 1989; McGauley, 1989; McGauley et al., 1990; Bengtsson et al., 1993; Rosenfeld y Bengtsson, 1994). La administración de GH a estos individuos aumenta los niveles de GH en el LCR (Rosenfeld y Bengtsson, 1994) y mejora la función cognitiva, el estado de ánimo, la memoria y en términos generales el bienestar psicológico (McGauley, 1989; Bengtsson et al., 1993; Deijen et al., 1998; Arwert et al., 2006). Se han observado resultados semejantes en ratas, donde la carencia de GH también afecta a los procesos de aprendizaje y memoria (Schneider-Rivas et al., 1995; Le Grevès et al., 2002, 2006).

Aunque todas estas evidencias apoyan un papel de la GH en el cerebro, el modo y los mecanismos mediante los cuales la GH alcanza y actúa en el cerebro no están completamente clarificados. La GH puede actuar en el cerebro de manera directa o indirecta a través de mediadores de origen tanto periférico como local. La acción directa de la GH en el SNC está avalada por el hecho de que su receptor se expresa ampliamente en el cerebro (Burton et al., 1992) y por la capacidad de la GH de atravesar la BHE (Pan et al., 2005). Además, la GH se expresa en el cerebro (Gossard et al., 1987) donde puede actuar mediante mecanismos autocrinos/paracrinos (Lobie et al., 2000).

Está ampliamente aceptado que muchas de las acciones de GH son indirectas y están mediadas por las acciones autocrinas/paracrinas del IGF-I (D'Ercole et al., 1984; Isaksson et al., 1987; Ajo et al., 2003). Tanto el IGF-I como el R-IGF-I se expresan en la mayoría de las áreas cerebrales (Werther et al., 1990; Sonntag et al., 1999). La GH puede actuar indirectamente en el cerebro aumentando los niveles de IGF-I circulante, que, tras atravesar la BHE alcanza el SNC (Reinhardt y Bondy, 1994), o estimulando la síntesis de IGF-I a este nivel (Hynes et al., 1987; López-Fernández et al., 1996; Velasco et al., 1998; Frago et al., 2002).

Aunque el IGF-I es el principal mediador de las acciones de GH, otros mediadores pueden estar implicados en las acciones de GH en el cerebro. El tratamiento con GH aumenta los niveles de diversos neuropéptidos, aminoácidos y metabolitos de monoaminas en el LCR de pacientes con DGH (Burman et al., 1995; Johansson, Larson, et al., 1995; Nyberg y Burman, 1996). En ratas viejas la administración subcutánea de GH induce en la corteza cerebral la expresión de SS, neuropéptido implicado en el proceso de memoria (López-Fernández et al., 1996). Las interrelaciones demostradas entre IGF-I, VIP y BDNF sugieren que estos factores neurotróficos puedan mediar las acciones de GH en el SNC. En este sentido estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado la existencia de una estrecha relación entre el IGF-I y VIP (Lara et al., 1994; Fernández et al., 2003). De igual manera, se ha descrito una relación entre el IGF-I y la expresión de BDNF en el cerebro de ratas (Park et al., 2011).

2.1.- Receptor de GH en el cerebro

El R-GH es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de los receptores de citoquinas (Postel-Vinay y Finidori, 1995). El R-GH consiste en una cadena polipeptídica de 620 aminoácidos con un único dominio transmembrana (Kelly et al., 1991) que conecta un dominio extracelular, responsable de la interacción con la hormona, con un dominio intracelular, asociado con el sistema efector (Leung et al., 1987).

Múltiples estudios utilizando diversas técnicas han puesto de manifiesto la presencia del R-GH en el cerebro de una gran variedad de especies (Fraser et al., 1990; Burton et al., 1992; Lobie et al., 1993; Hull y Harvey, 1998) incluido el hombre (Lai et al., 1991; Castro et al., 2000).

En la rata, se ha detectado la expresión del ARNm y de la proteína del R-GH en todos los tipos de células del cerebro embrionario (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglia) observándose una mayor expresión en el lóbulo frontal, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo, tallo cerebral y bulbo olfatorio (Lobie et al., 1993). La expresión del R-GH aumenta significativamente a partir de la mitad de la preñez, alcanzando su máximo nivel en los primeros días de vida postnatal y disminuyendo posteriormente. En el cerebro de la rata joven, la expresión del R-GH se localiza fundamentalmente en las áreas cerebrales implicadas activamente en la neurogénesis, incluido el giro dentado del hipocampo, el bulbo olfatorio y la zona sub-ventricular (Lobie et al., 1993; Turnley et al., 2002). En el cerebro de la rata adulta, aunque la expresión del R-GH es relativamente baja (García-Aragón et al., 1992; Lobie et al., 1993), su distribución espacial es similar a la del cerebro joven, localizándose principalmente en los núcleos periventriculares, neuronas corticales, plexo coroideo y en el giro dentado del hipocampo (Fujikawa et al., 2000). En términos generales, la distribución regional del R-GH coincide con áreas cerebrales de alta expresión del IGF-I y del R-IGF-I (Bondy et al., 1992; Donhaue et al., 2006). El patrón ontogénico de expresión del IGF-I y del R-IGF-I en el cerebro ocurre en paralelo al del R-GH (Garofalo y Rosen, 1989; Bondy et al., 1990). Este patrón ontogénico de expresión del R-GH es específico del SNC y diferente al observado en el hígado, corazón y riñón, donde la expresión es muy baja al nacimiento y se incrementa durante las 5 semanas de vida postnatal (Mathews et al., 1989). La insulina, los estrógenos y en ciertas circunstancias, la propia GH, regulan la expresión del R-GH en el cerebro (Kelly et al., 1991; Hull y Harvey, 1998; Le Grevès et al., 2002; Donahue et al., 2006).

La amplia expresión del R-GH en el cerebro sugiere su implicación en la regulación de múltiples funciones cerebrales. Así, el R-GH presente en las neuronas hipotalámicas productoras de GHRH y de SS participa en la autorregulación de la secreción de GH (Andersson et al., 1983; Lobie et al., 1993; Mayo et al., 1995), mientras que el R-GH del epitelio del plexo coroideo podría mediar el transporte de GH a través de la BHE (Lai et al., 1991; Coculescu, 1999). Las funciones que el R-GH puede ejercer en otras áreas cerebrales como el hipocampo, la amígdala y el putamen aún son poco conocidas. Dado que el hipocampo es el área cerebral asociada con la memoria y el aprendizaje (Burgess et al., 2002) y que la terapia sustitutiva con GH mejora estas funciones (Björk et al., 1989; Bengtsson et al., 1993; Rosenfeld y Bengtsson, 1994; Burman et al., 1995; Deijen et al., 1998; Gibney et al., 1999), se ha sugerido que el R-GH en el hipocampo media los efectos de la GH en las funciones cognitivas y en la memoria. A favor de esta hipótesis están las observaciones de pacientes con alteraciones

del R-GH que presentan deficiencias intelectuales, de aprendizaje y de memoria (Hull y Harvey, 1998).

2.2.- Mecanismo de acción de GH: vías de señalización intracelular

La interacción de GH con el R-GH promueve la dimerización del receptor (de Vos et al., 1992) y la asociación de la proteína tirosina quinasa citoplasmática JAK2 (Argetsinger et al., 1993; Argetsinger y Carter-Su, 1996; Carter-Su et al., 1996). La unión de JAK2 al receptor activa su actividad tirosina quinasa, autofosforilándose y fosforilando residuos de tirosina del dominio intracelular del R-GH (Argetsinger et al., 1993; Campbell et al., 1993). La formación del complejo GH-RGH-JAK2 y su fosforilación conduce, mediante fosforilaciones posteriores de diversos sustratos, a la activación de múltiples cascadas de señalización que culmina con la respuesta fisiológica a GH. Entre las vías de señalización implicadas en las acciones de GH se encuentran, entre otras, los factores latentes de transcripción citoplasmáticos STATs, la vía de las MAP quinasas (MAPK) y la vía de la PI3 quinasa (PI3K).

Las *STATs* constituyen una vía de señalización relativamente directa entre el R-GH y el núcleo. Tras su fosforilación por JAK2 (Carter-Su y Smit, 1998), las *STATs* se dimerizan y translocan al núcleo donde activan la transcripción génica uniéndose a secuencias específicas del ADN denominadas GAS situadas en la región promotora de los genes diana (Ihle, 1996; Leonard y O'Shea, 1998). Aunque la GH activa las *STATs* 1, 3, 5a y 5b (Gronowski y Rotwein, 1994; Campbell et al., 1995; Gouilleux et al., 1995; Gronowski et al., 1995; Wang y Wood, 1995), *STAT5b* es el principal mediador biológico de la señalización de GH en sus acciones sobre el crecimiento y en la expresión del IGF-I (Udy et al., 1997; Teglund et al., 1998).

Una segunda vía de señalización importante en la regulación de la transcripción génica por GH es la vía *Ras-MAPK* (proteínas quinasas activadas por mitógenos). La GH activa esta vía de señalización mediante la fosforilación de la proteína SHC (Smit, 1999), y consiguiente asociación de Grb2 (proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento) (Rozakis-Adcock et al., 1992) y del factor SOS (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). El complejo SHC-Grb2-SOS activa a la proteína asociada a la membrana Ras, que activa a la serina/treonina quinasa Raf (Crews y Erikson, 1993), que a su vez fosforila y activa a las serina/treonina quinasas MEK (MAPK/ERK quinasa) (Kyriakis et al., 1992; Crews y Erikson, 1993), que finalmente, fosforilan y activan a las proteínas MAPK ERK1 y ERK2 (Möller et al., 1992; Vanderkuur et al., 1997).

Entre los sustratos de las ERKs regulados por GH se incluye la familia de proteínas quinasas ribosomales S6 o Rsk (Rsk 1, 2 y 3) (Seger y Krebs, 1995), que una vez fosforiladas se translocan al núcleo donde participan en la activación de factores de transcripción, como CREB (proteína de unión a CRE) (Xing et al., 1996, 1998), el coactivador CBP (proteína de unión a CREB) (Nakajima et al., 1996), o el SRF (factor de respuesta al suero) (Rivera et al., 1993). Además, ERK1 y ERK2 fosforilados pueden translocarse al núcleo (Chen et al., 1992) fosforilando y regulando directamente la actividad de diversos factores de transcripción nucleares, como Fos (Chen et al., 1993, 1996), Jun (Hibi et al., 1993), Myc (Chang y Karin, 2001) o Elk-1 (Gille et al., 1995), que en presencia del SRF induce la transcripción a través del elemento de respuesta al suero (SRE), presente en numerosos genes de expresión temprana.

La GH también puede actuar a través de la vía de señalización de la *PI3 quinasa* mediante la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina 1, 2 y 3 (IRS-1, -2 y -3) (Souza et al., 1994; Argetsinger et al., 1996; Carter-Su et al., 1996; Yamauchi et al., 1998). La fosforilación de las proteínas IRS por JAK2 proporciona sitios de unión para el dominio SH2 de la subunidad reguladora de 85 kDa de la enzima fosfatidilinositol (PI) 3'-quinasa (Smit, 1999), activando a su vez al dominio catalítico de la PI3K (Myers et al., 1992; Kooijman et al., 1995). La activación de la PI3K conlleva, a su vez, un aumento de los mensajeros secundarios fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PIP2) y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (Shepherd et al., 1998). El PIP3 se une a la proteína quinasa Akt, que se transloca a la membrana plasmática donde es fosforilada por proteínas quinasas dependientes de fosfoinosítidos (PDK) (Alessi et al., 1997; Stokoe et al., 1997). La fosforilación de Akt incrementa su actividad quinasa lo que conduce a la fosforilación de diversos sustratos implicados en distintos procesos celulares.

La relevancia fisiológica de la activación por GH de las vías de señalización de la MAPK y de la PI3K es menos clara que la de STAT5b. El hecho de que la activación de la vía de la MAPK haya sido implicada en la supervivencia celular (Borasio et al., 1989) y en el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Coolican et al., 1997) sugiere que las acciones neurotróficas de GH podrían estar mediadas por esta vía. En cuanto a la vía PI3K, se ha sugerido que esta vía de señalización media fundamentalmente los efectos de GH sobre el metabolismo (Yamauchi et al., 1998; Herrington y Carter-Su, 2001), sin embargo, existen evidencias que indican que esta vía también podría estar implicada en las acciones proliferativas (Liang et al., 2000) y antiapoptóticas de GH (Costoya et al., 1999; Jeay et al., 2001; Mertani et al., 2001).

2.3.- Expresión de GH en el cerebro

En los últimos años se ha evidenciado la presencia de GH (proteína y ARNm) en diversas áreas del sistema nervioso tanto en roedores como en humanos (Hojvat, Baker et al., 1982a; Gossard et al., 1987). En ratas, la GH se expresa fundamentalmente en la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo caudado, el tálamo y el hipotálamo (Yoshizato et al., 1998; Sun et al., 2005; Donahue et al., 2006; Devesa et al., 2011).

El patrón ontogénico de expresión de GH cerebral es específico de este tejido y diferente al de la hipófisis. La expresión de GH cerebral alcanza su máximo prenatalmente y disminuye durante las 2 primeras semanas postnatales, mientras que la GH hipofisaria aumenta postnatalmente alcanzando concentraciones máximas en la rata adulta (Hojvat, Emanuele, et al., 1982; Lobie et al., 1993).

Las diferencias en el patrón ontogénico sugieren, a su vez, diferencias en la síntesis y liberación de GH entre el cerebro y la hipófisis. De hecho, mientras que la liberación de GH por la hipófisis no es autónoma, la GH se libera de forma continua por células cerebrales en cultivo (Pacold et al., 1978; Hojvat, Baker, et al., 1982). Sin embargo, al igual que la GH hipofisaria, la liberación de GH por células de la amígdala, hipocampo e hipotálamo es suprimida por SS (Pacold et al., 1978; Hojvat, Baker, et al., 1982). La GH cerebral parece estar regulada por la GH hipofisaria, como se deduce del hecho de que la hipofisectomía aumenta los niveles de la GH en la amígdala, el hipotálamo y el tálamo, aunque los disminuye en el núcleo caudado, el hipocampo y la corteza cerebral (Hojvat et al., 1986).

2.4.- Papel fisiológico de GH en el sistema nervioso central

Más allá de sus conocidas acciones en el crecimiento corporal y el metabolismo, la GH ejerce importantes acciones en la regulación de la proliferación y supervivencia celular en diversos órganos, incluido el SNC (Costoya et al., 1999; Sanders y Harvey, 2004; McLenachan et al., 2009; Aberg, 2010).

Acciones neurotróficas durante el desarrollo embrionario

La presencia de GH y de su receptor durante el desarrollo del SNC sugiere que esta hormona juega un papel relevante en la neurogénesis y en la gliogénesis. La primera evidencia de las acciones neurotróficas de GH en el cerebro procede del estudio de Diamond (1968), en el que se observó que el tratamiento con GH aumentaba el grosor de las estructuras diencefálicas (comisura anterior y posterior) durante el desarrollo postnatal del cerebro. Diversos estudios han demostrado las acciones de GH sobre los diferentes tipos de células neurales del cerebro embrionario.

Modelos animales de deficiencia de GH han evidenciado la importancia de la GH en el proceso de **mielinogénesis**. Los ratones microcefálicos Little, además de presentar alteraciones en el tamaño neuronal y en la arborización dendrítica, exhiben cerebros hipomielinizados (Noguchi et al., 1988). Estudios posteriores en este modelo de ratón, sugieren la participación de GH en la proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos durante el desarrollo cerebral (Morisawa et al., 1989). De manera similar, en ratas, se ha demostrado que el tratamiento con antisuero de GH disminuye la proliferación de progenitores oligodendrogiales con el consiguiente fallo en la mielinización del cerebro de ratas durante el desarrollo (Pelton et al., 1977).

En cuanto a las acciones de GH en neuronas, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la capacidad de GH de estimular la **neurogénesis** promoviendo la proliferación, diferenciación y maduración de las neuronas durante el desarrollo cerebral (Zamenhof et al., 1966; Noguchi et al., 1988; Ajo et al., 2003). En este sentido, Turnley et al. (2002) demostraron en ratas (E14) la expresión de GH principalmente en áreas de neurogénesis de la corteza cerebral. La GH estimula también el proceso de **gliogénesis** induciendo la proliferación y diferenciación de astrocitos en células cerebrocorticales procedentes de embriones de rata.

El hecho de que ciertos efectos neurotróficos de GH desaparezcan cuando se bloquea IGF-I, sugiere que están mediados por IGF-I (Ajo et al., 2003). La sobreexpresión de GH aumenta el peso del cerebro y la expresión de la proteína GFAP, sugiriendo un efecto estimulante en la astrogliá (Miller et al., 1995).

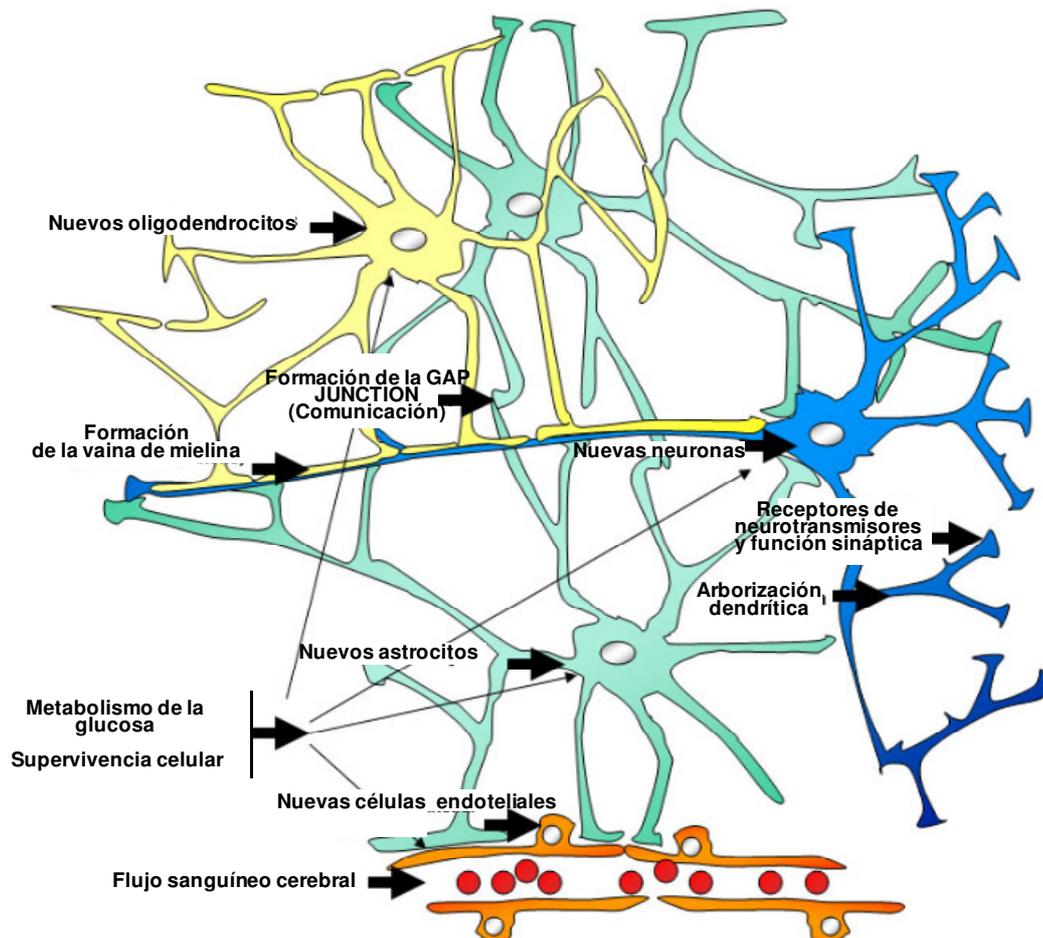


Figura 2: Visión esquemática de las acciones de GH e IGF-I en los distintos tipos celulares del cerebro. Amarillo: oligodendrocitos; azul: neuronas; verde: astrocitos; rojo: eritrocitos; naranja: arteriolas. Las flechas indican las dianas celulares sobre las que GH e IGF-I actúan.

Acciones neuroprotectoras

La GH no sólo está implicada en la maduración y crecimiento cerebral, sino que actúa como factor neuroprotector frente a diversos daños neuronales (Gustafson et al., 1999; Scheepens et al., 2000, 2001).

En ratas neonatales y jóvenes, la administración subcutánea de altas dosis de GH ha demostrado ejercer importantes acciones neuroprotectoras (Gustafson et al., 1999; Scheepens et al., 2001) y antiapoptóticas (Shin et al., 2004).

En modelos de ratas jóvenes con isquemia hipóxica se produce, a las pocas horas de la lesión, un aumento de la expresión del R-GH en astrocitos reactivos (Scheepens et al., 1999) y en la zona subventricular, rica en progenitores neurales, junto con un incremento de marcadores celulares de neurogénesis (Christophidis et al., 2009). Además, se ha observado un aumento de la inmunoreactividad a GH en las neuronas lesionadas, en los axones mielinizados y en las células gliales presentes en la zona lesionada y en los alrededores de la misma. A las 24 horas de la lesión, la presencia de GH es evidente en el plexo coroideo y en

las células endodimales próximas a los ventrículos (zonas de progenitores neurales) alcanzando su máxima expresión a los 3-5 días y desapareciendo a los 7 días.

Scheepens et al. (2001) observaron en ratas con lesiones cerebrales hipóxicas una pronunciada expresión de GH en áreas con una significativa pérdida celular. La administración i.c.v. de GH redujo la pérdida de neuronas en la corteza cerebral, hipocampo e hipotálamo. Este patrón de neuroprotección coincide con la distribución anatómica del R-GH en el cerebro de la rata, apoyando la hipótesis de que estos efectos neuroprotectores están mediados directamente por GH y no por IGF-I. Sin embargo, considerando las acciones neuroprotectoras del IGF-I no se puede descartar que el aumento de IGF-I observado tras una lesión cerebral (Gluckman et al., 1992; Gustafson et al., 1999; Scheepens et al., 2000) esté actuando como mediador de los efectos de la GH (Beilharz et al., 1998).

Aunque muchos de los efectos neuroprotectores del IGF-I están relacionados con mecanismos antiapoptóticos (Russell et al., 1998; Takadera et al., 1999; Van Golen y Feldman, 2000; Guan et al., 2003; Brywe, Mallard, et al., 2005), últimamente se ha postulado que las acciones neuroprotectoras tanto de GH como del IGF-I se deben fundamentalmente a su capacidad de estimular la génesis celular en el cerebro adulto (Aberg et al., 2006, 2009). En este sentido, se ha observado que en el hipocampo el IGF-I aumenta el reclutamiento de oligodendrocitos y la aparición *de novo* de células endoteliales. Este efecto podría explicar el aumento de la vascularización cerebral observado tras el tratamiento con GH (Aberg et al., 2006).

2.5.- Sistema GH/IGF-I y envejecimiento

Hace más de 30 años se puso de manifiesto que los ancianos sufrían una pérdida de la capacidad de secretar GH en respuesta a estímulos como la hipoglucemia insulínica o la administración de arginina (Laron et al., 1970). Hoy en día está ampliamente aceptado que durante el envejecimiento se produce una disminución de la secreción de GH en humanos (Iranmanesh et al., 1991; Corpas et al., 1993; Giustina y Veldhuis, 1998), primates (Kaler et al., 1986; Woller et al., 2002) y roedores (Sonntag et al., 1980; Takahashi et al., 1987). Este declinar de la secreción de GH se debe fundamentalmente a una disminución de la amplitud de los pulsos de secreción, sin que se produzcan cambios significativos en la frecuencia de los mismos (Sonntag et al., 1980, 1986; Takahashi et al., 1987; Russell-Aulet et al., 2001). Además, en el envejecimiento se produce una alteración del ritmo circadiano de secreción, caracterizado por una disminución de la secreción nocturna de GH y por la pérdida de un ritmo definido de secreción día-noche (Carlson et al., 1972; Finkelstein et al., 1972; Ho et al., 1987; Cummings y Merriam, 1999).

La disminución de la secreción de GH se acompaña de una disminución de los niveles circulantes de IGF-I (Florini et al., 1981; Johanson y Blizzard, 1981; Rudman et al., 1981; Corpas et al., 1993). Estas alteraciones en el sistema GH/IGF-I serían responsables de la pérdida de masa muscular, aumento de la grasa corporal y deterioro de distintos tejidos y funciones fisiológicas que ocurren en el envejecimiento (Rudman, 1985; Corpas et al., 1993).

A nivel hipofisario se ha descrito una disminución del contenido de GH (Dickerman et al., 1972; Sonntag et al., 1980; Forman et al., 1985; Deslauriers et al., 1991; López-Fernández

et al., 1996; Velasco et al., 1998; Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007) en ratas y humanos. También se ha descrito una menor expresión del gen de la GH en hembras y machos (Martinoli et al., 1991; Velasco et al., 1998), estableciéndose una situación de déficit hipofisario de GH en el envejecimiento. Los mecanismos neuroendocrinos de la somatopausia no están bien establecidos. Entre las posibles causas, solas o combinadas, se han incluido la reducción de la secreción o acción de GHRH, el aumento de la secreción o acción de SS y la reducción del número de células somatotropas. Estudios recientes favorecen la hipótesis de que el declinar del sistema GH/IGF-I con la edad no se debe a una alteración constitutiva primaria de las células somatotropas, sino más bien a cambios en los reguladores hipotalámicos de GH. La disminución de la expresión de GHRH y de sus receptores en la hipófisis parece ser la causa principal de la disminución de la GH con la edad (Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007).

2.6.- Sistema GH/IGF-I y envejecimiento cerebral

Además de las alteraciones en los niveles periféricos de GH e IGF-I, el envejecimiento también afecta a los componentes del sistema GH/IGF-I en el cerebro.

El efecto del envejecimiento en la expresión de GH cerebral no está suficientemente documentado. Sin embargo, la menor concentración de GH en el LCR de ancianos (Johansson, Larson, et al., 1995) y la disminución de la expresión del R-GH (Lai et al., 1993; Zhai et al., 1994; Nyberg y Burman, 1996; Nyberg, 1997) sugieren que durante el envejecimiento hay una menor disponibilidad de GH en el cerebro.

Numerosos estudios han demostrado en humanos y en ratas que el envejecimiento afecta a la unión de GH a su receptor, lo que podría reflejar una disminución en el número del R-GH (Lai et al., 1993; Zhai et al., 1994; Nyberg y Burman, 1996). En cerebro humano, se ha observado una correlación negativa entre la densidad de sitios de unión de GH y la edad en diversas áreas del cerebro como el plexo coroideo, hipocampo, hipotálamo, hipófisis y caudoputamen (Lai et al., 1993). La disminución más pronunciada se evidencia a partir de los 60 años (Lai et al., 1993). En ratas también se ha demostrado una disminución progresiva del R-GH en el cerebro a partir de la semana 12 de vida postnatal (Zhai et al., 1994).

Los mecanismos moleculares responsables de la disminución del R-GH en el cerebro aún son desconocidos. Estudios previos sobre la disminución de la densidad de receptores de dopamina en el envejecimiento sugieren que esta disminución puede deberse a una pérdida neuronal (Roth et al., 1984) así como a una menor tasa de biosíntesis del receptor a nivel de la expresión génica (Mesco et al., 1991). Lai et al., observaron, en estudios no publicados, que con la edad se produce una disminución en la expresión del ARNm del R-GH en el plexo coroideo humano. Dada la implicación de GH y de sus receptores en los procesos de aprendizaje y memoria, la regulación negativa del R-GH con la edad podría estar relacionada con las alteraciones funcionales del SNC en el envejecimiento.

Los estudios sobre la expresión de la proteína y del ARNm de IGF-I en el cerebro viejo son discordantes. Sonntag et al. (1999) observaron que, aunque la expresión del ARNm de IGF-I no cambiaba en la corteza cerebral a lo largo de la vida, se producía una disminución de la expresión de su proteína y de su capacidad de unión a su receptor en la corteza cerebral y en el hipocampo. Posteriormente, Lai et al. (2000) encontraron una disminución en la expresión

del ARNm de IGF-I en el hipocampo de las ratas viejas, pero no en otras regiones cerebrales. Por su parte, Pañeda et al. (2003) observaron que la disminución de los niveles del ARNm de IGF-I en el cerebelo de ratas viejas estaba asociada con un aumento de la muerte celular y con la activación de las enzimas pro-apoptóticas caspasa-3 y -9.

La información disponible sobre el efecto del envejecimiento en la expresión del R-IGF-I en el cerebro es contradictoria. En ratas, Chung et al. (2002) han descrito un aumento del número de receptores en las células piramidales de las capas corticales II-III y V-VI además de en el área CA3 del hipocampo. Otros investigadores han demostrado una disminución en el número de receptores en el hipocampo (Sonntag et al., 1999) y en la corteza cerebral (D'Costa et al., 1993). En humanos, el número de R-IGF-I parece no disminuir con la edad (De Keyser et al., 1994).

Dadas las importantes acciones del sistema GH/IGF-I en la neuroprotección y en el mantenimiento de la vasculatura cerebral, su alteración durante el envejecimiento podría afectar al funcionamiento cerebral y contribuir a su deterioro (Sonntag et al., 1997; Finch, 2002; Erickson y Barnes, 2003; Gallagher et al., 2003; Rosenzweig y Barnes, 2003).

2.7.- Sistema GH/IGF-I y alteraciones cognitivas en el envejecimiento

Se ha sugerido que la disminución de la actividad del eje GH/IGF-I está implicada en las alteraciones de la función cognitiva que acompañan al envejecimiento. Numerosos trabajos han abordado la posible relación entre los niveles séricos de IGF-I y la función cognitiva.

En ancianos, diversos estudios han establecido una relación entre las bajas concentraciones del IGF-I circulante y alteraciones cognitivas como la velocidad mental de procesamiento de información (Aleman et al., 1999; Dik et al., 2003), la memoria visual y verbal (Morley et al., 1997), la capacidad de resolución de problemas y bajas puntuaciones en el test MMSE (Rollero et al., 1998; Kalmijn et al., 2000). No obstante, en otros estudios no se ha observado ninguna asociación entre los niveles circulantes de IGF-I y la pérdida de capacidad cognitiva (Papadakis et al., 1995), ni entre los niveles de IGF-I y la capacidad de atención, inteligencia o memoria (Aleman et al., 1999, 2000). También se ha sugerido una relación entre los bajos niveles de IGF-I y el desarrollo de demencia (Murialdo et al., 2001). Estudios realizados en centenarios han mostrado una mayor prevalencia de demencia entre aquellos individuos con niveles bajos de IGF-I (Arai et al., 2001). En ratas viejas, la administración de IGF-I i.c.v. revierte las alteraciones de la memoria de trabajo y de las referencias espaciales asociadas a la edad (Markowska et al., 1998).

Por otro lado, se cree que los bajos niveles de IGF-I en el envejecimiento pueden ser un factor relevante en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Connor et al., 1997; Connor y Dragunow, 1998). El IGF-I está implicado en la regulación cerebral de los niveles de β -amiloide, factor implicado en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Carro et al., 2002). En ratones mutantes con deficiencia de IGF-I se ha observado un aumento de la acumulación de β -amiloide a una edad más temprana. El tratamiento con IGF-I de los ratones mutantes aumenta los niveles séricos de IGF-I disminuyendo la acumulación de β -amiloide en el cerebro.

2.8.- Tratamiento con GH en el envejecimiento: acciones de GH en el cerebro viejo

La similitud entre muchos de los síntomas de la DGH en adultos y los que se observan en el envejecimiento, junto con los efectos positivos de la terapia sustitutiva con GH en pacientes con DGH, planteó la posibilidad de la utilización de la terapia sustitutiva con GH en el envejecimiento para aminorar o revertir los cambios asociados al mismo.

El interés en la GH como un tratamiento anti-envejecimiento surgió de las similitudes en la composición corporal entre ancianos e individuos adultos jóvenes con deficiencia severa de GH, donde se ha demostrado convincentemente que la terapia sustitutiva con GH revierte los cambios en la composición corporal (Jørgensen et al., 1989; Salomon et al., 1989; Fernholm et al., 2000). El éxito de estos resultados llevó a la realización de diversos estudios donde se administró GH a ancianos con bajos niveles de IGF-I. Rudman et al. (1990), pioneros en la utilización de GH en ancianos, observaron que en ancianos con bajos niveles de IGF-I tratados durante varios meses con GH, se producía un aumento de los niveles de IGF-I y de la masa muscular, una disminución de la grasa corporal y un aumento de la densidad ósea en las vértebras lumbares.

Trabajos posteriores muestran cierta controversia sobre los beneficios del tratamiento con GH en ancianos sanos. Mientras que en algunos estudios, relativamente cortos, se han observado mejorías en ciertos parámetros secundarios de la composición corporal, densidad mineral y balance de nitrógeno (Holloway et al., 1994; Butterfield et al., 1997; Lange et al., 2000; Taaffe et al., 2001; Christmas et al., 2002), en otros, de mayor duración con controles placebo, no se han confirmado cambios significativos en estos parámetros (Taaffe et al., 1994, 1996; Holloway et al., 1997).

A pesar de que la mayoría de los estudios se han enfocado en los efectos de GH en la composición corporal, algunos trabajos donde se ha abordado la posible relación entre la deficiencia de GH e IGF-I y el envejecimiento cerebral, han demostrado efectos beneficiosos del tratamiento con GH en el cerebro viejo. En humanos, se ha observado que la terapia con GH mejora la función cognitiva en ancianos (Hoffman et al., 1992; Papadakis et al., 1996; Aleman et al., 2000). La administración de GH a ratas viejas produce un efecto neuroprotector de las neuronas del hipocampo (Azcoitia et al., 2005), aumenta la densidad de receptores de glutamato en el hipocampo (Sonntag et al., 2000; Le Grevès et al., 2002), mejora la vascularización y el flujo sanguíneo cerebral (Sonntag et al., 1997; Arwert et al., 2005); la utilización de la glucosa (Lynch et al., 2001) y atenúa los cambios asociados al envejecimiento de la plasticidad a corto plazo (Ramsey et al., 2004). En ratas viejas también se ha demostrado que la GH mejora el aprendizaje (Ramsey et al., 2004) y la capacidad cognitiva en general (Le Grevès et al., 2002). Estos efectos podrían estar relacionados con el incremento de la expresión de IGF-I en el cerebro, como ha sido observado por nuestro grupo (López-Fernández et al., 1996) tras la administración de GH a ratas viejas.

3.- SECRETAGOGOS DE GH

Antes de la identificación de GHRH, Bowers et al. (1980) descubrieron un nuevo grupo de sustancias sintéticas con capacidad de liberar GH. Estos compuestos se desarrollaron a partir de la molécula de met-enkefalina e inicialmente estimulaban la liberación de GH *in vitro*. Modificaciones químicas posteriores llevaron al desarrollo de sustancias peptídicas y no peptídicas capaces de liberar GH *in vivo* e *in vitro* configurando lo que se conoce como secretagogos de GH (GHS) (Smith et al., 1997).

3.1.- Ghrelina

En 1999, Kojima et al. aislaron a partir de extractos de estómago de rata el ligando endógeno del receptor de secretagogos de GH (R-GHS), al que denominaron ghrelina. La ghrelina es un péptido de 28 aminoácidos con una esterificación con ácido n-octanoico en la serina en posición 3. El residuo n-octanoil es esencial para algunas de sus actividades biológicas, incluida la liberación de GH, tanto *in vivo* como *in vitro*. La ghrelina es similar en ratas y en humanos salvo en dos aminoácidos, indicando la elevada conservación de este péptido entre especies (Kojima et al., 1999). La ghrelina, además de promover la liberación de GH en animales y en humanos, induce la secreción de PRL, ACTH, cortisol y aldosterona (Kojima et al., 1999; Arvat et al., 2000, 2001; Takaya et al., 2000).

La principal forma de ghrelina circulante, la ghrelina no acilada, fue considerada una forma inactiva de la hormona, pero en la actualidad se ha descubierto su participación en acciones no endocrinas incluidos efectos cardiovasculares y funciones antiproliferativas (Date et al., 2000; Cassoni et al., 2001). Existe otra forma de ghrelina, la Des-Gln14-ghrelina, producida por procesamiento alternativo del gen de ghrelina y que carece de una glutamina. Esta isoforma parece tener las mismas acciones hormonales que la ghrelina (Kojima et al., 1999).

Aunque el lugar de mayor producción de la ghrelina son las células X/A de las glándulas oxínticas del estómago (Date et al., 2000; Cummings et al., 2002), se ha descrito la expresión de la ghrelina en numerosos órganos además del estómago. La ghrelina se expresa en el hipotálamo (Kojima et al., 1999; Korbonits et al., 2001; Lu et al., 2002; Cowley et al., 2003), hipófisis (Korbonits et al., 2001), riñón (Mori et al., 2000), corazón (Gnanapavan et al., 2002), páncreas (Wierup et al., 2002), sistema inmune (Hattori et al., 2001), testículo (Tena-Sempere et al., 2002), ovario (Gaytan et al., 2003), y placenta (Gualillo, Caminos, Blanco, et al., 2001) relacionándose su expresión con múltiples acciones en los tejidos en los que se expresa.

Un efecto ampliamente estudiado ha sido la capacidad de la ghrelina de liberar GH por las células somatotropas hipofisarias, actuando directamente sobre éstas, o sobre el hipotálamo (Bowers, 2001). Se ha comprobado que la ghrelina estimula la liberación de GH tanto *in vivo* como *in vitro*, en numerosas especies, incluyendo humanos (Kojima et al., 1999; Arvat et al., 2000; Takaya et al., 2000; Hataya et al., 2001) y roedores (Kojima et al., 1999; Seoane et al., 2000; Wren et al., 2000; Tolle et al., 2001; Tamura et al., 2002; Tannenbaum et al., 2003), con similar capacidad que otros secretagogos sintéticos tanto peptídicos como no peptídicos (Bowers, 2001). Estos hallazgos, junto con el hecho de que tanto la ghrelina como

su receptor se expresan en hipotálamo e hipófisis, sugieren un importante papel de la ghrelina en la regulación fisiológica de GH, interactuando de manera coordinada con los reguladores primarios hipotalámicos de la GH, GHRH y SS (Frohman et al., 1992).

La ghrelina es segregada principalmente por el estómago, existiendo niveles circulantes sistémicos considerables, postulándose la posibilidad de que una vez segregada por el estómago al torrente circulatorio llegue a la hipófisis para estimular la secreción de GH. Sin embargo, el hecho de que se exprese también en el núcleo arcuato, y por analogía con GHRH y SS, los cuales también son sintetizados periféricamente y están presentes en la circulación sistémica, inclina a pensar que sea la ghrelina hipotalámica la responsable del control de la secreción de la GH, mientras que la procedente de otras fuentes podría estar implicada en otros procesos biológicos.

3.2.- Regulación de GH por los secretagogos de GH

Aunque se sabe que la ghrelina actúa sobre las células somatotropas, directa e indirectamente modulando el GHRH hipotalámico, el mecanismo por el cual ejerce su acción sobre la liberación de GH no está completamente esclarecido. Se han localizado R-GHS en neuronas productoras de GHRH en el núcleo arcuato y ventromedial, donde estimulan su liberación (Wren et al., 2000; Tannenbaum et al., 2003). Los GHS tienen mayor actividad secretora de GH *in vivo* que *in vitro* (Frutos, Cacicedo, Fernández, et al., 2007). El hecho de que el tratamiento *in vivo* con GHS sea poco eficaz en ausencia de GHRH, en situaciones en las que existe desconexión hipotálamo-hipofisaria, o el hipotálamo está alterado (Popovic et al., 1995; Torsello et al., 1996; Müller et al., 1999; Tannenbaum y Bowers, 2001), hace pensar que la ghrelina circulante ejerce su acción principalmente a nivel hipotalámico. La ausencia de respuesta a GHS en situaciones en las que la liberación de GHRH está disminuida, también podría deberse a una disminución del R-GHS hipofisario, ya que GHRH estimula su expresión en hipófisis (Kineman et al., 1999).

Respecto a SS, se ha descrito que las neuronas somatostatinérgicas hipotalámicas son diana de ghrelina (Wood et al., 1991), pero el efecto de los GHS a ese nivel es contradictorio. Inicialmente se postuló un efecto inhibitor de los GHS sobre SS hipotalámica (Frohman et al., 1992), lo que se confirmó tanto *in vivo* como *in vitro* (Tolle et al., 2001). Otros autores han observado que el tratamiento con secretagogos no modifica la liberación de SS (Guillaume et al., 1994; Tannenbaum et al., 2003). Un aumento en la acumulación del ARNm de SS en el núcleo periventricular (Thompson et al., 2003), así como de los niveles plasmáticos de SS (Arosio et al., 2003) ha sido igualmente reportado.

El hecho de que la ghrelina se exprese en la hipófisis en células somatotropas, y de que su expresión esté regulada negativamente por GH (Caminos et al., 2003), sugiere un posible papel auto-paracrino de ghrelina a nivel hipofisario.

3.3.- Receptor de secretagogos de GH en el cerebro

En 1996, Howard et al. aislaron y clonaron el R-GHS, demostrando la capacidad de los GHS de unirse a este receptor y liberar GH. El R-GHS pertenece a la familia de receptores

acoplados a proteína $G\alpha_{11}$ y está compuesto por 7 dominios transmembrana. Existen dos subtipos de receptores, el R-GHS-1a, o receptor activo, y el R-GHS-1b, una isoforma menor, originada por procesamiento alternativo del gen del R-GHS, sin actividad biológica aparente (Howard et al., 1996; McKee et al., 1997; Smith et al., 1997). En la actualidad se especula sobre la existencia de otros subtipos de receptores.

El R-GHS se expresa en la hipófisis anterior y en diversas áreas del cerebro como el hipotálamo, el hipocampo y la sustancia nigra (Guan et al., 1997; Muccioli et al., 1998; Katayama et al., 2000). Su localización en estas áreas cerebrales sugiere que el R-GHS puede estar implicado en la regulación de los ritmos biológicos, el estado de ánimo, la memoria, el aprendizaje y el apetito (Smith et al., 1997). El R-GHS-1a se expresa en otros tejidos como el páncreas, corazón, glándula adrenal y tiroides. El R-GHS-1b presenta una amplia distribución en el organismo, pero su función es aún desconocida (Gnanapavan et al., 2002).

3.4.- Mecanismo de acción de los secretagogos de GH

Los GHS liberan la GH en las células somatotropas utilizando vías de señalización intracelular diferentes a las activadas por el GHRH (Cheng et al., 1991). Mientras que el GHRH estimula el AMPc intracelular y los mecanismos dependientes de la proteína quinasa A, los GHS activan la vía de la fosfolipasa C (PLC)/inositol fosfato (IP)/proteína quinasa C (PKC) (Frohman et al., 1992; Chen, 2000) aumentando las concentraciones de calcio intracelular (Bresson-Bépolain y Dufy-Barbe, 1994). Además, la activación del R-GHS en las células somatotropas bloquea los canales de K^+ con la consiguiente despolarización de la membrana plasmática y entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Pong et al., 1992, 1993; McGurk et al., 1993; Smith et al., 1997). El aumento resultante de Ca^{2+} intracelular induce la liberación de GH desde la célula somatotropa. Sin embargo, este mecanismo no explica el efecto de los GHS sobre la liberación de GH, ya que la SS bloquea totalmente la capacidad secretora de los GHS (Neill y Frawley, 1983), sin interferir en la movilización de Ca^{2+} intracelular.

Tanto ghrelina como los GHS sintéticos aumentan los niveles de AMPc en células hipofisarias de cerdo y oveja (Wu et al., 1996; Malagón et al., 2003), especies en las que se han descrito numerosas diferencias en la regulación de GH en las células somatotropas (Castaño et al., 1996). En ratas y en humanos no se ha podido demostrar una inducción directa de los niveles de AMPc intracelulares por GHS o ghrelina (Patchett et al., 1995; Smith et al., 1996), aunque ambos son capaces de potenciar el aumento de AMPc intracelular producido por GHRH, tanto en ratas (Cheng et al., 1989; Smith et al., 1996) como en humanos (Adams et al., 1996), por lo que se supone una interacción entre esta vía y la de AMPc/PKA activada por GHRH.

Además de la regulación de la secreción de GH, los GHS inducen la expresión del gen de GH en células somatotropas (Locatelli et al., 1994). En ratas neonatales se ha demostrado la inducción de Pit-1 por GHS y ghrelina, tras la activación de la vía de la PKC y AMPc/PKA, y la participación del elemento de respuesta CRE en el promotor de Pit-1 (García et al., 2001), no habiéndose podido reproducir este efecto en ratas adultas (Soto et al., 1995).

3.5.- Papel fisiológico de los secretagogos de GH en el sistema nervioso central

Acciones neurotróficas

Además de su papel en la regulación de la secreción de GH, los GHS y la ghrelina tienen importantes acciones neurotróficas y neuroprotectoras independientes de GH en diferentes tejidos y órganos, incluido el SNC.

Se ha demostrado que la ghrelina promueve la neurogénesis en el núcleo motor dorsal del nervio vago de ratas tanto *in vivo* como *in vitro* (Zhang et al., 2004). En el hipocampo de la rata adulta tanto la ghrelina como la hexarelina estimulan la incorporación de timidina H³ en progenitores celulares, indicando una acción proliferativa (Johansson et al., 2008). En ratas sometidas a radiación la administración s.c. de hexarelina estimula la proliferación celular en regiones neurogénicas del hipocampo (Barlind et al., 2010).

Además de sus acciones proliferativas, se han postulado acciones de la ghrelina en la plasticidad neuronal. El trabajo de Diano et al. (2006) demostró que la ghrelina circulante alcanza el hipocampo y se une a neuronas de la formación hipocampal, donde estimula la formación de dendritas y la plasticidad sináptica aumentando la densidad de espinas sinápticas. Esta remodelación de la sinapsis va acompañada de una mejora en la realización de numerosos test comportamentales que se sabe que son dependientes, al menos en parte, del hipocampo. En línea con estos datos, el cerebro de los ratones knockout de ghrelina presentan un menor número de espinas sinápticas y deficiencias cognitivas, que mejoran tras su administración (Diano et al., 2006).

Acciones neuroprotectoras

La ghrelina muestra efectos neuroprotectores frente a lesiones inducidas por una gran variedad de estrategias incluyendo isquemia/reperfusión (Chang et al., 2004; Konturek et al., 2006), alendronato (Işeri et al., 2005), privación de suero (Kim et al., 2004), doxorubicina (Baldanzi et al., 2002) y TNF- α (Kim et al., 2005). Además, los GHS ofrecen neuroprotección en enfermedades neurodegenerativas en las que están implicados procesos inflamatorios y de muerte neuronal. Existen evidencias sobre las acciones neuroprotectoras de los GHS en lesiones cerebrales debidas a excitotoxicidad (Delgado-Rubín de Céliz et al., 2006; Delgado-Rubín de Céliz et al., 2009; Xu et al., 2009; Lee, Lim, et al., 2010), en el Parkinson (Jiang et al., 2008; Andrews et al., 2009; Andrews, 2011), infarto cerebral por isquemia (Brywe, Leverin, et al., 2005; Chung et al., 2007, 2008; Miao et al., 2007; Hwang et al., 2009) y epilepsia (Obay et al., 2007, 2008; Xu et al., 2009).

Los mecanismos por los que la ghrelina o los GHS actúan como neuroprotectores no están completamente esclarecidos. Una posibilidad es que los GHS ejerzan sus acciones neuroprotectoras por mecanismos antiapoptóticos. Se han descrito importantes acciones antiapoptóticas de los GHS en diversos tipos celulares como adipocitos (Kim et al., 2004) osteoblastos (Kim et al., 2005), cardiomiocitos y células endoteliales (Baldanzi et al., 2002). En el cerebro, se ha demostrado que la ghrelina, incluso a bajas dosis, protege a las neuronas hipotalámicas de la muerte celular inhibiendo la apoptosis (Chung et al., 2007). En este sentido, tanto la ghrelina como la des-acil-ghrelina son capaces de alterar la expresión de las proteínas

de la familia Bcl-2, inhibir la liberación del citocromo c y la actividad de la caspasa 3 y promover la supervivencia de las neuronas corticales (Chung et al., 2008).

Algunos de los efectos neuroprotectores de ghrelina están mediados por el R-GHS1a y la posterior activación de las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt (Datta et al., 1999; Pearson et al., 2001; Chung et al., 2007, 2008). Tanto la ghrelina como la des-acil-ghrelina son capaces de proteger a las neuronas corticales de la apoptosis inducida por un insulto mediante la activación de las vías de señalización de las MAPK y PI3K/Akt (Chung et al., 2008). Se ha postulado un efecto neuroprotector de la ghrelina de las neuronas hipocampales frente a ataques epilépticos inducidos por pilocarpina (Xu et al., 2009) mediante la activación de la vía de señalización PI3K/Akt e inhibición de la apoptosis mitocondrial. Otros estudios han demostrado la implicación de las vías de señalización de la PKA y PKC en las acciones neuroprotectoras de la ghrelina (Chung et al., 2007).

La acción antiapoptótica de ghrelina y de los GHS puede estar mediada por la inducción local de IGF-I. En este sentido se ha demostrado que el tratamiento de ratas adultas con GHRP-6 aumenta la expresión del ARNm de IGF-I en el hipotálamo, cerebelo e hipocampo (Frago et al., 2002; 2005). Este aumento se acompaña de la fosforilación de Akt y Bad y de un incremento de la proteína antiapoptótica Bcl-2. GHRP-6 reduce la muerte celular en el cerebelo de ratas viejas y este fenómeno parece estar mediado por la estimulación local de IGF-I, que a su vez inhibe la activación de las caspasas 9 y 3 (Pañeda et al., 2003).

3.6.- Secretagogos de GH y envejecimiento

No existe consenso en el comportamiento de ghrelina y del R-GHS en el envejecimiento. Mientras que unos estudios han descrito un descenso de las concentraciones plasmáticas de ghrelina en ancianos (Rigamonti et al., 2002), ratas (Gualillo et al., 2001) y ratones (Liu et al., 2002), en otros se ha observado un aumento de la producción y secreción de ghrelina en el estómago (Englander et al., 2004) y en la circulación periférica (Kappeler et al., 2004; Sun et al., 2007). En humanos, Sturm et al. (2003) no encontraron cambios en los niveles de ghrelina entre mujeres jóvenes y ancianas. En la actualidad no existen datos sobre el contenido o expresión de ghrelina en el hipotálamo relacionados con el envejecimiento.

Los estudios *in vivo* de respuesta de GH hipofisaria a ghrelina u otros secretagogos evidencian una disminución de la respuesta de GH en animales y humanos envejecidos (Rudman, 1985; Arvat et al., 1997; Broglio et al., 2003), que puede estar relacionado con la menor reserva de GH hipofisaria (Muccioli et al., 2002). En estudios *in vitro* realizados en nuestro grupo observamos una respuesta proporcional al contenido hipofisario de GH (Frutos, Cacicedo, Fernández, et al., 2007).

Esta disminución de la secreción de GH espontánea y estimulada puede reflejar cambios en el control neuroendocrino del funcionamiento de los somatotropos. En este sentido, la pérdida de actividad del GHRH en el envejecimiento, la disminución de su expresión y la de sus receptores hipofisarios, explicaría parcialmente la reducida respuesta a ghrelina y a otros GHS (Giustina y Veldhuis, 1998), ya que la actividad liberadora de ghrelina y de los GHS

depende de la integridad funcional del eje hipotálamo-hipofisario (Smith et al., 1997; Frutos, Cacicedo, Méndez, et al., 2007), como hemos mencionado anteriormente.

Por otro lado, la disfunción somatotropa observada en el envejecimiento podría reflejar alteraciones en la expresión y/o funcionalidad del R-GHS. Una disminución de la expresión del R-GHS se ha descrito en el hipotálamo de ancianos (Muccioli et al, 2002) y en la hipófisis de ratones hembras (Yan et al., 2004). Por lo tanto, la disminución de la concentración de ghrelina junto con bajos niveles del R-GHS podría contribuir al declinar de la secreción de GH durante el envejecimiento.

3.7.- Tratamiento con ghrelina y secretagogos de GH en el envejecimiento

Dado que la hipófisis mantiene la respuesta a los secretagogos de GH, incluido el GHRH (Corpas et al., 1992; 1993) y los GHS (Chapman, Bach, et al., 1996; Chapman, Hartman, et al., 1996), estos factores se han considerado como potenciales agentes terapéuticos para estimular la secreción endógena de GH durante el envejecimiento como alternativa a la administración de GH. El tratamiento prolongado con GHS por distintas vías de administración produce un aumento de la secreción de GH en adultos jóvenes y viejos (Aloi et al., 1994; Chapman, Bach, et al., 1996; Chapman, Hartman, et al., 1996; Copinschi et al., 1996; Ghigo et al., 1996; Rahim y Shalet, 1998; Merriam et al., 2003; Nass et al., 2008; White et al., 2009). Resultados similares se han obtenido en perros (Cella et al., 1996) y en ratas viejas (Walker et al., 1991; Cattaneo et al., 1997; Settembrini et al., 1998).

El efecto de la administración de los GHS en los niveles de IGF-I en el envejecimiento no está bien definido. Algunos estudios han encontrado que el aumento de la secreción de GH va acompañado de un aumento de los niveles de IGF-I circulante (López-Fernández et al., 1996; Velasco et al., 2001; Frutos, Cacicedo, Fernández et al., 2007), mientras que otros autores no han observado ningún cambio (Cattaneo et al., 1997; Settembrini et al., 1998).

Se ha propuesto el tratamiento combinado de GHRH y GHS dado que se obtiene una mayor y mejor respuesta de GH en ratas viejas. Una posible interpretación de estos resultados sería que en el envejecimiento además de la disminución de la secreción de GHRH (DeGennaro Colonna et al., 1989; Ge et al., 1989), ocurriría, de forma hipotética, un fallo en el ligando endógeno de GHS (ghrelina) que determinaría la menor sensibilidad de los animales viejos al tratamiento por separado de GHRH y GHS. En este sentido, estudios en humanos han demostrado que la administración conjunta de GHRH junto con diversos GHS promueve una mayor liberación de GH, sugiriendo que la capacidad secretora de GH en respuesta a ambos estímulos no se encuentra disminuida con la edad (Bowers et al., 1991; Micic et al., 1998). Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento crónico con GHRH mejora la capacidad cognitiva tanto de ancianos sanos como de ancianos con deficiencias cognitivas (Baker et al., 2012).

4.- MIELINA

4.1.- Estructura de la vaina de mielina

La vaina de mielina es una envoltura de estructura laminar que rodea a algunos axones del sistema nervioso de los animales vertebrados. Está formada por varias capas de membrana plasmática, proporcionada por los oligodendrocitos (OD) en el SNC y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP). Para la formación de la vaina de mielina, estas células emiten prolongaciones que inicialmente contactan con el axón, posteriormente lo rodean y finalmente giran varias veces alrededor del mismo depositando sucesivas capas de membrana celular. Por último, estas capas se compactan formando una estructura laminar en torno al axón. Al microscopio electrónico la estructura de la mielina se caracteriza por la alternancia de líneas densas, formadas por yuxtaposición de las superficies citoplasmáticas de la membrana plasmática, y líneas interperiodo, formadas a partir de la superficie extracelular de la membrana. En el SNC un solo OD es capaz de envolver entre 10 y 40 axones mientras que en el SNP cada célula de Schwann rodea un único axón (McMorris et al., 1993).

A lo largo de la vaina de mielina, ésta se ve interrumpida, aproximadamente cada milímetro, en el punto de unión entre dos OD o células de Schwann consecutivas. Estos puntos, donde persiste una zona del axón desprovista de mielina, se denominan nódulos de Ranvier y están dotados de gran importancia funcional.

4.2.- Composición de la mielina

La mielina representa el 20-30% del peso seco del sistema nervioso (Norton y Poduslo, 1973). Aproximadamente el 70% de la membrana de mielina está formada por lípidos, de los cuales el más característico es el glicolípido galactocerebrósido (GC). El 30% restante está constituido fundamentalmente por proteínas. De éstas, un 50% corresponde a la proteína proteolipídica (PLP), un 30-35% a la proteína básica de mielina (MBP), un 5% a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (CNP) y un 1% a la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y otros enzimas (Norton, 1981).

La MBP es la proteína mejor caracterizada. En roedores existen cuatro isoformas (Barbarese et al., 1977; Carnegie y Dowse, 1984) de peso molecular (Pm) 21, 18,5, 17 y 14 kDa, siendo predominante la fracción de 18,5 kDa, aunque la proporción relativa de las mismas varía a lo largo del desarrollo (Barbarese et al., 1978). Todas ellas se caracterizan por tener un punto isoeléctrico muy alto, en torno a diez, como consecuencia de la elevada proporción de aminoácidos de carácter básico (aproximadamente uno de cada cuatro) en su estructura primaria.

La MBP se localiza inicialmente en el cuerpo y las prolongaciones de los OD; posteriormente, con el inicio de la mielinización se incorpora rápidamente a la membrana plasmática y desaparece del citoplasma (Sternberger et al., 1978; Hartman et al., 1979). La vaina de mielina se encuentra localizada en el lado citoplásmico de la membrana plasmática (Omlin et al., 1982; Kirsxhner et al., 1984). Aparte de su papel como proteína estructural, no se

conocen con exactitud otras funciones. Su posible participación en el mantenimiento de un adecuado grado de compactación de la mielina ha sido discutido (Martenson, 1980; Braun, 1984; Kirsxhner et al., 1984). Su capacidad para unirse a ciertas moléculas pequeñas (Muzyka y Moks, 1984; Vacher et al., 1984) sugiere que pueda tener funciones biológicas específicas, aunque hasta la fecha no se han descrito.

La síntesis de MBP durante el desarrollo parece estar regulada a nivel de la transcripción (Zeller et al., 1985), aunque también se ha sugerido la existencia de un control postranscripcional (Miskimins y Yu, 1986). El nivel de ARNm de MBP se correlaciona estrechamente con el desarrollo de la mielina en las distintas regiones del cerebro (Kristensson et al., 1986).

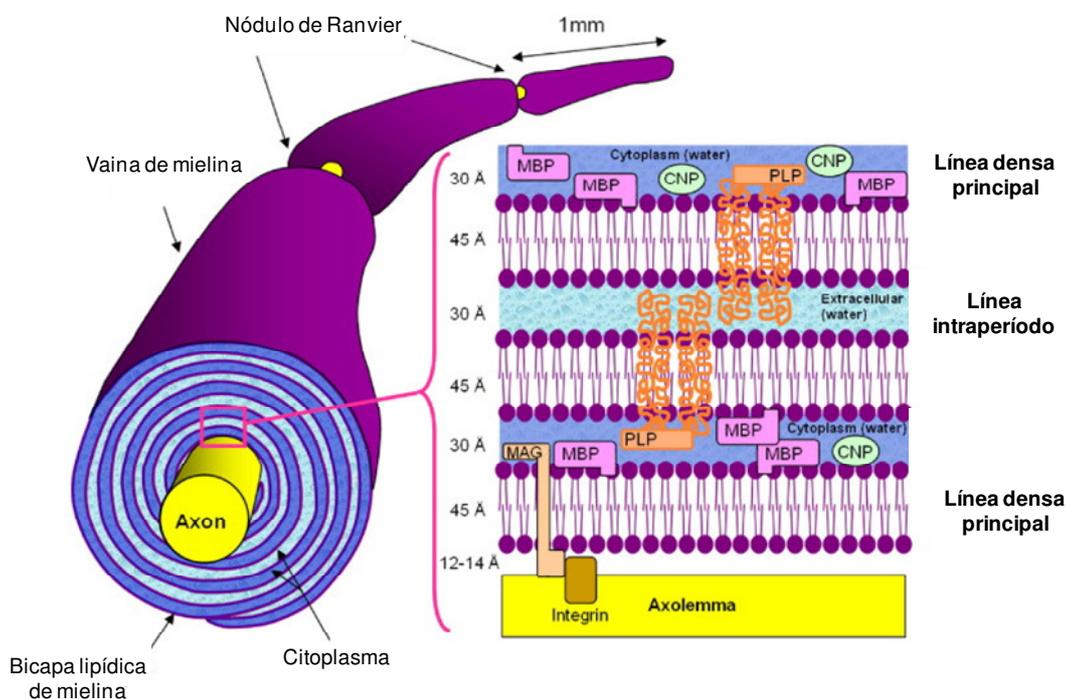


Figura 3: Estructura y composición de la vaina de la mielina. Representación esquemática de la estructura de la vaina de mielina y de la envoltura del axón por la vaina de mielina. MBP: proteína básica de mielina; CNP: fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos; PLP: proteína proteolípídica; MAG: glicoproteína asociada a la mielina.

4.3.- Función de la vaina de mielina

La producción y el mantenimiento de la mielina son esenciales para el funcionamiento normal del cerebro. La mielinización permite la conducción saltatoria de los potenciales de acción aumentando significativamente la velocidad de la transmisión de las señales nerviosas a lo largo del axón (Waxman, 1977). La alta velocidad hace posible la integración de la información a través de redes neuronales ampliamente distribuidas que sustentan las funciones cognitivas superiores (Gould et al., 1999; Mesulam, 2000; Bartzokis et al., 2003). Además de una comunicación más rápida a lo largo de largas distancias, una alta velocidad de conducción también facilita el flujo de información permitiendo una precisa codificación temporal de una

alta frecuencia de impulsos nerviosos procedentes de la actividad neuronal (Zhou et al., 1995). Otra de las funciones de la mielinización del axón es la reducción del gasto energético neuronal. La pérdida o disfunción de la mielina axonal requeriría un incremento estimado de hasta 500 veces en el gasto energético neuronal para mantener los niveles de neurotransmisión (Hildebrand et al., 1993). Otro importante papel de la vaina de mielina es mantener la integridad funcional y estructural del axón, habiéndose observado degeneración axonal en ratones con deficiencia de alguno de los componentes de la mielina (Griffiths et al., 1998; Yin et al., 1998).

4.4.- Oligodendrogénesis

La formación de la vaina de mielina implica una precisa secuencia de acontecimientos morfogénéticos de diferenciación de los oligodendrocitos. Cada etapa del proceso de diferenciación, desde la fase de precursor hasta la de OD maduro, puede ser identificada por cambios en la morfología celular (aumento progresivo del número de ramificaciones) y en la expresión de marcadores inmunocitoquímicos que definen distintos estadios de desarrollo (de Castro y Bribián, 2005), lo que se acompaña de un descenso paulatino de la capacidad proliferativa y migratoria (Almazán et al., 2001; Rowitch, 2004).

En el SNC de los mamíferos, tanto las neuronas como la glía proceden de un progenitor común multipotencial (Temple y Qian, 1996; McKay, 1997; Rao, 1999; Gage, 2000). Esta célula multipotencial da lugar a progenitores con potencial restringido para diferenciarse a neuronas (neuroblastos) o glía (glioblastos) (Davis y Temple, 1994; Mayer-Proschel et al., 1997; Mujtaba et al., 1999), que a su vez originarán respectivamente, neuronas y células gliales maduras. La génesis de neuroblastos y glioblastos a partir del progenitor multipotencial tiene lugar de forma secuencial: primero se generan neuroblastos y posteriormente, tras un cambio en el comportamiento de la célula multipotencial, comienzan a generarse glioblastos (Qian et al., 2000). Como consecuencia, durante el desarrollo embrionario, la neurogénesis precede a la gliogénesis de modo que la mayoría de las neuronas emergen en el período embrionario y la mayoría de la glía es generada después del nacimiento (Jacobson, 1991). Esta separación temporal de la producción de ambos tipos celulares permite que la población neuronal esté bien establecida antes de que se desarrolle el sistema glial, asegurando así que el número de células gliales generadas se ajuste a la población neuronal existente (Burne et al., 1996; Barres y Raff, 1999).

La primera célula identificada del linaje oligodendroglial, originada a partir de glioblastos indiferenciados, es el oligodendroblasto (Skoff et al., 1976). Esta célula se caracteriza por la presencia de vimentina y por la expresión en su superficie de un gangliósido reconocido por el anticuerpo A2B5 (Eisenbarth et al., 1979; Abney et al., 1983). Los oligodendroblastos expresan, además, el proteoglicano NG2 y el receptor de PDGF-alfa (Nishiyama et al., 1996). Son células de morfología bipolar que se dividen con rapidez, y poseen gran capacidad migratoria. Tienen carácter bipotencial dado que pueden originar, al menos *in vitro*, y según las condiciones ambientales en que se encuentren, dos tipos celulares distintos: oligodendrocitos y astrocitos tipo 2, motivo por el que estas células también se denominan O-2A (Raff et al., 1983). A medida que este progenitor madura, deja de expresar vimentina y comienza a expresar en su membrana el antígeno lipídico O4, que es el que define el siguiente estadio de desarrollo. Estas células, denominadas preoligodendrocitos (preOD), son vimentina (-), A2B5 (+) y O4 (+),

tienen forma multipolar, y se dividen más lentamente y tienen menor capacidad migratoria que los precursores O-2A. Los preOD se transforman en OD inmaduros con la aparición de la expresión de GC en su superficie, y finalmente emergen los OD maduros, que son células postmitóticas terminalmente diferenciadas (Arenander y De Vellis, 1994). Los OD maduros tienen forma estrellada y son los únicos con capacidad para sintetizar mielina. Se reconocen, además de por su morfología, por la expresión de diversos marcadores relacionados todos ellos con la mielina, tales como proteínas estructurales (MBP, PLP), o enzimas asociados a la mielina (MAG, CNP).

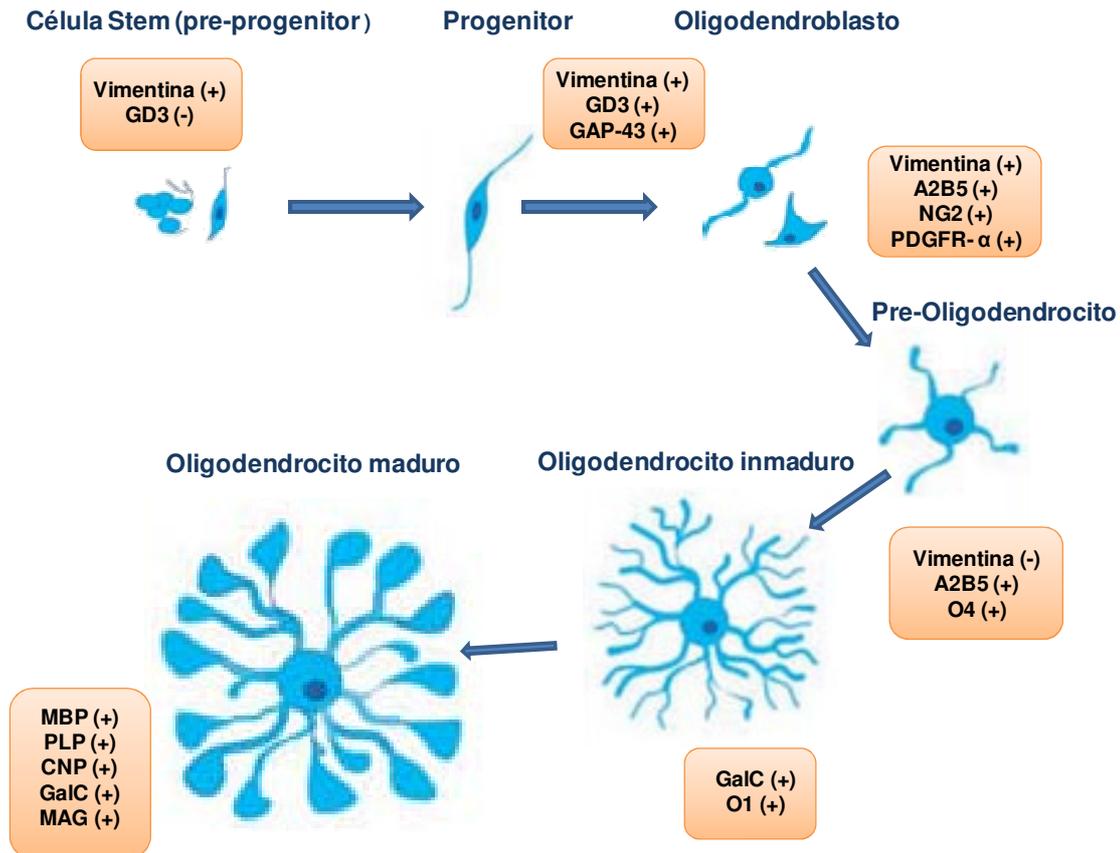


Figura 4: Representación esquemática del proceso de oligodendrogénesis. MBP: proteína básica de mielina; CNP: fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos; PLP: proteína proteolipídica; MAG: glicoproteína asociada a la mielina; GalC: galactocerebrósido.

4.5.- Mielinización del cerebro

Poco se sabe sobre el mecanismo o las señales que regulan el complejo proceso de la mielinización. La mielinización es un proceso fundamentalmente postnatal que se caracteriza por ser un proceso secuencial que incluye diversas etapas. Inicialmente se produce la migración de los oligodendrocitos a los axones que deben ser mielinizados y la discriminación entre los axones y las dendritas de las neuronas. Posteriormente se produce la adhesión de las prolongaciones de los oligodendrocitos a los axones. Por último, las prolongaciones de los oligodendrocitos se enrollan entorno al axón dando un número determinado de vueltas

formando la vaina de mielina y dejando un espacio sin mielinizar que constituirá el nódulo de Ranvier.

En la primera etapa los pre-OD se sitúan a lo largo de las fibras de los tractos de la futura sustancia blanca, manteniendo su capacidad de división (Reynolds y Wilkin, 1991). Posteriormente, estos preoligodendrocitos se convierten en OD inmaduros, caracterizados por la adquisición de marcadores específicos (descritos anteriormente) y preparados para la mielinización. La mielinización ocurre caudorostralmente en el cerebro y rostrocaudalmente en la médula espinal. La secuencia de las etapas de mielinización es un proceso totalmente reproducible para cada especie. En el ratón, la mielinización comienza en la médula espinal en el nacimiento. En el cerebro, la mielinización se completa en todas las regiones entre los 45-60 días postnatales. En humanos, el pico de la formación de la mielina ocurre durante el primer año postnatal, aunque comienza durante la segunda mitad de la vida fetal en la médula espinal y puede continuar hasta los 20 años de edad en algunas fibras corticales, especialmente en áreas asociativas (Yakovlev y Lecours, 1966).

La mielinización requiere una extraordinaria capacidad de los OD para sintetizar membrana plasmática en un momento determinado, específico de cada especie y región del SNC, afectando únicamente a ciertas fibras y haces nerviosos (Schwab y Schnell, 1989). Esto sugiere la existencia de mecanismos de señalización muy precisos que regulan el momento exacto de la diferenciación de los OD y de la mielinización.

4.6.- Papel de GH en la mielinogénesis en el periodo perinatal

Las primeras evidencias de la participación de GH en la mielinización del sistema nervioso fueron proporcionadas por el estudio de Pelton et al. (1974) en el que se observó que la deficiencia de GH en ratas producía una alteración de la migración y diferenciación oligodendroglial con el consecuente fallo de la mielinización. Estudios posteriores en ratas con deficiencia de GH inducida inmunológicamente en la primera semana de vida postnatal corroboraron la hipomielinización del cerebro y la acumulación de células gliales indiferenciadas en la zona subependimial (Pelton et al., 1977). En el estudio de Noguchi, Sugisaki, Watanabe, et al. (1982) ratas neonatales deficientes de GH por intoxicación con hidrocortisona presentaban cerebros más pequeños con una menor actividad de la enzima CNPasa, enzima estrechamente relacionada con la mielinogénesis. La administración de GH restauraba parcialmente las alteraciones de la mielinogénesis inducidas por la hidrocortisona.

En el ratón Snell se ha observado que el cuerpo caloso contiene un reducido número de fibras mielinizadas (Noguchi et al., 1983) y una baja actividad CNPasa junto con una disminución de la actividad locomotora espontánea (Noguchi, Sugisaki, Watanabe, et al., 1982). La administración diaria de GH y tiroxina (T4) durante los 40 días de vida postnatal restaura la actividad CNPasa al nivel de los controles normales, y normaliza el patrón de actividad locomotora espontánea, sugiriendo que la GH, junto con el efecto sinérgico de T4, está implicada en la pobre mielinización del cerebro de estos ratones.

En el ratón Little, los hallazgos son muy similares, observándose una disminución en el contenido cerebral de ADN, una disminución de la actividad CNPasa y un nivel reducido de actividad locomotora (Noguchi et al., 1985) alteraciones que se revierten tras el tratamiento con

GH (Noguchi et al., 1988). Aunque todos estos datos apoyan un papel de GH en el proceso de mielinización, en un estudio más reciente (Lehman et al., 1999), se observó que la mielina del cerebro del ratón Little es normal en estructura y cantidad, y es proporcional a la masa cerebral. En estos ratones tanto el grosor de la vaina de mielina como el tamaño y la densidad de los axones está preservado, por lo que la reducción del contenido total de mielina debe ser atribuida a un descenso en el número total de neuronas, sugiriendo que esta forma de deficiencia de GH no afecta al proceso de mielinización.

In vitro, la GH incrementa la actividad CNPasa y la acumulación de MBP en agregados de células cerebrocorticales de rata (Almazán et al., 1985), lo que refleja su capacidad para estimular el proceso de mielinización en determinadas condiciones.

El mecanismo por el que la GH induce sus efectos sobre la mielinización no está establecido. *In vivo*, al menos en el adulto, las alteraciones de los niveles de GH se acompañan de cambios paralelos en los niveles circulantes de IGF-I. Dado que éste es el más importante mediador de las acciones de GH y a su vez un potente inductor de la mielinización, una posibilidad es que la GH ejerza sus efectos sobre la mielinización a través de la inducción de IGF-I periférico y su ulterior transporte a través de la BHE. Sin embargo, la existencia de efectos de GH sobre el cerebro *in vitro* así como la presencia en este órgano tanto de GH como de sus receptores sugiere que los efectos puedan ser resultado, al menos parcialmente, de la acción de la GH. La procedencia de esta GH no se ha establecido definitivamente. Se ha demostrado que la GH es capaz de atravesar la BHE (Pan et al., 2005), por lo que la GH circulante de origen hipofisario podría ser la responsable de los efectos observados. No obstante, la evidencia de que GH se sintetiza en áreas cerebrales como la corteza basal, hipocampo y núcleo estriado (Gossard et al., 1987), hace probable una acción autocrina o paracrina de GH. En cualquier caso, los efectos de GH podrían ser directos o mediados por la inducción del IGF-I local. A este respecto, los datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que *in vitro* muchas de las acciones de GH en el cerebro están mediadas por IGF-I ya que se abolen o amelioran cuando éste es bloqueado con un anticuerpo específico (Ajo et al., 2003). La existencia de correlación en la distribución del receptor de GH con la distribución de IGF-I y su ARNm apoya esta idea (Shoba et al., 1999).

4.7.- Secretagogos de GH y mielina

Las evidencias disponibles, aunque escasas, sugieren que la ghrelina y los GHS pueden estar implicados en el proceso de mielinización.

Estudios recientes en rata demuestran que el tratamiento con ghrelina después de la inducción de una lesión medular inhibe la apoptosis de neuronas y oligodendrocitos, atenúa la pérdida de axones y de mielina y reduce el tamaño de la lesión, lo que resulta en una mejora de la reparación funcional (Lee, Chung, et al., 2010). Además, la ghrelina induce la expresión de BDNF y de IGF-I en el tejido lesionado. Tanto BDNF (Novikova et al., 1996; Koda et al., 2002) como IGF-I (Nakao et al., 2001; Koopmans et al., 2006; Hung et al., 2007) son factores que potencian la supervivencia neuronal y oligodendroglial y favorecen la recuperación funcional tras lesiones medulares, sugiriendo, que estos factores puedan estar implicados en las acciones neuroprotectoras de ghrelina en la zona lesionada. El tratamiento con ghrelina reduce asimismo la activación de la microglia sugiriendo que la acción neuroprotectora de

ghrelina podría estar mediada en parte por la atenuación de la respuesta inflamatoria (Erşahin et al., 2011). En este contexto, se ha observado que la ghrelina enlentece la evolución de la encefalitis experimental autoinmune (EEA), un modelo animal de esclerosis múltiple (Theil et al., 2009). La inyección diaria de ghrelina intraperitoneal (ip) reduce la severidad de la EEA y disminuye los niveles de citoquinas proinflamatorias y de microglia activada, avalando las propiedades antiinflamatorias de ghrelina como mecanismo neuroprotector de la sustancia blanca.

4.8.- Alteraciones de la vaina de mielina en el envejecimiento cerebral

En el envejecimiento se produce una disminución en el contenido de mielina en el cerebro así como alteraciones estructurales y bioquímicas de la vaina de mielina.

Está ampliamente aceptado que con la edad se produce una **pérdida de la cantidad total de mielina** (Berlet y Volk, 1980; Wiggins et al., 1988; Sloane et al., 2003). Se ha estimado que esta pérdida de sustancia blanca alcanza hasta un 15% en el cerebro humano (Pakkenberg y Gundersen, 1997; Tang et al., 1997) afectando especialmente a las fibras intracorticales, las cuales se cree que son las responsables de la función cognitiva superior (Kemper, 1994). La pérdida de sustancia blanca va asociada a una disminución de la longitud de los axones mielinizados, los cuales experimentan una reducción de hasta un 10% por década y hasta un 45% a lo largo de la vida (Pakkenberg y Gundersen, 1997; Tang et al., 1997; Marner et al., 2003).

Además, como consecuencia del envejecimiento, se han observado **alteraciones estructurales** en la vaina de mielina de algunos internodos en el cerebro de rata (Knox et al., 1989; Sugiyama et al., 2002), monos (Feldman y Peters, 1998; Peters et al., 2000; Peters y Sethares, 2002; Sloane et al., 2003) y humanos (Albert, 1993). Se ha sugerido que estas alteraciones estructurales puedan deberse a la activación de células proinflamatorias, a alteraciones en las proteínas de los oligodendrocitos o a una combinación de ambos factores (Hinman y Abraham, 2007).

El envejecimiento también produce **cambios bioquímicos** en la expresión de lípidos y proteínas de la mielina. Se ha observado una disminución de la MBP tanto en ancianos sin alteraciones cognitivas (Ansari y Loch, 1975; Wang et al., 2004) como en ancianos con Alzheimer (Roher et al., 2002). En el estudio de Sloane et al. (2003) en monos Rhesus se observó que la MBP, la PLP y la MAG no se alteran con la edad, mientras que la MOSP y la CNP disminuyen.

4.9.- Repercusiones funcionales de la alteración de la vaina de mielina en el envejecimiento

El efecto de las alteraciones de la mielina en el envejecimiento en la función del axón no está claramente definido. Existe una fuerte evidencia de que la edad y la pérdida de la integridad de la mielina reducen la velocidad de la conducción del impulso nervioso a lo largo de las fibras nerviosas. En gatos (Morales et al., 1987; Xi et al., 1999) y en ratas (Aston-Jones et al., 1985) se ha observado que en el envejecimiento se produce una disminución de la

velocidad de la conducción nerviosa. Esta disminución ocurre comúnmente en enfermedades desmielinizantes (Waxman et al., 1994). Así, en ratones deficientes de PLP, en los que la mielina es laxa o poco compacta, la velocidad de la conducción nerviosa está reducida, al igual que en las fibras nerviosas que han perdido uno o más internodos de mielina debido a la esclerosis múltiple (Felts et al., 1997). Por otro lado, estudios recientes sugieren que las alteraciones de las membranas de la mielina con la edad modifican la organización de las proteínas axonales cerca o en el propio nodo de Ranvier (Hinman et al., 2006).

En conjunto, estas observaciones sugieren que los cambios en la sustancia blanca que ocurren en el envejecimiento son una causa importante de la pérdida cognitiva asociada a la edad tanto en monos (Peters y Sethares, 2002) como en humanos (O'Sullivan et al., 2001). Los estudios de Peters et al. (2000) y Peters y Sethares (2002) en monos Rhesus apoyan la existencia de una correlación entre la frecuencia de las alteraciones de la vaina de mielina en el envejecimiento y la pérdida de la función cognitiva de la corteza primaria visual (Peters et al., 2000) y de la corteza prefrontal (Peters y Sethares, 2002). Las alteraciones de la mielina y su consiguiente pérdida de funcionalidad, afectan a la velocidad de la conducción axonal originando el enlentecimiento de la conducción nerviosa observados en animales y humanos viejos (Aston-Jones et al., 1985; Dustman et al., 1996) y alterando la sincronización de los circuitos neuronales.

4.10.- Remielinización en el envejecimiento

La remielinización es un proceso regenerativo espontáneo en el que se sintetizan nuevas vainas de mielina en axones desmielinizados (Franklin y Hinks, 1999). En el SNC, este proceso implica el reclutamiento inicial de progenitores de OD a las áreas a remielinizar, proceso que implica a su vez la migración y la proliferación de estas células, y su posterior diferenciación a OD mielinizantes (Godfraind et al., 1989; Reynolds y Wilkin, 1993; Carroll y Jennings, 1994; Franklin et al., 1997; Gensert y Goldman, 1997; Redwine y Armstrong, 1998; Di Bello et al., 1999; Levine y Reynolds, 1999).

Este proceso, como muchos procesos reparadores en el organismo, se hace menos eficiente con la edad (Gilson y Blakemore, 1993; Ashcroft et al., 1995; Shields et al., 1999), lo que se traduce en una disminución de la tasa de remielinización (Shields et al., 1999; Sim et al., 2000). Esta pérdida de efectividad del proceso de remielinización en el envejecimiento puede deberse a una disminución en el reclutamiento de progenitores de OD, a una disminución de la velocidad a la que los progenitores se diferencian en OD remielinizantes, o una combinación de ambas causas.

Por otro lado, algunos estudios han sugerido que la pérdida de la capacidad remielinizante en el SNC envejecido está relacionada con los cambios en la respuesta inflamatoria y en la expresión de supuestas moléculas de señalización (Hinks y Franklin, 2000). Ésto, junto con el hecho de que los oligodendrocitos son especialmente susceptibles a sufrir daños por numerosas sustancias que aumentan en el cerebro viejo como son el complemento producido por los macrófagos, las citoquinas, el óxido nítrico, cambios en los niveles de calcio y glutamato intracelular (Ludwin, 1997) y el estrés oxidativo (Juurink et al., 1998), plantean la cuestión de si realmente en el cerebro viejo existe un fallo en el proceso de remielinización o el daño cerebral es tan elevado que no puede ser frenado por los mecanismos reparadores, con la consecuente desmielinización.

La reparación de las lesiones desmielinizantes requiere de la migración, proliferación y diferenciación de los precursores celulares de los OD, que se originan en áreas subventriculares alejadas de las áreas de sustancia blanca del SNC. La expresión de moléculas quimioatrayentes, que regulan estos procesos durante el desarrollo, es un mecanismo crítico en la respuesta del SNC a las lesiones, asegurando que los precursores celulares neurales migren y maduran adecuadamente para reemplazar a las células dañadas. En este sentido, un grupo especial de citoquinas quimiotácticas, las quimioquinas, están recibiendo una gran atención por su implicación en los procesos de mielinización-remielinización del SNC. Se ha observado que la quimioquina CXCL12 y su receptor, CXCR4, ejercen un importante papel en el funcionamiento del sistema inmune y del sistema nervioso, donde se presentan en varios tipos celulares y en determinados microambientes (Klein y Rubin, 2004). En el SNC CXCL12 participa en la proliferación neuronal, migración celular, crecimiento axonal y mielinización durante el desarrollo (Zou et al., 1998; Lu et al., 2002; Stumm et al., 2003; Pujol et al., 2005).

Numerosos estudios *in vitro* han sugerido la participación del complejo CXCL12/CXCR4 en la migración y en la maduración de los precursores celulares de los oligodendrocitos (Dziembowska et al., 2005; Kadi et al., 2006; Maysami et al., 2006).

Los estudios *in vivo* disponibles apoyan los resultados obtenidos *in vitro*. En un modelo de desmielinización en ratas inducido por cuprizona, la apoptosis de OD maduros en el cuerpo calloso junto con la acumulación de precursores de preOD en la zona (Mason et al., 2004) va acompañada por un incremento en la expresión de CXCL12 por los astrocitos y microglia reactiva y por la acumulación de precursores de OD que expresan CXCR4 (Patel et al., 2010). La administración de un antagonista de CXCR4 conduce a una disminución de la diferenciación de los precursores y de la remielinización de esta zona, sugiriendo un papel crítico de estas moléculas en la recuperación de las lesiones desmielinizantes cerebrales (Patel et al., 2010). En esta línea, estudios realizados en tejidos de pacientes con esclerosis múltiple, han demostrado la expresión de CXCL12 en astrocitos activados tanto en lesiones activas como silentes (Moll et al., 2009), sugiriendo que su expresión ocurre en respuesta a las lesiones. El estudio realizado por Carbajal et al. (2010) confirma estos resultados. En este estudio se observó que a las 3 semanas del trasplante de células madre en la médula espinal de ratones con desmielinización inducida por el virus de la hepatitis estas células expresaban el CXCR4 y migraban hacia áreas de sustancia blanca ricas en CXCL12 donde se diferenciaban en precursores de OD y en OD, induciendo la remielinización.

En la actualidad no existen datos sobre el efecto del envejecimiento en la expresión y funcionalidad de esta quimioquina. Dado su importante papel en los procesos remielinizantes en el SNC su alteración en el envejecimiento podría estar implicada en la pérdida de efectividad del proceso de remielinización.

5.- NEUROINFLAMACIÓN EN EL ENVEJECIMIENTO

5.1.- Inflamación sistémica

Una de las características principales del envejecimiento es la atenuación de la función inmunológica o inmunosenescencia (Castle, 2000), además de alteraciones en diversos parámetros metabólicos, y un aumento de los niveles de varios marcadores inflamatorios. Entre los parámetros alterados se han observado cambios en los niveles séricos de varias citoquinas. En algunos estudios se ha demostrado un incremento en los niveles circulantes del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), interleuquina-1 beta (IL-1 β), e interleuquina-6 (IL-6) (Wei et al., 1992; Ershler et al., 1993; Ershler y Keller, 2000; Paganelli et al., 2002), mientras que en otros no se ha observado ningún cambio (Peterson et al., 1994; Beharka et al., 2001). A pesar de estas discrepancias, en la actualidad está ampliamente aceptado que el envejecimiento se caracteriza por un cierto grado de inflamación sistémica (Taub y Longo, 2005; Fulop et al., 2006) y se ha sugerido que esta inflamación sistémica podría causar a su vez una respuesta inflamatoria en el cerebro viejo (Godbout et al., 2005).

5.2.- Inflamación cerebral

De acuerdo con esta hipótesis, las evidencias experimentales disponibles sugieren que en el envejecimiento fisiológico el cerebro presenta un cierto nivel de inflamación crónica caracterizado por un aumento de los astrocitos y de la microglia reactiva, que serían responsables de la liberación de factores proinflamatorios y/o citotóxicos como el TNF- α , la IL-1 β , la IL-6, especies reactivas de oxígeno, factores del complemento, productos neurotóxicos, radicales libres y óxido nítrico, que contribuyen tanto a la disfunción neuronal como a la muerte celular (Griffin et al., 1998). Varios estudios han descrito un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias como la IL- β , TNF- α e IL-6 fundamentalmente en el hipocampo viejo pero también en regiones corticales (Murray et al., 1997; Ye y Johnson, 1999; Terao et al., 2002; Katafuchi et al., 2003; Xie et al., 2003; Maher et al., 2004; Nolan et al., 2005; Sierra et al., 2007; Tripathy et al., 2010).

Sin embargo, el efecto del envejecimiento en la expresión de las citoquinas anti-inflamatorias no está definido. En el cerebro, se ha observado aumentos de citoquinas anti-inflamatorias (González-Scarano y Baltuch, 1999), disminuciones de la IL-10 y la IL-4 (Ye y Johnson, 2001; Maher et al., 2005; Frank et al., 2006) o no cambios (Peterson et al., 1994). Dado que tanto la IL-10 como la IL-4 contrarrestan los efectos de la inflamación reduciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de sus receptores, una disminución de estas citoquinas anti-inflamatorias podría potenciar la neuroinflamación asociada con la edad (Sawada et al., 1999; Heyen et al., 2000; Strle et al., 2001; Loane et al., 2009).

Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos de los perfiles de expresión génica en cerebros de ancianos y de roedores viejos, que demuestran un aumento de la expresión de genes implicados en el estrés oxidativo, inflamación y activación glial, junto con una disminución de la expresión de genes asociados con la función sináptica, factores de

crecimiento y factores tróficos (Lee et al., 2000; Blalock et al., 2003; Godbout et al., 2005; Bishop et al., 2010).

La activación microglial del cerebro envejecido favorece una respuesta inflamatoria exagerada tras un estímulo periférico o central (Godbout et al., 2005; Huang et al., 2008). El aumento de las citoquinas proinflamatorias, principalmente la IL-1 β , altera la fisiología normal del cerebro y contribuye a las deficiencias en el comportamiento asociadas a la edad (Lynch y Lynch, 2002; Yirmiya et al., 2002; Gemma et al., 2005). Se ha observado que la persistencia en el cerebro viejo de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α se acompaña de una respuesta ante la enfermedad más duradera, deficiencias cognitivas y comportamientos depresivos (Godbout y Johnson, 2004; Chen et al., 2008; Abraham y Johnson, 2009). En este sentido, el hipocampo, que posee una alta densidad de receptores de citoquinas pro-inflamatorias, es particularmente vulnerable a las deficiencias cognitivas inducidas tanto por el envejecimiento como por la inflamación (Parnet et al., 2002; Wilson et al., 2002; Mattson y Magnus, 2006). Los ratones viejos, a diferencia de los ratones jóvenes, presentan tras la activación innata del sistema inmune periférico niveles significativamente elevados de citoquinas proinflamatorias en el hipocampo junto con alteraciones en tareas específicas relacionadas con la actividad del hipocampo como el aprendizaje y la memoria (Barrientos et al., 2006; Chen et al., 2008; Rosczyk et al., 2008; Abraham y Johnson, 2009). El hecho de que las citoquinas puedan actuar directamente en neuronas del hipocampo y alterar la plasticidad sináptica, podría ser un posible mecanismo que explique las deficiencias cognitivas asociadas con la inflamación (Lynch, 2002; Balschun et al., 2004; Pickering y O'Connor, 2007).

5.3.- Inflamación y desmielinización cerebral

Numerosos estudios en humanos y animales sugieren que los mediadores inflamatorios están implicados en la etiopatogenia de enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain-Barré. La lesión de los oligodendrocitos que acompaña a estas patologías ha sido atribuida a la acción de una gran variedad de tipos celulares y mediadores inflamatorios. Entre los mediadores celulares se incluyen células T activadas (Freedman et al., 1997), macrófagos de origen sistémico, astrocitos y microglía activada (Antel et al., 1994; Liuzzi et al., 1995). En cuanto a los mediadores inflamatorios en estudios *in vitro* se ha observado que los oligodendrocitos son lesionados por la exposición a TNF- α (Selmaj, Cross, et al., 1991; Selmaj, Raine, et al., 1991) y otros mediadores inflamatorios, como la IL-1 β (Merrill, 1991; Brogi et al., 1997), interferon- γ (IFN- γ), óxido nítrico (Mitrovic et al., 1995), especies reactivas de oxígeno (Husain y Juurlink, 1995), complemento activado y glutamato (Oka et al., 1993). *In vivo*, la sobreexpresión en el cerebro del gen de TNF- α produce una desmielinización severa, apoptosis de oligodendrocitos y una muerte temprana de los ratones (Probert et al., 1995; Akassoglou et al., 1999).

Estas evidencias sugieren que la neuroinflamación podría ser una causa subyacente de la desmielinización cerebral y de las alteraciones de la mielina propias del envejecimiento. De hecho, se ha observado que el envejecimiento de la sustancia blanca va acompañado de un incremento en la activación microglial (Sloane et al., 1999; Hinman et al., 2004), aunque la relación causa-efecto no está clara. En monos, los astrocitos reactivos (Sloane et al., 2000) y el número de células microgliales activadas aumenta dramáticamente con la edad, especialmente en regiones cerebrales ricas en sustancia blanca, y este aumento se correlaciona con

deficiencias cognitivas (Sloane et al., 1999). El aumento de la actividad de la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS) de la microglia activada (Nakanishi, 2003) podría ser la causa del aumento de residuos de nitrotirosina en la sustancia blanca observada en monos viejos (Sloane et al., 1999). En el nervio óptico de monos viejos, se ha detectado por microscopía electrónica un aumento en el número de microglia y astrocitos hipertrofiados, y las células microgliales parecen haber fagocitado fibras de mielina (Sandell y Peters, 2002). Además, en monos y ratones viejos se ha observado un aumento significativo del número de oligodendrocitos activados por la unión de componentes de la cascada del complemento, característica patológica de la inflamación de la sustancia blanca en la esclerosis múltiple (Schwab y McGeer, 2002) y otras enfermedades neurodegenerativas (Yamada et al., 1990; Mouton et al., 2002).

En la actualidad existe cierta controversia sobre el papel beneficioso o perjudicial de la neuroinflamación en el SNC (Schwartz et al., 1999; Yong, 2004). Varios trabajos han demostrado que la administración de citoquinas proinflamatorias en áreas lesionadas del cerebro ejercen acciones neuroprotectoras y/o promueven la regeneración axonal (Schwartz et al., 1999; Yong, 2004). Las citoquinas proinflamatorias como la IL-6 (Yamada y Hatanaka, 1994; Matsuda et al., 1996; Loddick et al., 1998) y la IL-1 β (Mason et al., 2001) tienen un papel neuroprotector en el cerebro (Carlson et al., 1999; Campuzano et al., 2009). La IL-1 β promueve *in vitro* la proliferación de células de Schwann (Conti et al., 2002) y estimula directa e indirectamente la supervivencia celular (Herk et al., 2000; Diem et al., 2003). En el SNC promueve la síntesis de factores de crecimiento que inducen la proliferación y diferenciación de los progenitores de oligodendrocitos (Araujo y Cotman, 1992; Silberstein et al., 1996; Glazebrook et al., 1998) y la mielinización (Mason et al., 2001).

5.4.- Inflamación e hipófisis

Años de investigación han evidenciado que las citoquinas actuando por mecanismos autocrinos y/o paracrinos regulan la secreción hormonal y el crecimiento hipofisario.

Se ha demostrado la síntesis de la IL-1 en la hipófisis anterior de ratas (Koenig et al., 1990) y en adenomas hipofisarios humanos *in vitro* (Green et al., 1996). Estudios recientes en ratas sugieren la participación de esta citoquina en el desarrollo embrionario de la hipófisis (Moro et al., 2008). La expresión del gen del TNF- α también ha sido demostrada por RT-PCR en adenomas hipofisarios (Green et al., 1996), pero su síntesis en la hipófisis normal no ha sido confirmada.

En cuanto a sus acciones, se ha demostrado que la IL-1 regula el crecimiento celular, inhibiendo el crecimiento de células hipofisarias de manera dosis y tiempo dependiente, aunque no tiene efecto en el crecimiento de las células tumorales GH3 (Renner et al., 1995). La IL-1 β estimula la proliferación celular de la hipófisis normal (Stepień et al., 1994).

A pesar de que la literatura no es completamente consistente, las evidencias disponibles sugieren que la IL-1 estimula directamente la secreción de la mayoría de las hormonas de la hipófisis anterior, a excepción de la prolactina (PRL), cuya secreción es aparentemente inhibida (Bernton et al., 1987; Uehara et al., 1987; Arzt et al., 1999). La IL-1 estimula la liberación de GH en células GH3 (Gong et al., 2005), de ACTH en células AtT-20

(Kovalovsky et al., 2004) y en células corticotropas humanas en cultivo (Gong et al., 2005). En cuanto al TNF- α también se ha demostrado su participación en la secreción de ACTH, GH, TSH y PRL, con resultados específicos dependiendo de los distintos modelos utilizados (Milenkovic et al., 1989; Koike et al., 1991; Harel et al., 1995).

Recientemente se ha observado la expresión de la quimioquina CXCL12 en células de la hipófisis anterior (Horiguchi et al., 2012) y diversos estudios han sugerido que la interacción de CXCL12 con su receptor CXCR4 puede jugar un importante papel en el funcionamiento de la hipófisis. Así se ha demostrado su intervención en la regulación de la secreción hormonal de la hipófisis anterior (Florio et al., 2006; Massa et al., 2006) y en particular de la GH (Lee et al., 2008). Se ha demostrado la expresión de CXCR4 en células somatotropas y existen datos *in vitro* en células hipofisarias normales y en células tumorales GH4C1 y GH3 de la participación de CXCL12 en la regulación de la secreción de la GH y en la proliferación de células somatotropas normales y tumorales (Lee et al., 2008). Se ha sugerido su implicación en la etiopatogenia de adenomas hipofisarios (Barbieri et al., 2007).

En la actualidad no existen datos sobre el efecto del envejecimiento en la expresión hipofisaria de citoquinas y quimioquinas, ni sobre su implicación en las alteraciones endocrinas que acompañan al envejecimiento.

5.5.- Sistema GH/IGF-I e inflamación

Numerosas evidencias apoyan la existencia de una relación bidireccional entre el sistema GH/IGF-I y el sistema inmunológico. En humanos se ha demostrado que las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 afectan al sistema GH/IGF-I a diversos niveles (Bernton et al., 1987; Fan et al., 1995, 1996; Wolf et al., 1996; De Benedetti et al., 1997; Barreca et al., 1998). A su vez, la GH regula la función inmune como lo demuestran estudios *in vivo* e *in vitro* donde la GH estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Tseng et al., 1997; Bozzola et al., 1998, 2003; Uronen-Hansson et al., 2003; Pagani et al., 2005). Sin embargo, la administración de GH a pacientes con fallo cardiaco crónico disminuye los niveles circulantes de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 y de sus receptores solubles (Adamopoulos et al., 2002, 2003; Wollert y Drexler, 2003), sugiriendo, por tanto, un efecto antiinflamatorio de GH.

Los estudios *in vitro* sugieren que la acción de GH sobre las células inmunes y la producción de citoquinas proinflamatorias está mediada por IGF-I (Geffner et al., 1990; Kooijman et al., 1996). Paradójicamente, la mayoría de estudios disponibles han descrito las acciones del IGF-I como antiinflamatorias. En este sentido estudios *in vitro*, con elevadas dosis del IGF-I, evidencian la capacidad del IGF-I de antagonizar a las citoquinas proinflamatorias en explantes de cartílago (Tyler, 1989), islotes de Langerhans (Mabley et al., 1997) y en células de la musculatura vascular lisa (Schini et al., 1994). Estudios *in vivo* han demostrado que el IGF-I disminuye la inducción de TNF- α e IL-1 β en el shock séptico (Inoue et al., 1995) y en quemaduras (Spies et al., 2001).

A nivel cerebral, se ha observado una estrecha relación entre las citoquinas proinflamatorias y el IGF-I, especialmente entre el TNF- α e IGF-I. La sobreexpresión en el cerebro del TNF- α retarda el crecimiento cerebral e induce daño neuronal, debido a una

disminución de la expresión de IGF-I, y altera las concentraciones de diversas proteínas del sistema IGF-I capaces de modular sus acciones (Ye et al., 2003). Esto sugiere que una baja disponibilidad de IGF-I puede ser la responsable, al menos en parte, de los efectos perjudiciales de TNF- α en los oligodendrocitos y en la mielina descritos por Akassoglou et al. (1997) y por Probert et al. (1995). De la misma manera, los efectos citotóxicos de TNF- α observados en las neuronas granulares del cerebelo están asociados con un silenciamiento de las señales de supervivencia del IGF-I (Venters et al., 1999). Se ha demostrado que la adición *in vitro* del IGF-I rescata a las neuronas (Kenchappa et al., 2004) e inhibe la apoptosis de los oligodendrocitos y de sus precursores inducida por TNF- α (Ye y D'Ercole, 1999). *In vivo*, el IGF-I reduce la desmielinización de los ratones transgénicos de TNF- α (Ye et al., 2007), lo que apoya un posible papel neuroprotector de IGF-I frente a la inflamación mediada por TNF- α .

5.6.- Secretagogos de GH e inflamación

Evidencias recientes sugieren un papel de ghrelina en la regulación de la inflamación (Taub, 2008; Hattori, 2009; Taub et al., 2010). La mayoría de los estudios realizados *in vitro* han demostrado que ghrelina ejerce un potente efecto inhibitorio de la expresión del ARNm y de la proteína de las citoquinas proinflamatorias IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6 por linfocitos T, monocitos activados (Dixit et al., 2004) y células dendríticas (Taub, 2008).

In vivo, el potencial de ghrelina como agente antiinflamatorio se ha puesto de manifiesto en varios modelos animales de la enfermedad inflamatoria intestinal (Gonzalez-Rey, Chorny, et al., 2006), artritis (Granado et al., 2005; Chorny et al., 2008), sepsis y endotoxemia (Chang et al., 2003; Li et al., 2004; Wu et al., 2007; Chorny et al., 2008), fallo cardiaco congestivo (Nagaya et al., 2001; Nagaya y Kangawa, 2003) y caquexia por cáncer (Hanada et al., 2003; Neary et al., 2004).

El hecho de que ghrelina antogonice la producción de IL-6 (Dixit et al., 2004) tiene una gran importancia en el envejecimiento, ya que los niveles de IL-6 aumentan significativamente durante esta etapa (Ye y Johnson, 1999; Ershler y Keller, 2000) y en enfermedades comunes de la edad avanzada (Sempowski et al., 2000; Zietz et al., 2001; Visser et al., 2002). El estudio de Dixit et al. (2009) demostró que la administración de ghrelina a ratones viejos producía una disminución significativa de los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , entre otros marcadores inflamatorios. Estos resultados, junto con el hecho de que la expresión de ghrelina y de su receptor en las células inmunes disminuye con la edad, sugieren que una disminución de ghrelina puede estar implicada en el aumento de la inflamación sistémica con la edad. Se ha postulado que la administración de ghrelina en el envejecimiento podría mejorar el patrón inflamatorio propio del envejecimiento (Taub y Longo, 2005; Taub et al., 2010).

Algunos estudios recientes han abordado el papel de ghrelina en el tratamiento de patologías que cursan con neuroinflamación como lesiones cerebrales, isquemia cerebral, Alzheimer y enfermedades autoinmunes del sistema nervioso. En estos estudios se ha demostrado la capacidad de ghrelina de disminuir las citoquinas proinflamatorias y de ejercer acciones neuroprotectoras en un modelo de daño cerebral inducido por hemorragia subaracnoidea (Erşahin et al., 2010), en hipoxia cerebral (Cheyuo et al., 2011), en daño cerebral por traumatismo (Bansal et al., 2010), dolor neuropático mediado por inflamación (Guneli et al., 2010) y en células microgliales de ratón estimuladas por β -amiloide (Bulgarelli et

al., 2009). El potencial terapéutico de ghrelina en el tratamiento de enfermedades desmielinizantes que cursan con inflamación ha sido puesto de manifiesto por Theil et al. (2009). En la encefalomiелitis experimental autoinmune la administración de ghrelina atenúa la progresión y la severidad de la enfermedad y disminuye los niveles del ARNm de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α en infiltrados celulares de la médula espinal y en células microgliales.

6.- MEMORIA Y ENVEJECIMIENTO

6.1.- Eje GH/IGF-I y memoria

Tanto en animales como en humanos, la alteración cognitiva más generalizada en el envejecimiento es la pérdida de memoria. Los primates no humanos exhiben deficiencias en la realización de tareas que implican a la memoria (Arnsten y Goldman-Rakic, 1985; Moss et al., 1988; Rapp y Amaral, 1989). En roedores, se han observado deficiencias asociadas a la edad en la realización de tareas relacionadas con la memoria referencial espacial tales como el laberinto en agua de Morris y el laberinto de Barnes (Barnes, 1979) y en tareas que enfatizan la memoria de trabajo como el laberinto de brazos radiales y la alternancia de tareas (Barnes et al., 1980; Zornetzer et al., 1982). En humanos, es bien conocido que los ancianos muestran déficit de memoria (Light et al., 1991), en recuerdo libre y en memoria de reconocimiento (Burke y Light, 1981; Bowles y Poon, 1985; Guttentag y Madden, 1987; Hultsch et al., 1990) y en otras tareas de memoria que representan actividades de la vida diaria (West et al., 1992) como el recuerdo de información de los prospectos de medicinas, recuerdo de información topográfica cercana a sus casas, apariencia de objetos comunes y nombres y caras de compañeros (Maylor, 1990).

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas con el fin de comprender los mecanismos del aprendizaje y de la memoria y del deterioro que ocurre con la edad, la etiología de estas deficiencias aún permanece desconocida. Estudios recientes han sugerido la posibilidad de que el estado cognitivo esté asociado con los niveles de GH e IGF-I. Esto se fundamenta en la presencia de GH e IGF-I en el LCR y de los receptores R-GH y R-IGF-I en el cerebro (Johansson, Fowelin, et al., 1995; Nyberg y Burman, 1996). La presencia del R-GH en el hipocampo, una estructura cerebral de una importancia relevante en los procesos de aprendizaje y memoria, junto con el hecho de que las alteraciones cognitivas, uno de los rasgos característicos de la deficiencia de GH tanto en humanos (Deijen et al., 1996; Sartorio et al., 1996; Rollero et al., 1998) como en roedores (Noguchi, Sugisaki, Tsukada et al., 1982; Bouchon y Will, 1983), mejoren con el tratamiento con GH (Noguchi, Sugisaki, Watanabe, et al., 1982; Burman et al., 1995; Deijen et al., 1998) sugiere un efecto del eje GH/IGF-I en la cognición.

En este sentido se ha demostrado una acción facilitadora de GH en la adquisición de la memoria (Hoddes, 1979), que podría reflejar un papel fisiológico de GH durante el sueño, ya que tanto la memoria como el aprendizaje son estimulados durante el periodo REM del sueño, el cual, a su vez es inducido por los picos de secreción de GH durante el sueño (Mendelson et

al., 1980). En el SNC la GH potencia la memoria a largo plazo (Schneider-Rivas et al., 1995), efecto que podría estar mediado por CREB, dado que la GH estimula la fosforilación y la transactivación de CREB (Lobie et al., 1995), factor responsable de la formación de la memoria a largo plazo (Kornhauser y Greenberg, 1997). También se ha sugerido que la GH ejerce sus efectos sobre la memoria y otras capacidades cognitivas regulando los niveles de SS, péptido que influye en los procesos de aprendizaje y de memoria (Alvarez y Cacabelos, 1990) y cuya expresión es estimulada por GH en el cerebro de la rata vieja (López-Fernández et al., 1996).

Dado que la actividad del eje somatotropo disminuye con la edad, se ha sugerido que este estado de hiposomatotropismo relativo podría ser un factor determinante en la disminución de las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento (Rollero et al., 1998; Aleman et al., 1999) y en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Connor et al., 1997; Connor y Dragunow, 1998). En ratas viejas la disminución de la microvasculatura cerebral está asociada con bajos niveles de GH e IGF-I (Sonntag et al., 1997). Todo esto sugiere que el hiposomatotropismo junto con un aporte vascular reducido en el cerebro podría contribuir a los cambios cognitivos observados en los ancianos

A pesar de estas evidencias, todavía no se ha demostrado una relación directa entre la pérdida de actividad de los somatotropos y la función cognitiva durante el envejecimiento fisiológico. Algunos estudios han observado una correlación positiva entre los niveles de IGF-I total o el cociente IGF/IGFBP3 y la función cognitiva en individuos viejos (Morley et al., 1997; Kalmijn et al., 2000), pero estos resultados no han sido confirmados por otros estudios (Papadakis et al., 1995; Paolisso et al., 1997; Rollero et al., 1998). Curiosamente, los niveles de IGF-I, pero no los de GH, se correlacionan con parámetros cognitivos en los sujetos ancianos (Aleman et al., 2000).

Aunque en sujetos adultos jóvenes con DGH, se ha observado un efecto positivo de la terapia con GH en la función cognitiva, en el bienestar psicológico y en la memoria a corto y a medio plazo (Deijen et al., 1996, 1998; Cummings y Merriam, 2003), no existe una clara evidencia de que el tratamiento con GH o con IGF-I mejore significativamente los parámetros cognitivos, la memoria o el estado de ánimo en sujetos ancianos (Friedlander et al., 2001; Cummings y Merriam, 2003; Liu et al., 2007).

6.2.- Secretagogos de GH y memoria

Un creciente número de estudios en roedores sugieren que la ghrelina está implicada en los procesos de memoria. En ratas, la administración intracerebroventricular de ghrelina, además de la inyección de ghrelina en el hipocampo, en la amígdala y en el núcleo de rafe dorsal estimula la retención de estímulos a evitar (Carlini et al., 2002, 2004, 2008) y el reconocimiento de objetos en ratas (Carlini et al., 2004). Diano et al. (2006) observaron que los ratones knockout de ghrelina presentaban deficiencias en la memoria, que mejoraban tras la administración de ghrelina exógena o de su mimético LY444711. De igual manera, en ratones, la disminución en el reconocimiento de objetos debida a la restricción crónica de comida se contrarresta por la administración de ghrelina (Carlini et al., 2008).

Dado que los agonistas del receptor de ghrelina mejoran la retención memorística en ratas (Atcha et al., 2009), el R-GHS central ha sido propuesto como una diana terapéutica para

tratar enfermedades que afectan a la cognición (Atcha et al., 2009; Carlini, Gherzi, et al., 2010). De hecho, la administración de ghrelina mejora las alteraciones de la memoria en un modelo en ratón de enfermedad de Alzheimer (Moon et al., 2011) y en un modelo de ratas diabéticas (Ma et al., 2011). En contraste con estos resultados que sugieren un efecto positivo de ghrelina en la memoria, también se ha observado una pérdida en la retención en pollos recién nacidos después de la administración de ghrelina (Carvajal et al., 2009).

En humanos, los datos sobre los efectos de ghrelina en la capacidad cognitiva son dispares. Al contrario de lo observado en roedores, en ancianos recientemente se han correlacionado negativamente los niveles de ghrelina con la memoria (Spitznagel et al., 2010). Los efectos de ghrelina en la memoria de consolidación de procedimientos parecen ser más negativos que positivos (Dresler et al., 2010).

El entramado neuroanatómico que integra a la ghrelina en la función de memoria aún no se comprende bien (Olszewski et al., 2008). En ratones, la ghrelina circulante alcanza el hipocampo donde se une a neuronas de la formación hipocampal, estimulando la formación de espinas dendríticas sinápticas y la generación de potenciación a largo plazo. De hecho, los ratones knockout de ghrelina tienen una reducida densidad de espinas sinápticas en comparación con los controles (Diano et al., 2006). En ratas, la administración de ghrelina reduce los valores umbrales para generar potenciación a largo plazo en el giro dentado y aumenta la síntesis de óxido nítrico mediante la activación de la NO sintasa (NOS) en el hipocampo (Carlini, Perez, et al., 2010). Dado que la actividad de NOS es diferente en animales entrenados que en los no entrenados, se ha sugerido que la NOS es uno de los factores endógenos del hipocampo que media los efectos de ghrelina en la memoria (Carlini, Perez, et al., 2010). Por otro lado, en el estudio de Ma et al. (2011) la mejora de la memoria de las ratas diabéticas tratadas con ghrelina iba acompañada por un aumento en la expresión de BDNF y CREB en el hipocampo, sugiriendo su implicación en los efectos de ghrelina en la memoria.

6.3.- CREB y memoria

La proteína CREB es un miembro de una familia de factores de transcripción relacionados estructuralmente que se unen a ciertas secuencias del ADN llamadas "elementos de respuesta a AMPc" (*cAMP Response Element*, CRE) (Montminy, 1997; Silva et al., 1998).

CREB se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro donde regula la transcripción de genes diana y su actividad es inducida en respuesta a calcio, neurotrofinas y señales de citoquinas, además de a una gran variedad de estímulos celulares (Silva et al., 1998; Shaywitz y Greenberg, 1999; Mayr y Montminy, 2001; Lonze y Ginty, 2002; Carlezon et al., 2005). La despolarización de la membrana y/o el aumento de AMPc estimulan fuertemente la fosforilización de CREB en la serina133, activando la transcripción dependiente de CREB (Gonzalez y Montminy, 1989; Sheng et al., 1991; Sánchez-Muñoz et al., 2010).

En el SNC, se ha demostrado que CREB es esencial en el proceso de formación de la memoria. La transcripción dependiente de CREB es clave para la plasticidad sináptica de larga duración y para la formación de la memoria a largo plazo (Silva et al., 1998; Shaywitz y Greenberg, 1999; Mayr y Montminy, 2001; Lonze y Ginty, 2002; Carlezon et al., 2005). Estudios

genéticos y farmacológicos en diversas especies han demostrado que CREB tiene un papel universal en la formación de la memoria, que abarca desde la memoria emocional hasta la memoria espacial y social (Yin et al., 1995; Bartsch et al., 1998; Josselyn et al., 2001; Jasnow et al., 2005). En ratas, la infusión intrahipocámpica de un oligonucleótido anti-sentido frente al ARNm de CREB produce una pérdida de la memoria a largo plazo (Guzowski y McGaugh, 1997). De igual manera, animales mutantes, con una reducción de hasta el 75% en los niveles de CREB, presentan una alteración de la memoria a largo plazo pero no de la memoria a corto plazo. Por el contrario, la sobreexpresión de CREB (Josselyn et al., 2001) o de un activador de CREB (Yin et al., 1995) estimulan la formación de la memoria a largo plazo en la rata y en *Drosophila*.

En roedores viejos, estudios previos han evidenciado que durante el envejecimiento fisiológico se produce una disminución de la fosforilación de CREB en el hipocampo (Foster et al., 2001; Hattiangady et al., 2005; Porte et al., 2008; Williams et al., 2008; Xu et al., 2010), que conlleva una marcada disminución de la actividad de CREB con la edad (Asanuma et al., 1996) y una reducción en la expresión de genes requeridos para la formación de la memoria a largo plazo, como el del BDNF. La disminución de la actividad de CREB puede contribuir a las alteraciones de la memoria que acompañan al envejecimiento fisiológico.

6.4.- BDNF y memoria

Los cambios dependientes de actividad de la plasticidad sináptica son considerados los mecanismos responsables del aprendizaje y de la formación de la memoria. Por lo tanto, se cree que una plasticidad sináptica anormal en el hipocampo durante el envejecimiento es uno de los mecanismos responsables de la pérdida de memoria asociada a la edad (Foster, 1999). En este sentido, dado que BDNF juega un importante papel en la plasticidad sináptica dependiente de actividad así como en la potenciación a largo plazo, hay un gran interés en definir su papel en el aprendizaje y la memoria (Yamada y Nabeshima, 2003). El hipocampo, que es esencial para la formación de la memoria a largo plazo en humanos y animales, es una importante diana de la acción de BDNF. Evidencias experimentales recientes apoyan el papel de BDNF en los procesos de memoria. La adquisición de la memoria y su consolidación están asociadas con un aumento de la expresión del ARNm de BDNF y con la activación de su receptor TrkB en el hipocampo (Hall et al., 2000; Roher et al., 2002; Yamada et al., 2002). En roedores se ha demostrado que la privación genética o farmacológica de BDNF o del receptor TrkB afecta al aprendizaje y a la memoria (Linnarsson et al., 1997; Minichiello et al., 1999; Mu et al., 1999; Saarelainen, Lukkarinen, et al., 2000; Saarelainen, Pussinen, et al., 2000; Alonso et al., 2002). En humanos, un polimorfismo de valina a metionina en el extremo 5' de la proteína de BDNF se ha asociado con una pobre memoria episódica (Egan, Kojima, et al., 2003).

A partir de estas evidencias se ha sugerido que la reducción de la actividad de CREB en el envejecimiento junto con una disminución de los niveles de BDNF en el hipocampo, podría afectar a la plasticidad sináptica que causaría a su vez una alteración de la memoria espacial observada en diversos test de comportamiento (Foster et al., 2001; Porte et al., 2008; Williams et al., 2008; Xu et al., 2009).

7.- FACTORES NEUROTRÓFICOS Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

7.1.- PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO

7.1.1.- VIP: distribución y acciones neurotróficas en el sistema nervioso central

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un polipéptido de 28 aminoácidos inicialmente aislado de duodeno de cerdo, donde ejerce un potente efecto vasodilatador (Said y Mutt, 1970). Además de su presencia en el tracto gastrointestinal, VIP es un neuropéptido con una amplia distribución en el SNP y en el SNC de numerosas especies, observándose su máxima expresión en la neocorteza, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo de roedores (Larsson et al., 1976; Lorén et al., 1979; Sims et al., 1980; Obata-Tsuto et al., 1983) y humanos (Jégou et al., 1988; Ong y Garey, 1991; Benagiano et al., 1996; Hofman et al., 1996; Romijn et al., 1999). Se ha demostrado la presencia de VIP en cerebro de embriones de rata (Maletti et al., 1980; Jirikowski et al., 1982; Lorenzo et al., 1989) donde juega un importante papel durante el desarrollo (Brenneman et al., 1990).

Los estudios funcionales y farmacológicos indican que VIP, como neurotransmisor/neuromodulador, está implicado en la regulación de la transmisión sináptica y de la excitabilidad neuronal (Borghini et al., 1979; Pawelzik et al., 1992; Sun et al., 2003). Además, controla elementos no neurales del cerebro, como los gliocitos y ciertos constituyentes de la pared de la microvasculatura, e interviene en la regulación local del flujo sanguíneo y del metabolismo cerebral (Matsuyama et al., 1983; Bevan et al., 1984; Gibbins et al., 1984; Edvinsson et al., 1993; Virgintino et al., 1996; Magistretti et al., 1998).

Numerosas evidencias sugieren que VIP está implicado en la regulación de funciones cognitivas y psíquicas (Cottrell et al., 1984; Flood et al., 1990; Itoh et al., 1994; Chaudhury et al., 2008), ritmos circadianos que regulan las funciones neuroendocrinas, metabólicas y el comportamiento (Bechtold et al., 2008; Chaudhury et al., 2008; Gozes, 2008), procesos de histomorfogénesis, crecimiento y diferenciación de los tejidos nerviosos (Iwasaki et al., 2001; Karacay et al., 2003; Basille et al., 2006; Falluel-Morel et al., 2008) y procesos de protección y reparación del tejido nervioso en varias condiciones patológicas (Gozes et al., 2000; Hill, 2007; Falluel-Morel et al., 2008). Además, se ha observado que VIP estimula el metabolismo del glucógeno en la corteza cerebral, regula el crecimiento embrionario, y promueve la supervivencia de células neurales (Sorg y Magistretti, 1992; Brenneman et al., 1997). Un gran número de estudios han asociado a VIP con neuroprotección. La expresión de VIP aumenta durante la fase de formación de las sinapsis (Gozes et al., 1987) y VIP produce neuroprotección frente al bloqueo eléctrico (Brenneman, 1986).

El estudio de los mecanismos de estas acciones llevó al descubrimiento del factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF) y de la proteína neuroprotectora dependiente de actividad (ADNP) cuya síntesis es estimulada por VIP en las células de glia y a través de las cuales VIP ejerce ciertas acciones neurotróficas (Gozes et al., 2003). VIP estimula la producción de BDNF por las células T en ratones. Dado que BDNF es un factor neurotrófico (Barde, 1989) las acciones neurotróficas de VIP podrían estar mediadas por BDNF. En este

sentido se ha observado que VIP potencia la acción del glutamato sobre la expresión del BDNF (Pellegrini et al., 1998).

7.1.2.- Mecanismos de señalización intracelular de VIP: activación de CREB

VIP ejerce sus acciones biológicas a través de receptores de membrana específicos pertenecientes a la super familia de receptores asociados a proteína G. Se han indentificado tres receptores para VIP incluyendo el receptor del PACAP (PAC1-R), que presenta baja afinidad por VIP, y dos receptores de VIP (VPAC1 y VPAC2) (Harmar et al., 1998; Laburthe et al., 2007). VPAC2 está involucrado en ciertos efectos neuroprotectores de VIP (Rangon et al., 2005). También una variante del PAC-1 se ha relacionado con acciones neuroprotectoras de VIP (Pilzer y Gozes, 2006).

Los VPAC están clásicamente asociados con la señalización mediada por AMPc aunque otras vías de señalización como la movilización de calcio y la activación de PKC también se han descrito. La señalización mediada por AMPc, con la consiguiente activación de la PKA y el factor de transcripción CREB, podría estar involucrada en las acciones del VIP sobre la mielinización. En este sentido, en estudios previos hemos observado que la activación de CREB es necesaria para la inducción de MBP por IGF-I (Palacios et al., 2005). Otros estudios (Gao et al., 2004) han demostrado que CREB juega un papel clave en el proceso de remielinización *in vivo*. La señalización a través de la vía de señalización de la PKC está implicada en acciones neuroprotectoras de VIP en cerebro de ratón durante el desarrollo (Greesens et al., 1998).

7.1.3.- VIP y envejecimiento cerebral

Numerosos estudios han evidenciado que el envejecimiento se acompaña de una disminución en el número de neuronas vipérgicas en diversas áreas cerebrales tales como la corteza cerebral (Huh et al., 1997), la amígdala, la sustancia nigra (Andreose et al., 1994), el giro dentado del hipocampo y el núcleo supraquiasmático (Chee et al., 1988; Cha et al., 1995, 1997). Además, en el envejecimiento se modifica la morfología de las neuronas vipérgicas, especialmente en la corteza cerebral, disminuyendo el número y la longitud de las dendritas y alterándose el eje de las neuronas vipérgicas que aparece más inclinado e irregular (Cha et al., 1995). En concordancia con estos datos, también se ha descrito una reducción en los niveles de expresión del ARNm de VIP en el cerebro durante el envejecimiento (Gozes et al., 1988) y una pérdida del ritmo de secreción (Gozes et al., 1988; Krajnak et al., 1998; Duncan et al., 2001; Kalló et al., 2004; Gerhold et al., 2005).

Se ha sugerido que las células bipolares vipérgicas refuerzan la estimulación de las neuronas piramidales, sincronizando el funcionamiento de las redes verticales de neuronas piramidales. Por este motivo, la disminución en el número de las células vipérgicas en la corteza cerebral del cerebro viejo influiría en la precisa regulación de los sistemas implicados en las actividades motoras y/o sensoriales. Ciertos estudios sugieren que el bloqueo de la actividad de VIP *in vivo* puede producir deficiencias neurológicas y alteraciones del desarrollo neuronal, de la adquisición de reflejos y de los mecanismos de aprendizaje y memoria (Hill et al., 1991; Gozes y Brenneman, 1996).

Existen evidencias de que VIP está implicado en el mantenimiento del ritmo circadiano. En el núcleo supraquiasmático, principal regulador del ritmo circadiano, se ha descrito una disminución de neuronas vipérgicas en ratas (Chee et al., 1988) y en varones viejos (Zhou et al., 1995) que podría constituir el sustrato anatómico responsable de las alteraciones del ritmo circadiano que ocurre en el envejecimiento (Chee et al., 1988). Asimismo se ha observado una disminución de la expresión del VPAC2 en el núcleo supraquiasmático de las ratas viejas (Kalló et al., 2004).

7.1.4.- VIP y mielinización

Ciertas observaciones sugieren que VIP está implicado en el proceso de mielinización en el SNC y SNP.

Las primeras evidencias de que VIP participa en la mielinización del SNP fueron obtenidas en modelos de seccionamiento del nervio ciático. Rayan et al. (1991) demostraron que tras la axotomía, se producía un rápido incremento en la expresión de VIP en los segmentos proximales del nervio donde comienza la regeneración axonal. En estudios posteriores se demostró que VIP estimula la regeneración axonal *in vitro* (Rayan et al., 1995) y promueve la remielinización de los nervios transeccionados tras su administración local (Zhang et al., 2002).

En un modelo en ratón de leucomalacia periventricular, caracterizado por lesiones necróticas y quísticas de la sustancia blanca neocortical, se ha demostrado que VIP y sus análogos tienen un potente efecto neuroprotector de la sustancia blanca (Gressens et al., 1997, 1999) previniendo la muerte temprana de los astrocitos y estimulando la reparación axonal tras la lesión (Gressens et al., 1998). VIP protege en el periodo perinatal, la sustancia blanca frente a lesiones inducidas por excitotoxicidad. Estas acciones están mediadas por el receptor VPAC2 y la activación de las vías de señalización de PKC y MAPK (Passemaid et al., 2011). El incremento de BDNF observado tras la administración de VIP (Passemaid et al., 2011) induce a pensar en la participación de este factor neurotrófico en los efectos neuroprotectores de VIP.

Estudios recientes sugieren una relación entre VIP y patologías de la mielina como la esclerosis múltiple. En la esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria, autoinmune y desmielinizante que cursa con una pérdida de oligodendrocitos en el SNC, se ha observado una baja concentración de VIP en el LCR (Andersen et al., 1984) y un patrón de expresión de los receptores VPAC2 alterado en las células Th en comparación con sujetos sanos (Sun et al., 2006). En ratones el tratamiento con VIP reduce la incidencia y severidad de la encefalitis experimental autoinmune (EEA) (Gonzalez-Rey, Chorny, et al., 2006) lo que ha llevado a proponer a VIP como una alternativa terapéutica para el tratamiento de la esclerosis múltiple en humanos (Fernández-Martin et al., 2006).

Los mecanismos a través de los cuales VIP ejerce sus efectos en la sustancia blanca no están completamente esclarecidos. VIP es un secretagogo de una gran variedad de factores promotores de la supervivencia neuronal incluido el ADNF, citoquinas e inhibidores de proteasas (Brenneman et al., 1987, 1997; Festoff et al., 1996; Gozes y Brenneman, 1996). Otros factores implicados en los efectos de VIP incluyen el BDNF y el IGF-I. Husson et al. (2005) observaron que el efecto neuroprotector de VIP en la sustancia blanca estaba mediado

por BDNF, corroborando estudios previos donde se había demostrado que VIP estimulaba la expresión del ARNm del BDNF (Martin et al., 1995; Pellegrini et al., 1998). La implicación de IGF-I en los efectos de VIP sobre el crecimiento embrionario ha sido claramente puesta en evidencia por Servoss et al. (2001). A su vez, el bloqueo de VIP abole la acción proliferativa del IGF-I sobre células lactotropas (Fernández et al., 2003).

7.1.5.- VIP e inflamación

El VIP ejerce un amplio espectro de funciones biológicas, incluidas acciones en la inmunidad natural y adquirida (Pozo et al., 2000; Delgado y Ganea, 2001a; Gomariz et al., 2001; Ganea y Delgado, 2002), la proliferación de células T y varias funciones de los macrófagos, como la fagocitosis y la quimiotaxis (Pozo et al., 2000; Delgado y Ganea, 2001a; Gomariz et al., 2001; Ganea y Delgado, 2002), además de bloquear la producción de las citoquinas IL-6, TNF- α , IL-12, NO y de quimioquinas inducidas por LPS (Martinez et al., 1998; Xin y Sriram, 1998; Delgado et al., 1999; Delgado y Ganea, 2001b).

A nivel cerebral, también se ha observado un efecto antiinflamatorio de VIP. *In vitro*, VIP actúa como un potente factor desactivador de la microglia inhibiendo la producción de mediadores proinflamatorios inducidos por LPS (Delgado et al., 2002, 2003; Ganea y Delgado, 2002). *In vivo*, la inhibición de mediadores proinflamatorios es responsable, al menos parcialmente, de los efectos neuroprotectores de VIP en un modelo murino de shock séptico (Delgado et al., 1999) y en un modelo de trauma cerebral (Delgado y Ganea, 2003). En este sentido ya hemos mencionado anteriormente la relevancia que están tomando las acciones antiinflamatorias del VIP en enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (Gonzalez-Rey, Fernandez-Martin, et al., 2006).

A pesar de que se considera que VIP actúa como un inmunomodulador intrínseco del cerebro que ayuda a prevenir la respuesta inmune mediante acciones antiinflamatorias, ciertos estudios han descrito acciones proinflamatorias de VIP en células epiteliales del túbulo renal proximal (Huang et al., 2012) y en osteoblastos (Natsume et al., 2010). En este sentido, Maimone et al. (1993) observaron que VIP induce la secreción de IL-6 por astrocitos en cultivo, mostrando un efecto sinérgico sobre la expresión de IL-6 con la de IL-1 β y el TNF- α . Estos estudios, aunque escasos, sugieren que las acciones inmunomoduladoras del VIP pueden ser más amplias de lo que tradicionalmente se ha considerado.

7.2.- FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CEREBRO

7.2.1.- BDNF: localización y acciones

BDNF es un factor neurotrófico de la familia de las neurotrofinas que fue aislado del cerebro de cerdo donde promueve el crecimiento de neuronas sensoriales (Barde et al., 1982). Se trata de una proteína de 252 aminoácidos, de los que 51 son idénticos al factor de crecimiento nervioso (NGF) de varias especies. Estos residuos comunes incluyen seis cisteínas, tres triptófanos y dos restos de fenilalanina así como la mayoría de los residuos de valina y ácido aspártico en idéntica posición que en el NGF. Esta estructura conservada de

BDNF se mantiene también en la región precursora (Leibrock et al., 1989).

BDNF, al igual que otras neurotrofinas, se sintetiza como un precursor (pro-BDNF de 32 kDa) que posteriormente se escinde para generar el BDNF maduro (14 kDa) (Mowla et al., 2001, Yang et al., 2009). Se ha descrito una tercera isoforma de BDNF con un peso molecular de 28 kDa, denominada BDNF truncado (Mowla et al., 2001). Tanto el BDNF maduro como el pro-BDNF son biológicamente activos, mientras que la función del BDNF truncado es desconocida.

En el cerebro de rata adulto, el ARNm de BDNF se expresa en el hipocampo, corteza cerebral, cerebelo, estriado y amígdala (Castren et al., 1995; Dugich-Djordjevic et al., 1995; Kawamoto et al., 1996; Kato-Semba et al., 1997). La proteína de BDNF también se expresa en la corteza cerebral, hipocampo, prosencéfalo basal, estriado, hipotálamo, bulbo raquídeo y en el cerebelo (Kawamoto et al., 1996) estando localizado en el cuerpo celular, las dendritas y en las fibras. En general, existe coincidencia en los lugares de expresión de BDNF (proteína y ARNm), aunque también se han descrito algunas discordancias. En humanos, el BDNF se expresa en el hipocampo, el claustrum, la amígdala, el septum y el núcleo del tracto solitario (Murer et al., 1999).

De todas las neurotrofinas, las acciones de BDNF en las neuronas del SNC han sido las mejor caracterizadas. Se ha demostrado que BDNF juega un papel crítico en el desarrollo y en la plasticidad sináptica (Hofer y Barde, 1988; Lu y Figurov, 1997; McAllister, 1999), regula el desarrollo neuronal y sus funciones (Blum et al., 2002; Binder y Scharfman, 2004; Monteggia et al., 2004), estimula la supervivencia de las neuronas adultas y está implicado en el aprendizaje y comportamiento, en la eficiencia sináptica y en la conectividad neuronal (Ebadi et al., 1997; Tyler et al., 2002; Binder y Scharfman, 2004). Ligeros cambios en los niveles de BDNF, o en la expresión de diferentes polimorfismos de un solo nucleótido en el gen de BDNF se correlacionan con diferencias neuroanatómicas y cambios en el comportamiento en humanos y en modelos de ratones, que incluyen alteración de comportamientos alimentarios, alteraciones en la memoria episódica y susceptibilidad a desórdenes neuropsiquiátricos como la ansiedad y la depresión (Lyons et al., 1999; Egan, Weinberger, et al., 2003; Chen et al., 2006; Castrén y Rantamäki, 2008; Russo et al., 2009).

7.2.2.- Receptores de BDNF: TrkB y P75^{NTR}

BDNF ejerce sus efectos biológicos en el sistema nervioso a través de dos tipos de receptores: el receptor tirosina quinasa B (TrkB) y el receptor de las neurotrofinas P75 (P75^{NTR}) (Reichardt, 2006). El BDNF maduro se une selectivamente y con alta afinidad al receptor TrkB, mientras que el pro-BDNF interacciona preferiblemente con el P75^{NTR} (Chao y Bothwell, 2002).

En el SNC, la proteína del receptor TrkB se localiza en los cuerpos celulares, axones y dendritas (Fryer et al., 1996), observándose una amplia distribución en el cerebro con concentraciones máximas en la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipocampo, tálamo e hipotálamo, giro dentado, estriado, sustancia nigra, cerebelo, bulbo raquídeo y motoneuronas espinales, y núcleos sensoriales del bulbo raquídeo (Yan et al., 1997; Drake et al., 1999). El ARNm del receptor TrkB se ha detectado en las mismas regiones descritas para su proteína, especialmente en la corteza cerebral, en el hipocampo y en el hipotálamo, donde la expresión

está regulada por el desarrollo (Fryer et al., 1996). En el hipocampo, se ha observado en las capas piramidales de las regiones CA1-CA4, en la capa granular del giro dentado, en los cuerpos celulares y en las dendritas de las neuronas granulares (Yan et al., 1997). Se ha demostrado la coexpresión de BDNF y de sus receptores en neuronas individuales del hipocampo y de la corteza cerebral (Kokaia et al., 1994), lo que sugiere que el BDNF puede actuar por mecanismos autocrinos/paracrinos en el SNC.

BDNF también se une al receptor no selectivo de neurotrofinas de baja afinidad P75^{NTR}, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (Bothwell, 1996; Kaplan y Miller, 2000). El receptor P75^{NTR} carece de actividad catalítica intrínseca y transmite la señal mediante una serie de interacciones proteína-proteína mediadas por sus dominios intracelulares próximos a la membrana y dominios muertos (Lee et al., 2001; Hempstead, 2002). La activación del receptor P75^{NTR} puede causar apoptosis en una variedad de sistemas (Barrett, 2000). Cuando se coexpresa con el receptor Trk apropiado, el P75^{NTR} aumenta la afinidad de unión de la neurotrofina y puede contribuir a la discriminación del ligando de los diferentes miembros de la familia de los receptores Trk contribuyendo a los efectos biológicos clásicos de las neurotrofinas (Bibel et al., 1999; Hempstead, 2002).

7.2.3.- BDNF y envejecimiento cerebral

La expresión de BDNF y del receptor TrkB en ratas viejas varía dependiendo de la cepa de rata y de la técnica de cuantificación utilizada. Así, en función de la especie, el área estudiada y la técnica de cuantificación, se han descrito tres posibles escenarios: un aumento (Kato-Semba et al., 1998), una disminución (Narisawa-Saito y Nawa, 1996; Hayashi et al., 1997; Croll et al., 1998; Murer et al., 2001; Hattiangady et al., 2005; Silhol et al., 2005) o no cambio (Croll et al., 1998; Kato-Semba et al., 1998; Webster et al., 2002; Bimonte et al., 2003) de los niveles de BDNF en el cerebro en el envejecimiento.

Algunas de las alteraciones que ocurren en el envejecimiento como la disminución de la plasticidad neuronal (Burke y Barnes, 2006) y las alteraciones en LTP (Pang y Lu, 2004; Rex et al., 2005) con la consecuente alteración del aprendizaje espacial, pueden estar asociados con una disminución de BDNF o alteraciones en sus mecanismos de transducción de señales (Gooney et al., 2004). De hecho, la inducción de LTP en el giro dentado por BDNF está disminuida en el envejecimiento debido probablemente a alteraciones en la función del receptor. Rex et al. (2006) observaron que los cambios en la plasticidad neuronal podían ser revertidos por la inducción de BDNF endógeno mediante ampakina. Los cambios asociados al envejecimiento en la plasticidad hipocampal y en la zona subventricular también se revierten por manipulaciones ambientales (Mora et al., 2007) que aumentan la expresión del BDNF.

La administración de BDNF normaliza el contenido de diversos péptidos en la corteza cerebral y en el hipocampo de ratas viejas (Croll et al., 1999). El BDNF también es necesario para el mantenimiento de las inervaciones noradrenérgicas (Matsunaga et al., 2004) y serotoninérgicas (Luellen et al., 2007) en el cerebro de la rata vieja.

En ancianos, varios estudios han descrito cambios en las moléculas implicadas en plasticidad tanto a nivel central como periférico. Se ha observado que los niveles plasmáticos del BDNF están disminuidos significativamente en sujetos viejos (Lommatzsch et al., 2005)

existiendo una correlación negativa entre los niveles de BDNF circulante y la edad en ancianos sanos (Ziegenhorn et al., 2007). También se ha relacionado la disminución de la expresión del ARNm de BDNF en el envejecimiento (Schaaf et al., 2001) con la pérdida de sinapsis en el giro dentado (Geinisman et al., 1992) y con las alteraciones de la memoria espacial (Geinisman et al., 1986). Por otro lado, dado que BDNF (Schuman, 1999) y el ARNm del receptor TrkB (Tongiorgi et al., 1997) se localizan dentro de las espinas dendríticas, y éstas están significativamente reducidas en individuos viejos (Hof y Morrison, 2004), se ha sugerido que existe una clara relación entre la expresión del ARNm de BDNF y del receptor TrkB con las alteraciones de las conexiones sinápticas en el envejecimiento.

7.2.4.- BDNF y mielinización

Numerosas evidencias sugieren la implicación de BDNF en la mielinización del SNP y del SNC.

Estudios *in vitro* han demostrado que las células del linaje oligodendroglial expresan los receptores de BDNF, el P75^{NTR} además del receptor completo y las isoformas truncadas del receptor TrkB (Cohen et al., 1996; Du et al., 2003). BDNF tiene un efecto diferencial en la supervivencia, proliferación o maduración de los oligodendrocitos dependiendo de la región del cerebro de la que procedan. Así, mientras que BDNF estimula la supervivencia de los oligodendrocitos del prosencéfalo basal (Van't Veer et al., 2009) no afecta a los oligodendrocitos procedentes del nervio óptico (Barres et al., 1993) ni de la corteza cerebral (Du et al., 2003). Se ha sugerido que BDNF participa en la diferenciación de los oligodendrocitos del prosencéfalo basal a través del receptor TrkB completo y de la vía de la MAPK estimulando la síntesis del ADN e incrementando la expresión de la MAG, MBP y PLP por los oligodendrocitos (Du, Fischer, et al., 2006; Du, Lercher, et al., 2006; Van't Veer et al., 2009).

Algunos estudios *in vitro* sugieren una doble acción de BDNF en la mielinización del SNP. Así, se ha demostrado que BDNF tiene una acción remielinizante a través del receptor P75^{NTR} y una acción inhibitoria de la mielinización mediada por el receptor TrkB (Xiao et al., 2009).

Numerosos estudios avalan el papel de BDNF en el desarrollo de los oligodendrocitos *in vivo*. En ratones BDNF ^{-/-}, cuya supervivencia postnatal es muy baja, algunos alcanzan 3 semanas, se ha observado una disminución en el número de axones mielinizados en el nervio óptico, de los niveles del ARNm de la PLP y de la MBP en la corteza cerebral e hipocampo postnatal (Cellerino et al., 1997) y bajos niveles de la MBP en el hipocampo y en los núcleos del rafe (Djalali et al., 2005). La inyección de BDNF i.c.v. en los días P10 y P12 aumenta el ARNm de la PLP en el hipocampo en el día P14 (Cellerino et al., 1997). Los ratones BDNF^{+/-} presentan un retraso en la mielinización de la médula espinal y del nervio óptico durante el desarrollo (Xiao et al., 2010) y una disminución de los progenitores NG2 y de proteínas de la mielina en el prosencéfalo basal a lo largo del desarrollo y en la edad adulta (Vondran et al., 2010).

Chan et al. (2001) demostraron que la inyección a crías de rata de BDNF en la proximidad del nervio ciático durante su mielinización, no solo estimula la expresión de

proteínas de mielina en el nervio ciático sino que también aumenta el número de axones mielinizados y el grosor de la vaina de mielina. En ratones transgénicos con sobreexpresión del gen de BDNF se acelera la formación de mielina durante el desarrollo, y aunque no se altera el número de axones mielinizados, las vainas de mielina son más gruesas, incrementándose el diámetro axonal (Tolwani et al., 2004).

En ratones con una delección del receptor TrkB en el prosencéfalo, los niveles de MBP y el número de axones mielinizados en el cuerpo caloso y en el hipocampo están reducidos (Medina et al., 2004), sugiriendo que la señalización del receptor TrkB está implicada en el desarrollo de los oligodendrocitos y en la mielinización.

Existen numerosas evidencias sobre el papel de BDNF en la regeneración de los nervios periféricos tras sufrir una lesión. Se ha observado un aumento post-lesión de la expresión del ARNm de BDNF en el nervio ciático que se mantiene durante varias semanas (Meyer et al., 1992; Funakoshi et al., 1993; Zhang et al., 2000). Además, tras la lesión del nervio ciático se produce una expresión diferencial de BDNF en diferentes subpoblaciones de neuronas sensoriales de la raíz de los ganglios dorsales de la médula espinal (Zhou, 1999) y en las células de Schwann de los nervios lesionados se incrementa la producción de BDNF (Meyer et al., 1992; Funakoshi et al., 1993). La presencia de BDNF en el lugar de la lesión podría favorecer la regeneración del nervio a través de mecanismos paracrinos y autocrinos. La inhibición de BDNF endógeno produce una dramática reducción en el número y en la elongación de axones mielinizados (Zhang et al., 2000).

Se ha observado también un aumento de la expresión del receptor TrkB en neuronas sensoriales y motoras después de la lesión del nervio (Foster et al., 1994; Piehl et al., 1994) y su co-localización con BDNF en neuronas sensoriales lesionadas (Michael et al., 1999). Sin embargo, es improbable que el BDNF actúe a través de la vía del receptor TrkB dado que las células de Schwann únicamente expresan formas truncadas del receptor TrkB y su expresión disminuye tras la lesión nerviosa (Funakoshi et al., 1993). Lo más probable es que el BDNF actúe directamente sobre las células de Schwann uniéndose al receptor P75^{NTR} que aumenta después de la lesión del nervio (Taniuchi et al., 1986, 1988; Gai et al., 1996).

7.2.5.- BDNF e inflamación

Existen cada vez más evidencias de que el sistema inmune contribuye al desarrollo y a la plasticidad neuronal (Vitkovic et al., 2000; Boulanger, 2009; Carpentier y Palmer, 2009). Aunque se ha demostrado que las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α liberadas por las células gliales regulan el desarrollo y la plasticidad de los circuitos neuronales (Deverman y Patterson, 2009), especialmente las vías nociceptivas (Schäfers y Sorkin, 2008; McMahon y Malcangio, 2009; Ren y Torres, 2009), los mecanismos responsables de estos efectos no están esclarecidos. Dado que BDNF es un importante mediador de la plasticidad sináptica (Huang y Reichardt, 2001; Poo, 2001; Cohen y Greenberg, 2008) y de la señalización nociceptiva (Pezet et al., 2002; Malcangio y Lessmann, 2003; Merighi et al., 2008; Latremoliere y Woolf, 2009), se ha postulado la existencia de una relación bidireccional entre neuroinflamación y BDNF.

Estudios previos en roedores han demostrado que la inflamación estimula la expresión de BDNF en neuronas primarias sensoriales (Cho, Kim, Park, et al., 1997; Cho, Kim, Zhou, et al., 1997; Kim et al., 2001; Obata et al., 2003; Qiao et al., 2008; Tarsa et al., 2010). BDNF y su receptor TrkB también se expresan en macrófagos (Artico et al., 2008) y mediante mecanismos autocrinos y paracrinos modulan la regeneración y la angiogénesis tras una lesión nerviosa (Kermani y Hempstead, 2007). Además, datos recientes sugieren que el pro-BDNF es un factor supresor de la migración e infiltración de los macrófagos y puede jugar un papel protector tras una lesión medular (Wong et al., 2010).

Sin embargo, la información sobre los efectos de las citoquinas en la expresión de BDNF es escasa. En neuronas hipotalámicas *in vitro*, el TNF- α y la IL-1 β aumentan la expresión del ARNm de BDNF (Rage et al., 2006; Taishi et al., 2008). Balkowiec-Iskra et al. (2011) han demostrado en neuronas del ganglio trigémino *in vitro* que el TNF- α induce la expresión del ARNm de BDNF y de su proteína mediante la estimulación de la fosforilación de CREB, factor esencial en la regulación de la transcripción de BDNF (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998; West et al., 2001). La infusión intratecal de IL-6 en los ganglios de la raíz dorsal induce la expresión del ARNm de BDNF (Murphy et al., 2000).

A su vez, diversos estudios han puesto en evidencia el papel neuroprotector de BDNF en los procesos neuroinflamatorios. BDNF promueve la proliferación celular, estimula la actividad fagocítica e inhibe la apoptosis microglial en el cerebro (Zhang et al., 2003). En un modelo animal de esclerosis múltiple el BDNF disminuye la expresión de TNF- α y estimula la expresión de IL-10 (Makar et al., 2009). Se ha sugerido que BDNF afecta a la neuroinflamación *in vivo*: la suplementación local de BDNF mediante un vector viral en el hipocampo lesionado de ratas epilépticas atenúa varios parámetros de inflamación, incluida la astrocitosis, la microcitosis y la expresión de la IL-1 β , siendo el efecto más prominente sobre la IL-1 β , cuya expresión es casi completamente inhibida (Bovolenta et al., 2010)

En ratas con infarto cerebral el BDNF de la lesión isquémica, estimula la presencia de células microgliales reactivas y fagocíticas durante las primeras horas de la lesión, disminuye el contenido de TNF- α y la expresión del ARNm del TNF- α cerebral y aumenta el contenido y la expresión local de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Jiang et al., 2010).

7.2.6.- BDNF e hipófisis

Además de su expresión en el SNC el BDNF se expresa en la hipófisis (Kononen et al., 1994; Conner et al., 1996; Givalois et al., 2001; Tapia-Arancibia et al., 2004). Mediante inmunohistoquímica Conner et al. (1996) demostraron una intensa expresión de la proteína de BDNF en el lóbulo intermedio de la hipófisis y una expresión dispersa en las células del lóbulo anterior. Existe una expresión relativamente alta del ARNm del receptor TrkB en estas mismas áreas hipofisarias (Kononen et al., 1994; Silhol et al., 2005). El BDNF puede funcionar como un mensajero intracelular participando en la regulación de algunas funciones hipofisarias. De hecho, algunos autores han demostrado en ratas que en el lóbulo anterior de la hipófisis el ARNm y la proteína de BDNF y el ARNm del receptor TrkB son rápidamente modificados por estímulos fisiológicos (Smith et al., 1995; Givalois et al., 2001).

La hipófisis constituye la unión entre el SNC y la periferia dado que secreta hormonas a la circulación periférica en respuesta a señales procedentes del SNC. La hipófisis juega un papel fundamental en la respuesta endocrina que depende de la edad como los dramáticos cambios que ocurren en la pubertad y en el envejecimiento (Bernardis y Davis, 1996; Lamberts et al., 1997). A pesar de que la función hipofisaria está controlada fundamentalmente por mediadores hipotalámicos, se ha sugerido que los cambios hipofisarios que ocurren en el envejecimiento pueden estar relacionados con alteraciones en la expresión local de factores reguladores intrínsecos (Schwartz, 2000) presentes en la hipófisis como las neurotrofinas y/o sus receptores.

La información disponible sobre el efecto del envejecimiento en la expresión del BDNF en la hipófisis es contradictoria. En los estudios de Kononen et al. (1994; 1995) en ratas se observó que mientras que los niveles del ARNm de BDNF no se modificaban con la edad, los del ARNm del receptor TrkB disminuían. Rago et al. (2007) demostraron un aumento en los niveles de expresión del ARNm de BDNF hipofisario. Este aumento de la expresión del ARNm de BDNF no se traduce en un aumento de la expresión de la proteína, sugiriendo, por tanto, alteraciones en la regulación de la traducción de proteínas en el envejecimiento. En el mismo estudio, se observó una disminución de la expresión del receptor TrkB.

Objetivos

En el presente trabajo se ha planteado estudiar la relación entre el declinar del eje GH/IGF-I y ciertas alteraciones cerebrales que tienen lugar durante el envejecimiento, y su posible reversibilidad tras la activación del eje GH/IGF-I mediante la administración de GH o GHRP-6. Para ello se han planteado los siguientes objetivos:

1.- Estudiar el sistema GH/IGF-I en el envejecimiento.

1.1.- Confirmar las alteraciones hipofisarias que ocurren en el sistema GH/IGF-I durante el envejecimiento y su posible reversión tras el tratamiento con GH o GHRP-6.

1.2.- Estudiar las alteraciones del sistema GH/IGF-I en el cerebro durante el envejecimiento y su posible reversión tras el tratamiento con GH o GHRP-6.

2.- Estudiar la influencia de GH sobre el proceso de mielinogénesis durante el desarrollo embrionario y en el envejecimiento utilizando dos modelos experimentales, *in vitro* e *in vivo*.

2.1.- En los estudios *in vitro* en cultivos de células cerebrocorticales se ha planteado:

- Estudiar la acción de GH sobre el desarrollo de las células oligodendrogliales.
- Identificar las vías de señalización intracelular activadas por GH en el cultivo y determinar cuáles de estas vías están implicadas en las acciones de GH sobre el proceso de oligodendrogénesis.

2.2.- En los estudios *in vivo* en ratas viejas se ha planteado:

- Analizar las alteraciones en la mielinización del SNC en el envejecimiento e investigar el efecto del tratamiento con GH.
- Determinar el papel del IGF-I en la mediación de los efectos de GH sobre la remielinización del cerebro de la rata vieja.

3.- Estudiar la influencia del GHRP-6 sobre el proceso de mielinogénesis durante el desarrollo embrionario y en el envejecimiento, utilizando dos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

3.1.- En los estudios *in vitro* en cultivos de células cerebrocorticales se ha planteado estudiar la acción del GHRP-6 sobre la diferenciación de las células oligodendrogliales.

3.2.- En los estudios *in vivo* en ratas viejas se ha planteado investigar el efecto del tratamiento con GHRP-6 en el proceso de remielinización en el envejecimiento y determinar el papel del IGF-I en los efectos del GHRP-6 sobre la remielinización.

4.- Estudiar las posibles alteraciones de la expresión de BDNF cerebral e hipofisario en el envejecimiento e investigar su regulación por GH o GHRP-6.

5.- Analizar el patrón inflamatorio del cerebro y de la hipófisis en el envejecimiento y explorar el efecto del tratamiento con GH o GHRP-6.

6.- Analizar el efecto de GH y GHRP-6 sobre la alteración de la memoria en el envejecimiento.

7.- Investigar la interrelación entre el sistema GH/IGF-I y VIP en el cerebro.

7.1.- Estudiar el efecto de GH en las alteraciones de VIP en el envejecimiento.

7.2.- Estudiar la influencia de VIP sobre el proceso de mielinogénesis durante el desarrollo embrionario y el envejecimiento utilizando dos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

- En los estudios *in vitro* en cultivos de células cerebrocorticales embrionarias se ha planteado estudiar la acción de VIP sobre el desarrollo de las células oligodendrogiales y las vías de señalización implicadas en el efecto de VIP.
- En los estudios *in vivo* en ratas viejas se ha planteado investigar el efecto del tratamiento con VIP en el proceso de remielinización en el envejecimiento y determinar el papel de BDNF e IGF-I como posibles mediadores de los efectos de VIP sobre la remielinización.

8.- Investigar el efecto de VIP en las alteraciones inflamatorias cerebrales en el envejecimiento y analizar la posible participación de BDNF e IGF-I en dicho efecto.

Material y Métodos

1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1.- Estudios *in vitro*

Todos los estudios *in vitro* se han realizado en células cerebrocorticales de embriones de rata Sprague-Dawley de 17 días de edad embrionaria. Las madres procedían del criadero del Hospital Ramón y Cajal.

1.2.- Estudios *in vivo*

Para los estudios *in vivo* se han empleado ratas macho de la cepa Wistar adultas de 3 meses y viejas de 24, 28 y 29 meses de edad. Los animales fueron suministrados por diferentes criaderos (Charles River Laboratorios España, S.A., Santa Perpetua de Mogoda, España; Janvier Laboratories, Le Genet-St-Isle, Francia). En algunos experimentos las ratas viejas se adquirieron a las 3 semanas de edad y se envejecieron en nuestro animalario. En otras ocasiones se adquirieron ratas ya envejecidas que permanecieron en nuestro criadero entre 7 y 10 días antes de su utilización. Las ratas adultas se compraron en el momento de realizar los experimentos y permanecieron en nuestro criadero entre 2 y 7 días antes de iniciar los experimentos. Hasta su utilización las ratas se mantuvieron en grupos de dos animales por jaula (ratas viejas) o de 4-5 animales por jaula (ratas adultas) con agua y comida *ad libitum* y bajo condiciones controladas de luz (ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), temperatura (22 ± 2 C°) y humedad ($48\pm 2\%$). El mantenimiento y manipulación de los animales se realizó de acuerdo con las recomendaciones para la protección de animales utilizados en investigación, descritas en el Real Decreto 223/1988 de 14 de Marzo y Orden 13 de Octubre de 1989.

2.- DISEÑOS EXPERIMENTALES

2.1.- ESTUDIOS *IN VITRO*: estudio del proceso de oligodendrogénesis *in vitro*

2.1.1.- Estudio del efecto de GH sobre la oligodendrogénesis *in vitro*

En los experimentos que se describen a continuación se empleó GH recombinante humana (Genotorm®, Pharmacia, Sant Cugat del Vallés, España). Antes de su uso la hormona fue reconstituida según las instrucciones del fabricante y conservada a 4°C durante un máximo de 15 días. Este estudio se llevó a cabo en células cerebrocorticales embrionarias, sembradas en cubreobjetos, mediante el análisis de la expresión de las proteínas O4 y MBP por la técnica de inmunocitoquímica. Transcurridas las primeras 6 horas de cultivo en medio completo, las células se incubaron en medio definido con FGFb (25 ng/ml) (PeproTech, Londres, Reino Unido) durante 7 y 8 días para los experimentos de O4 y MBP respectivamente. Finalmente se expusieron a GH (50 ng/ml) en medio definido sin FGFb durante 4 días. Los controles recibieron sólo el medio. Concluido este periodo las células se procesaron para la determinación de O4 y MBP por inmunocitoquímica.

2.1.2.- Estudio de las vías de señalización implicadas en la inducción de O4 y MBP por GH

Para la identificación de las vías de señalización que median o modulan el efecto de GH sobre O4 y MBP se efectuaron dos tipos de experimentos:

- 1) Experimentos destinados al estudio del efecto de GH sobre la activación de quinasas y factores de transcripción.
- 2) Experimentos destinados al estudio del efecto ejercido por el bloqueo de distintas rutas de señalización sobre la inducción de O4 y MBP por GH.

2.1.2.1.- Experimentos destinados al estudio del efecto de GH sobre la activación de las vías MAPK y PI3K y el factor de transcripción CREB

Este estudio se llevó a cabo en células cerebrocorticales sembradas en placas Petri de 35 mm de diámetro (Sarstedt Int., Newton, NC, USA). Transcurridas las primeras 6 horas en medio completo, las células se incubaron en medio definido con FGFb (25 ng/ml) durante 8 días. Finalmente se expusieron a GH (50 ng/ml) en medio definido sin FGFb durante 5, 10, 30 y 60 minutos. Las células se procesaron para la determinación de las formas fosforiladas de ERK 1/2, Akt y CREB por Western immunoblot.

2.1.2.2.- Experimentos destinados al estudio del efecto ejercido por el bloqueo de distintas rutas de señalización sobre la inducción de O4 y MBP por GH. Efecto de los inhibidores LY294002 y PD098059

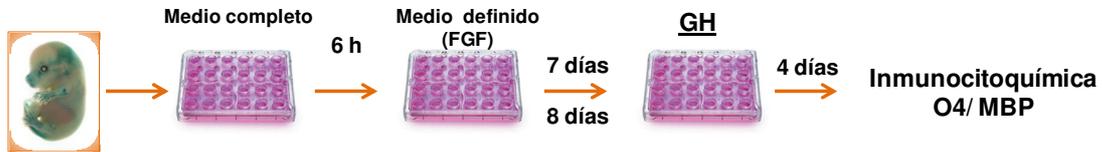
Este estudio se llevó a cabo en células sembradas en cubreobjetos mediante el análisis de la expresión de las proteínas O4 y MBP por inmunocitoquímica. Se siguió el mismo procedimiento de incubación descrito en el apartado anterior. Antes de la adición de GH las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores LY294002 (Alexis Corp., San Diego, CA, USA) a una dosis de 2.5 μ M o PD098059 (Alexis Corp.) a una dosis de 15 μ M y se mantuvieron en estas condiciones durante 4 días. Los grupos controles recibieron únicamente los inhibidores correspondientes. Finalizado el experimento las células se procesaron para la determinación de O4 y MBP por inmunocitoquímica.

2.1.3.- Estudio del efecto de GHRP-6 sobre la inducción de MBP *in vitro*.

En los experimentos que se describen a continuación se utilizó el péptido sintético liberador de GH, GHRP-6 (Bachem AG, Bubendorf, Suiza). Antes de su uso, el GHRP-6 fue reconstituido en agua destilada estéril y conservado a -20°C hasta su utilización. Este estudio se llevó a cabo en las mismas condiciones experimentales que el estudio de GH. Las células se incubaron con distintas dosis de GHRP-6 (10^{-5} M a 10^{-9} M) durante 4 días. El análisis de la expresión de MBP se realizó por inmunocitoquímica.

Estudios *in vitro* I: Efecto de GH en la oligodendrogénesis.

1. Efecto de GH sobre oligodendrogénesis *in vitro*



2. Efecto de GH sobre la activación de MAPK, PI3K y CREB



3. Efecto de los inhibidores LY y PD en la inducción de O4 y MBP por GH

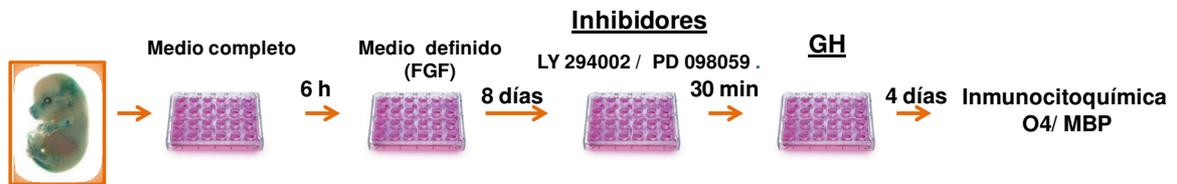


Figura 1. Estudios *in vitro* I: estudio del efecto de GH en la oligodendrogénesis y en las vías de señalización implicadas en la inducción de O4 y MBP. En todos los experimentos se utilizaron cerebros de embriones de rata de E17. Según el experimento las células se trataron con GH (50 ng/ml) y/o con los inhibidores LY294002 y PD098059. Posteriormente se analizó la inducción de O4 y MBP por inmunocitoquímica y la activación de ERK, Akt y CREB por Western inmunoblot.

Estudio *in vitro* II: Efecto de GHRP-6 en la oligodendrogénesis

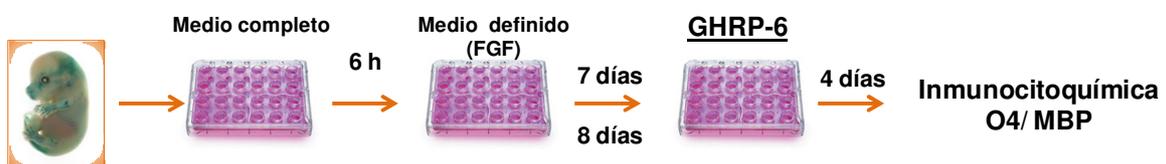


Figura 2. Estudio *in vitro* II: estudio del efecto de GHRP-6 en la oligodendrogénesis. Tras el tratamiento con GHRP-6 (10^{-6} M a 10^{-9} M) se analizó la expresión de O4 y MBP por inmunocitoquímica en células de cerebro de embriones de rata de E17.

2.1.4.- Estudio del efecto de VIP sobre la oligodendrogénesis *in vitro*

En los experimentos que se describen a continuación se utilizó VIP sintético (Neo MPS, Polypeptide Laboratories, Estrasburgo, Francia). Antes de su uso VIP fue reconstituido en agua, alicuotado y conservado a -20°C . Este estudio se llevó a cabo en células cerebrocorticales de embriones de rata de E17 sembradas en cubreobjetos mediante el análisis de la expresión de las proteínas O4 y MBP por inmunocitoquímica. Después de 6 horas en medio completo, las células se incubaron en medio definido con FGFb (25ng/ml) durante 4 días. Finalmente se expusieron a diferentes concentraciones de VIP (10^{-7} M a 10^{-13} M) en medio definido sin FGFb durante 7 u 8 días para la determinación de O4 y MBP respectivamente. Los controles recibieron sólo el medio. Concluido este periodo las células se procesaron para la determinación de O4 y MBP por inmunocitoquímica.

2.1.4.1.- Experimentos destinados al estudio del efecto ejercido por el bloqueo de distintas rutas de señalización sobre la inducción de O4 y MBP. Efecto de los inhibidores LY294002, PD098059 y H89

Para la identificación de las vías de señalización que median o modulan el efecto de VIP sobre O4 y MBP se efectuó un experimento donde se estudió el efecto ejercido por el bloqueo de distintas rutas de señalización sobre la inducción de O4 y MBP por VIP.

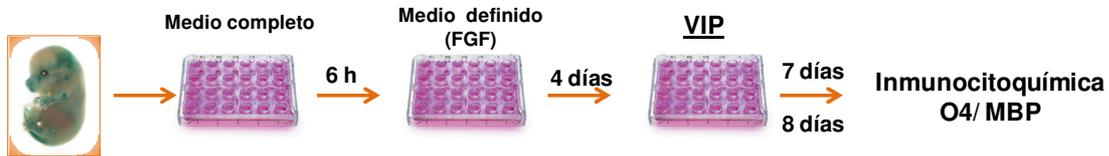
Este estudio se llevó a cabo en células sembradas en cubreobjetos mediante el análisis de la expresión de las proteínas O4 y MBP por inmunocitoquímica. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Antes de la adición de VIP las células se preincubaron durante 30 minutos con los inhibidores: LY294002 (2,5 ,10 y 12 μM), PD098959 (15 y 50 μM) y H89 (Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA) (1, 5 y 20 μM). Los grupos controles recibieron solo los inhibidores.

2.1.4.2.- Experimentos destinados al estudio del efecto de VIP sobre la activación del factor de transcripción CREB

Este estudio se llevó a cabo en células sembradas en placas de Petri (35 mm de diámetro). Transcurridas las primeras 6 horas en medio completo, las células se incubaron en medio definido con FGFb (25 ng/ml) durante 4 días. Finalmente se expusieron a VIP (10^{-11} M) en medio definido sin FGFb durante los tiempos indicados (1, 5, 10, 30 y 60 min). Las células se procesaron para la determinación de la forma fosforilada de CREB por Western inmunoblot.

Estudios *in vitro* III: Efecto de VIP en la oligodendrogénesis

1. Efecto de VIP sobre la oligodendrogénesis *in vitro*



2. Efecto de los inhibidores LY, PD y H89 en la inducción de O4 y MBP por VIP



3. Efecto de VIP sobre la activación de CREB

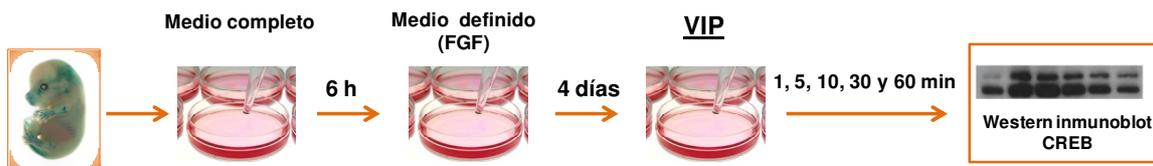


Figura 3. Estudios *in vitro* III: estudio del efecto de VIP en la oligodendrogénesis y de las vías de señalización implicadas en la inducción de O4 y MBP por VIP. En todos los experimentos se utilizaron cerebros de embriones de rata de E17. Según el experimento las células en cultivo se trataron con VIP (10^{-11} M) y/o los inhibidores LY294002, PD098059 y H89. Posteriormente se analizó la inducción de O4 y MBP por inmunocitoquímica y la activación del factor de transcripción CREB por Western immunoblot.

2.2.- ESTUDIOS *IN VIVO*

Para los estudios *in vivo* se utilizaron ratas de diferentes edades: adultas jóvenes de 3 meses y viejas de 24, 28 o 29 meses. En este estudio se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

2.2.1.- Estudio del efecto del tratamiento intracerebroventricular con GH en la expresión de MBP y VIP en el cerebro de rata vieja

Este experimento fue diseñado para analizar en el cerebro de ratas viejas la expresión de MBP y de VIP y el efecto del tratamiento con GH en estos parámetros. 7 ratas de 28 meses de edad recibieron una administración crónica intracerebroventricular (i.c.v.) de GH (0.5 μ g/hora) en el ventrículo lateral derecho durante 7 días. Un número idéntico de animales controles adultos y viejos recibió un volumen igual de vehículo. Finalizado el tratamiento, las ratas se sacrificaron por perfusión por vía transcardial. Se extrajeron los cerebros para el

análisis de la expresión de MBP y de VIP por inmunohistoquímica, como se detalla en la Figura 4.

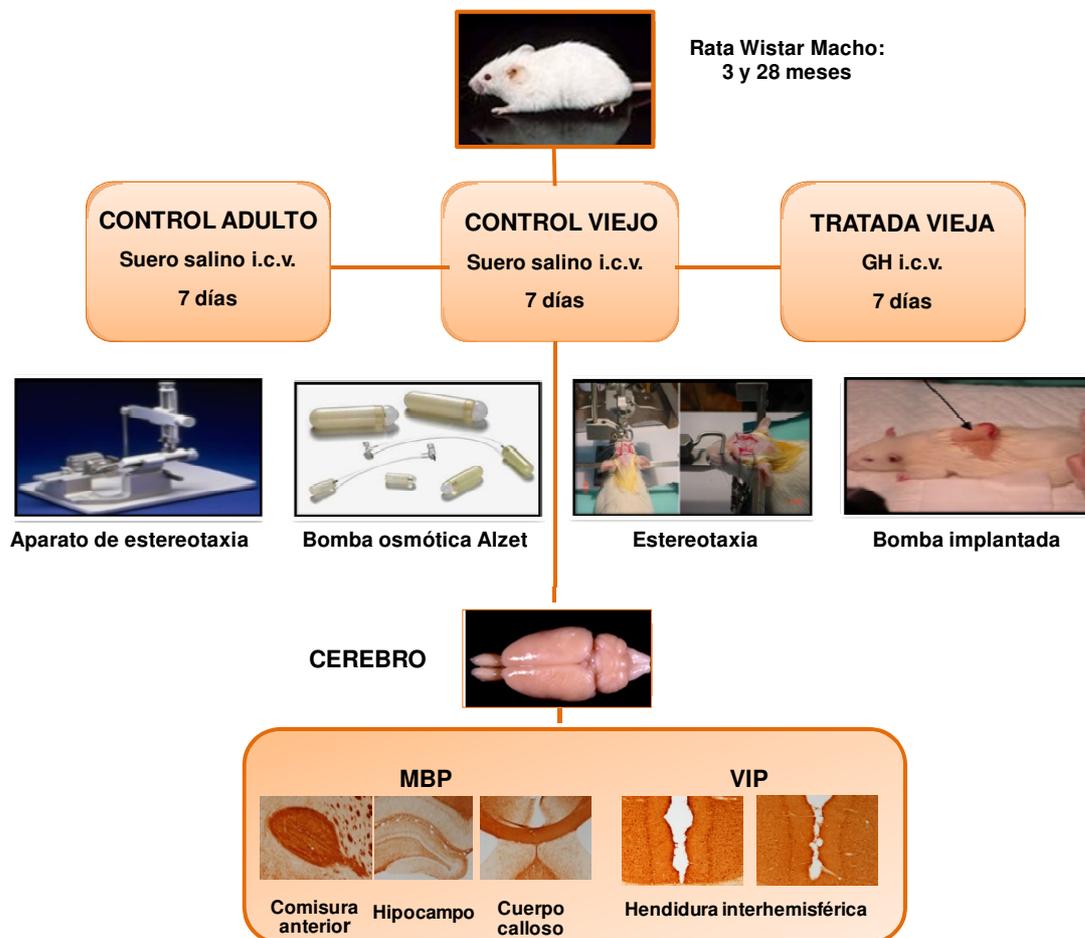


Figura 4: Diseño experimental para el estudio del efecto del tratamiento crónico con GH i.c.v. sobre la expresión de MBP y VIP en cerebro. Transcurrido el tiempo de tratamiento se extrajeron y procesaron los cerebros para analizar la expresión de MBP y VIP mediante inmunohistoquímica.

2.2.2- Estudio del efecto del tratamiento con GH subcutánea en el cerebro de rata vieja

Este experimento se diseñó para analizar el efecto del tratamiento con GH subcutánea en el cerebro de ratas viejas. 7 ratas viejas de 29 meses se trataron con GH subcutánea (s.c.) (150 µg) a las 9.00h y 21.00 h, durante 7 días consecutivos. Los grupos controles de igual número de ratas adultas y de ratas viejas recibieron un volumen igual de suero salino. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extrajo la hipófisis, la corteza cerebral anterior y el hipocampo, para el análisis de MBP y CREB por Western inmunoblot. Los ARNm de los componentes del sistema GH/IGF-I, ghrelina y R-GHS, BDNF, CXCL12 y citoquinas se midieron por RT-PCR a tiempo real. En suero se detectó el IGF-I mediante RIA como se detalla en la Figura 5.

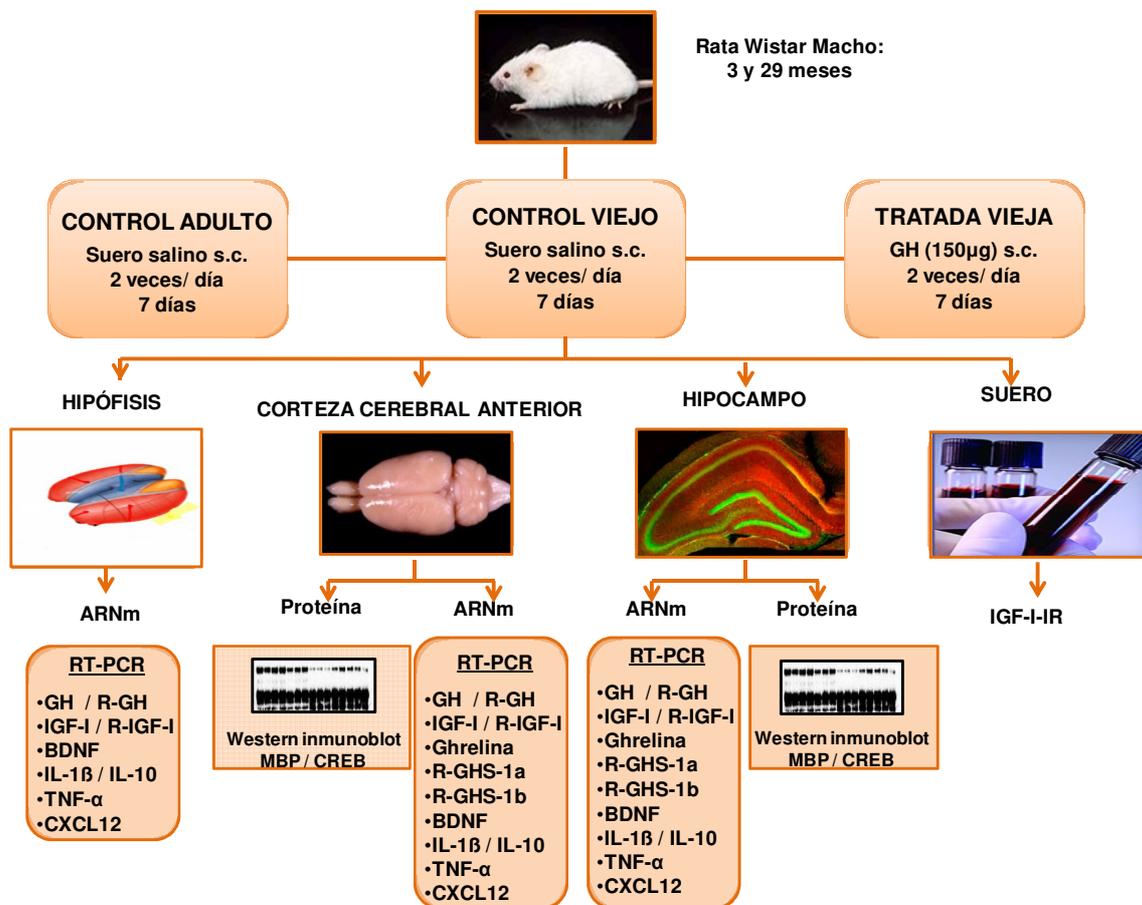


Figura 5: Diseño experimental para el estudio del efecto del tratamiento subcutáneo con GH en el cerebro de rata vieja. Transcurrido el tiempo de tratamiento se procesaron los tejidos para analizar la expresión de MBP y CREB mediante Western inmunoblot y de los componentes del sistema GH/IGF-I, ghrelina y R-GHS, BDNF, CXCL12 y citoquinas por RT-PCR a tiempo real. Se valoró el contenido de IGF-I en suero mediante RIA.

2.2.3.- Estudio *in vivo* del papel del IGF-I en la reversibilidad de la hipomielinización por GH del cerebro de rata vieja

Para estudiar el papel del IGF-I en la remielinización inducida por GH en el cerebro de la rata vieja utilizamos el inhibidor del receptor del IGF-I, JB-1 (Bachem). Se trató un grupo de 6 ratas viejas de 24 meses con JB-1 s.c. De este grupo, 3 ratas se trataron con una dosis de 10 µg de JB-1 y otras 3 con 30 µg de JB-1. JB-1 se inyectó 30 minutos antes que GH (150 µg) subcutánea. Como grupos controles utilizamos ratas viejas a las que únicamente se les inyectó GH y ratas viejas y jóvenes a las que se les inyectó suero salino. El tratamiento se realizó dos veces al día, inyectándoles a las 9.00 h y 21.00 h durante 7 días. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por perfusión por vía transcardial. Se extrajeron los cerebros y se procesaron para el análisis de la expresión de MBP por inmunohistoquímica como se detalla en la Figura 6.

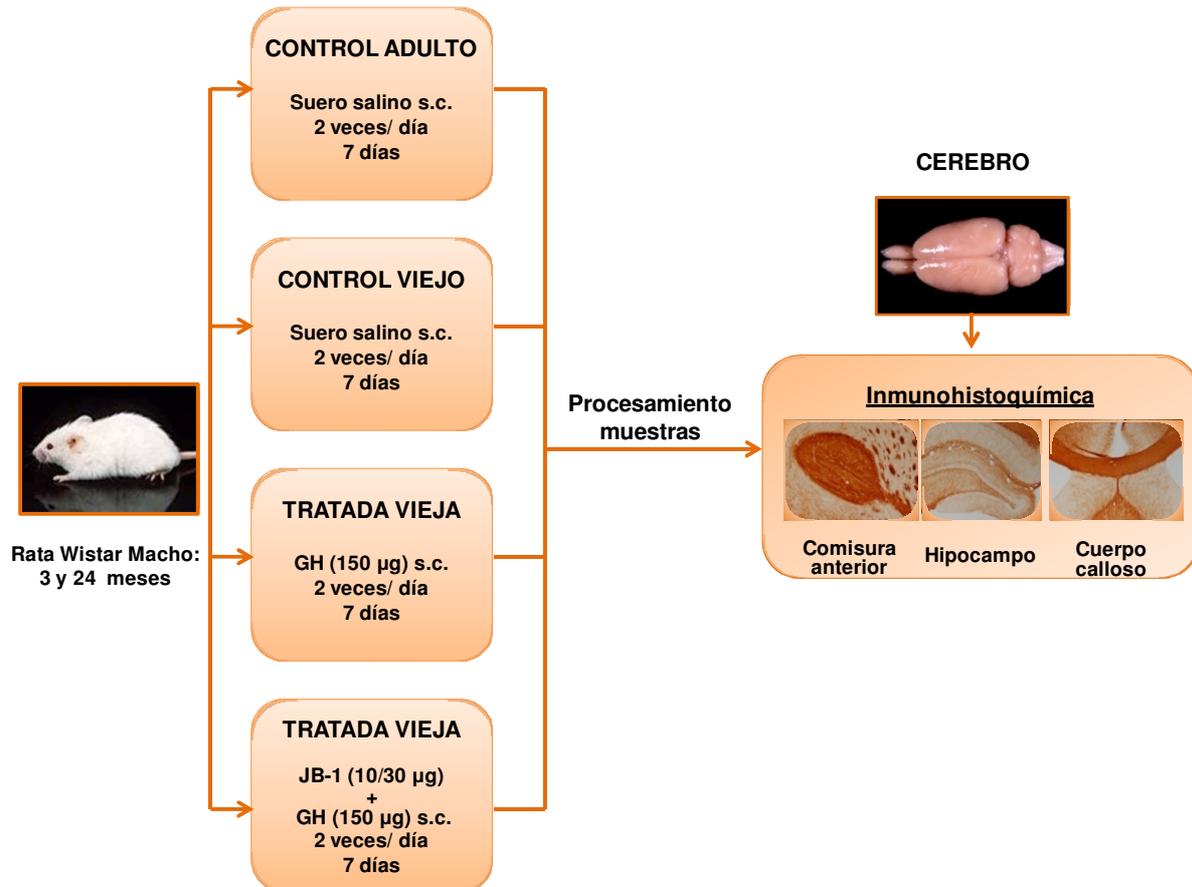


Figura 6: Diseño experimental para el estudio del papel del IGF-1 en el efecto de GH sobre la remielinización del cerebro de rata vieja. Se trataron dos grupos de ratas viejas con GH 30 minutos después de la administración de JB-1 (10µg y 30µg). Como grupos controles se utilizó un grupo de ratas viejas tratadas con GH y ratas viejas y adultas tratadas con suero salino. Se analizó la expresión de MBP por inmunohistoquímica en diferentes áreas cerebrales.

2.2.4.- Estudio del efecto del tratamiento subcutáneo con GHRP-6 en el cerebro de rata vieja

2.2.4.1.- Efecto de GHRP-6 en la expresión de MBP en el cerebro de rata vieja analizada por inmunohistoquímica

En este experimento nos propusimos analizar la expresión de MBP y el efecto del tratamiento con GHRP-6 en este parámetro en el cerebro de ratas viejas. 7 ratas viejas de 24 meses se trataron subcutáneamente con GHRP-6 (20 µg/kg de peso) a las 9.00 h y 16.00 h, durante 15 días consecutivos. Los grupos controles de 7 ratas adultas y 7 ratas viejas recibieron un volumen igual de suero salino. Después del tratamiento, las ratas de cada grupo fueron sacrificadas por perfusión por vía transcardial. Se extrajeron los cerebros para el análisis de la expresión de MBP mediante inmunohistoquímica como se detalla en la Figura 7.

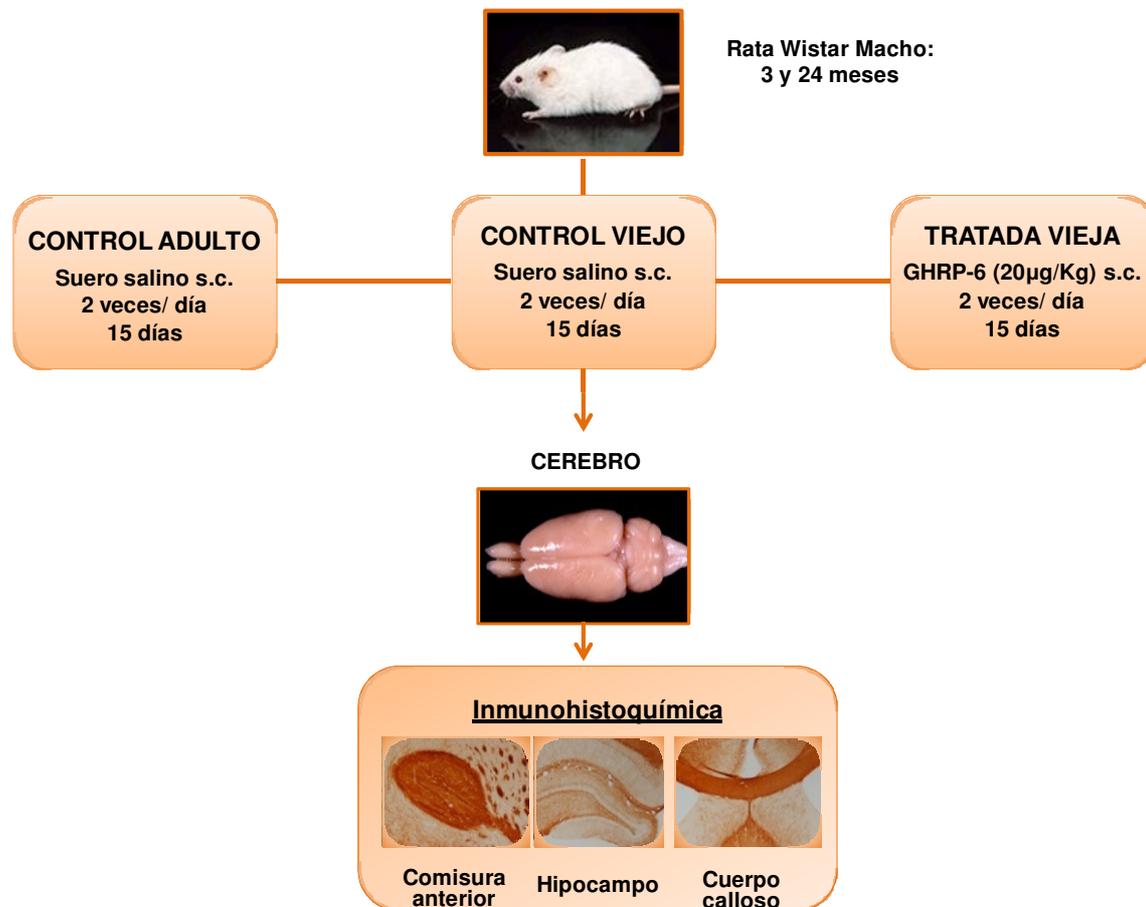


Figura 7: Diseño experimental para el estudio del efecto del tratamiento subcutáneo con GHRP-6 sobre la expresión de MBP en el cerebro. Transcurrido el tiempo de tratamiento se extrajeron y procesaron los cerebros para analizar la expresión de MBP mediante inmunohistoquímica.

2.2.4.2.- Efecto del tratamiento con GHRP-6 subcutáneo: estudios por Western inmunoblot y por RT-PCR a tiempo real en el cerebro de rata vieja

Este experimento se diseñó para confirmar el efecto del tratamiento con GHRP-6 en la reversibilidad de la hipomielinización del cerebro de ratas viejas mediante el análisis de la expresión de MBP por Western inmunoblot. Además, se analizó la expresión basal y el efecto del tratamiento con GHRP-6 sobre los componentes del sistema GH/IGF-I, ghrelina y R-GHS, BDNF, CXCL12, citoquinas y la activación de CREB en hipófisis, corteza cerebral anterior e hipocampo. 8 ratas viejas de 29 meses se trataron subcutáneamente con GHRP-6 (20 µg/kg de peso) a las 9.00 h y 16.00 h, durante 15 días consecutivos. Los grupos controles de igual número de ratas adultas y de ratas viejas recibieron un volumen similar de suero salino. Después del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se extrajeron la hipófisis, la corteza cerebral anterior y el hipocampo para el análisis de proteínas por Western inmunoblot y del ARNm por RT-PCR a tiempo real como se detalla en la Figura 8.

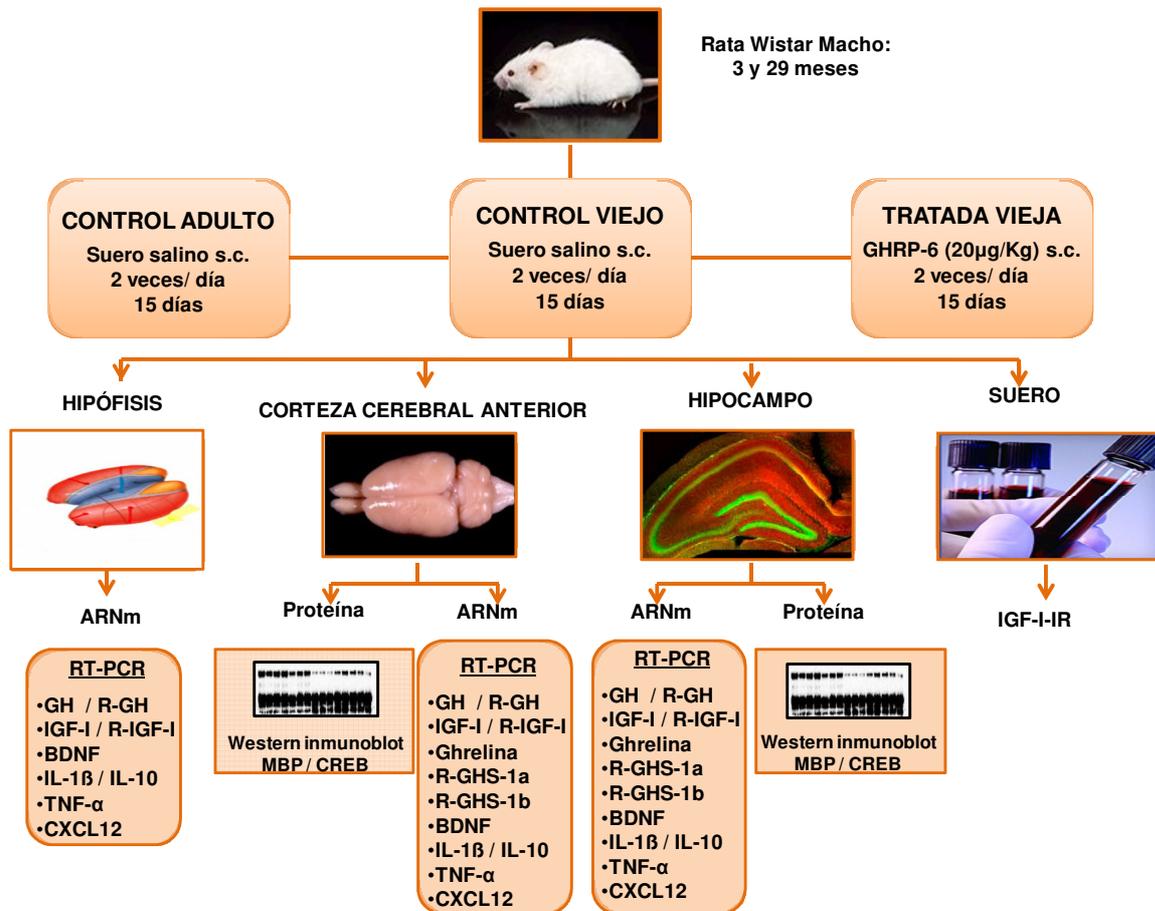


Figura 8: Diseño experimental para el estudio del efecto del tratamiento subcutáneo con GHRP-6 en el cerebro de rata vieja. Después del tratamiento se procesaron los tejidos para analizar la expresión de MBP y CREB mediante Western inmunoblot y de los componentes del sistema GH/IGF-I, ghrelina y R-GHS, BDNF, CXCL12 y citoquinas por RT-PCR a tiempo real. Se valoró el contenido del IGF-I en suero mediante RIA

2.2.5.- Estudio *in vivo* del papel del IGF-I en la reversibilidad de la hipomielinización del cerebro de rata vieja por GHRP-6

Al igual que hicimos con GH, estudiamos el papel del IGF-I en la remielinización inducida por GHRP-6 en el cerebro de las ratas viejas. Se trató a un grupo de 6 ratas viejas de 29 meses de edad con JB-1 subcutáneo. 3 ratas se trataron con una dosis de 10 µg y otras 3 con 30 µg de JB-1 dos veces al día durante 15 días. El JB-1 se inyectó 30 minutos antes que GHRP-6 (20µg/Kg). Como grupos controles utilizamos ratas viejas a las que únicamente se les inyectó GHRP6 y ratas viejas y adultas a las que se les inyectó el mismo volumen de suero salino. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las ratas de cada grupo fueron sacrificadas por perfusión por vía transcardial. Se extrajeron los cerebros y se procesaron para el análisis de la expresión de MBP por inmunohistoquímica en el cerebro como se detalla en la Figura 9.

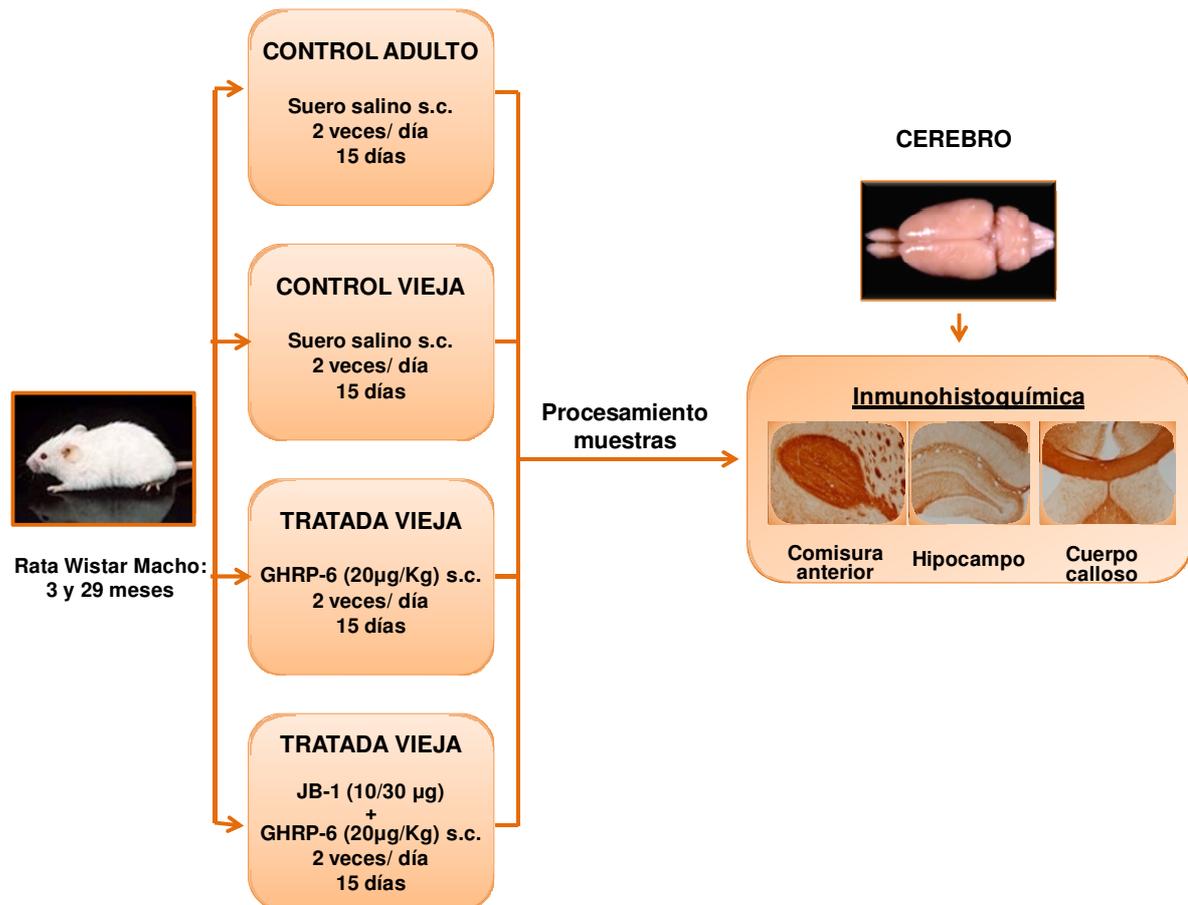


Figura 9: Diseño experimental para el estudio del papel del IGF-I en el efecto de GHRP-6 sobre la remielinización del cerebro de rata vieja. Se trataron dos grupos de ratas viejas con GHRP-6 30 minutos después de la administración de JB-1 (10µg y 30µg). Como grupos controles se utilizaron un grupo de ratas viejas tratadas con GHRP-6 y ratas viejas y adultas tratadas con suero salino. Se analizó la expresión de MBP en diferentes áreas cerebrales por inmunohistoquímica.

2.2.6.- Estudio del efecto de VIP en el cerebro de rata vieja y los mecanismos implicados

2.2.6.1.- Efecto del tratamiento subcutáneo con VIP en el cerebro de rata vieja

Este experimento fue diseñado para estudiar el efecto de VIP sobre el cerebro de ratas viejas. Ratas viejas de 24 meses de edad se trataron con VIP (3 nmol) a las 9.00 h por vía subcutánea en días alternos durante 15 días. Las ratas adultas y viejas controles recibieron un volumen igual de suero salino. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron la corteza cerebral anterior y el hipocampo para el análisis de MBP y CREB por Western immunoblot y los ARNm de los componentes del sistema GH/IGF-I, BDNF, CXCL12 y citoquinas se midieron por RT-PCR a tiempo real como se detalla en la Figura 10.

2.2.6.2.- Estudio *in vivo* del papel de BDNF como mediador de los efectos de VIP sobre el cerebro de rata vieja

Con el fin de estudiar el papel de BDNF en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de rata vieja, previamente a la administración de VIP, bloqueamos la acción de BDNF con inhibidores específicos de sus receptores: K_{252a} y PEP5. 6 ratas viejas se trataron por vía subcutánea con el inhibidor K_{252a} (Biomol, Exeter, Reino Unido): 3 ratas con una dosis 10⁻⁴ M y otras 3 ratas con una dosis de 10⁻⁵ M. Otro grupo de 6 ratas se trató con el inhibidor PEP5 (Calbiochem, Merck, USA): 3 ratas con una dosis de 500 ng y otras 3 ratas con una dosis de 100 ng. 30 minutos después se les inyectó subcutáneamente VIP (3 nmol). Los inhibidores de K_{252a} y PEP5 se reconstituyeron en PBS/10% DMSO. Como grupos controles se utilizaron ratas viejas tratadas exclusivamente con VIP y ratas viejas y adultas tratadas con el mismo volumen de suero salino. El tratamiento se realizó a las 9.00 h en días alternos durante 15 días. Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se sacrificaron las ratas por decapitación. Se extrajeron la corteza cerebral anterior y el hipocampo para su posterior análisis, como se muestra en la Figura 10.

2.2.6.3.- Estudio *in vivo* del papel de IGF-I como mediador de los efectos de VIP sobre el cerebro de rata vieja

Al igual que hicimos con GH y con GHRP-6, estudiamos el papel de IGF-I en los efectos observados en el cerebro de rata vieja tras el tratamiento con VIP. Utilizando el mismo patrón de administración que en experimentos previos, tratamos un grupo de 4 ratas viejas de 24 meses de edad con 15 µg del inhibidor del receptor de IGF-I, JB-1, por vía subcutánea, 30 minutos antes de tratarlas con VIP (3 nmol) a las 9.00 h en días alternos durante 15 días. Como grupos controles utilizamos ratas viejas tratadas con VIP y ratas viejas y adultas a las que se les inyectó suero salino. Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se sacrificaron las ratas por decapitación. Se extrajeron la corteza cerebral anterior y el hipocampo para su posterior análisis, como se muestra en la Figura 10.

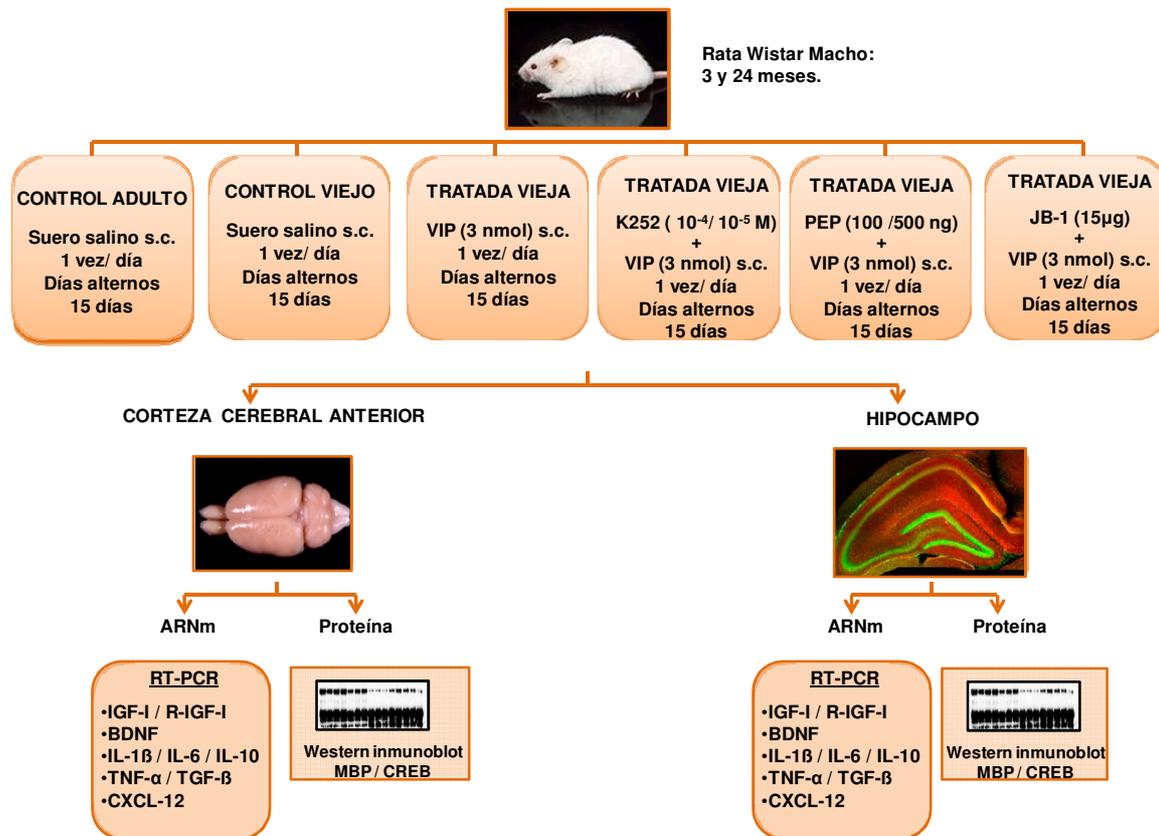


Figura 10: Diseño experimental para el estudio del efecto de VIP sobre el cerebro de rata vieja y los mecanismos implicados. Se trataron ratas de 24 meses con VIP s.c. en días alternos durante 15 días. Se estudió el papel de BDNF en los efectos de VIP bloqueando la acción de BDNF con los inhibidores específicos de sus receptores: K_{252a} y PEP 30 minutos antes del tratamiento con VIP. Para estudiar el papel del IGF-I en los efectos de VIP se bloquearon los receptores de IGF-I mediante la inyección de JB-1 30 minutos antes de la administración de VIP. Como ratas controles se utilizaron ratas adultas y viejas a las que se les inyectó suero salino.

2.2.7.- Efecto del tratamiento con GH y/o GHRP-6 en la capacidad cognitiva de ratas viejas: estudios comportamentales

Se realizó este estudio con el fin de analizar si el tratamiento con GH o GHRP-6 modifican la “alternancia espontánea” en las ratas viejas.

El test de alternancia en laberinto Y es un test de comportamiento para evaluar la capacidad cognitiva de los roedores midiendo su habilidad para explorar nuevos ambientes. Cuando un roedor explora un brazo del laberinto, la siguiente vez opta por explorar un nuevo brazo distinto al que ha visitado previamente, lo que refleja el estado de memoria del animal al recordar el primer brazo al que entró. Esto se llama “alternancia espontánea”. Diversas áreas cerebrales como el hipocampo, septum, prosencéfalo, y corteza prefrontal están implicados en esta habilidad.

Se utilizó un laberinto de plástico opaco en forma de Y con tres brazos formando un ángulo de 120° con cada uno de ellos, construido en nuestro laboratorio. El test se realizó antes

y después del tratamiento con GH o con GHRP-6, para ello se emplearon ratas adultas y ratas viejas de 29 meses de edad.

Para la realización del test, el animal se introduce en el laberinto por uno de los brazos, y se le permite moverse libremente para explorar los tres brazos durante 5 minutos. A lo largo del test, el animal debería mostrar una tendencia a entrar cada vez en un brazo no explorado con anterioridad. Para valorar el test se cuantifica el número de veces que el animal entra en un brazo, así como el número de veces que alterna de brazo para calcular posteriormente el porcentaje de alternancia. Se considera que el animal ha entrado en un brazo cuando están dentro del mismo las cuatro patas.

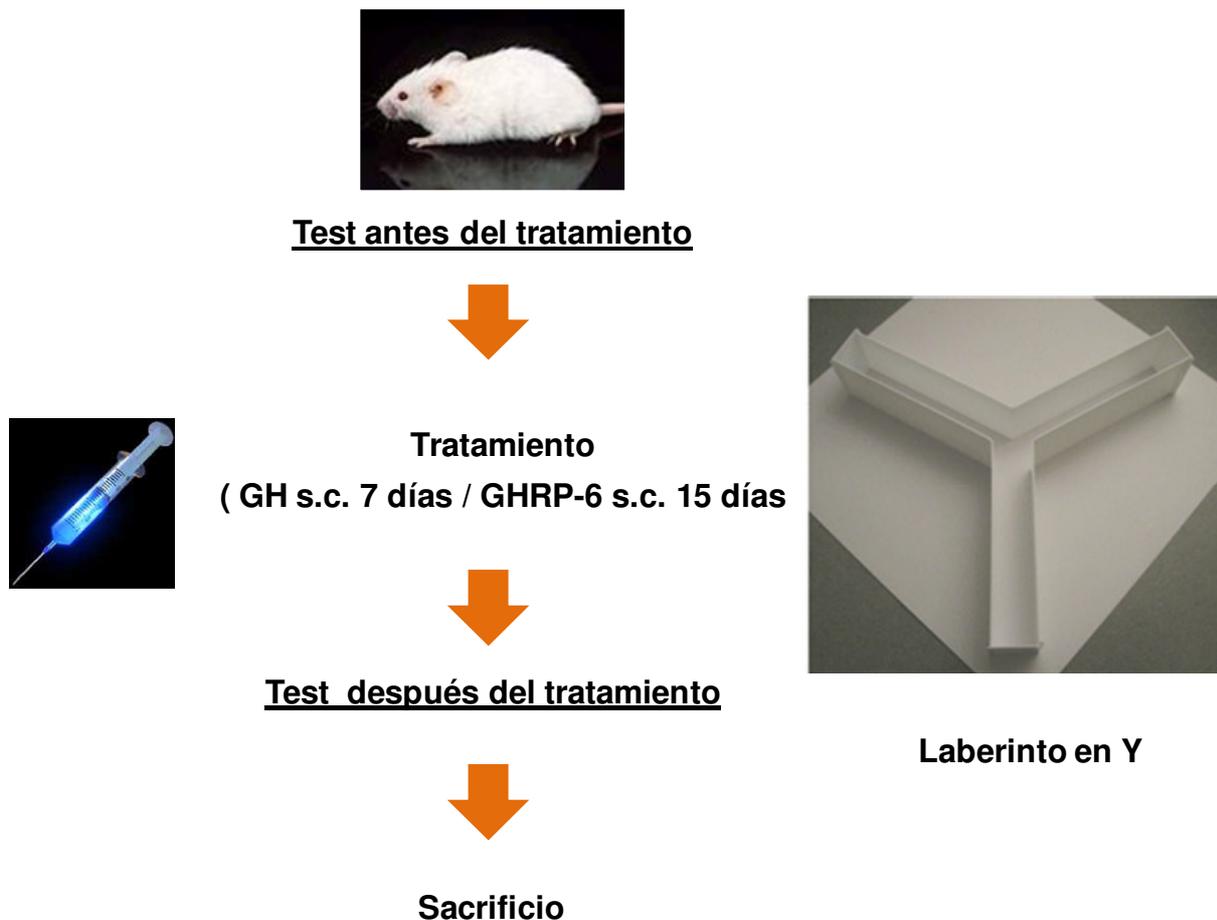


Figura 11: Diseño experimental para evaluar el efecto del tratamiento con GH y/o GHRP-6 en la capacidad cognitiva de ratas viejas. El test se realizó antes y después de la administración de GH o GHRP-6. Las ratas fueron sacrificadas posteriormente y se emplearon para la valoración de los parámetros moleculares descritos anteriormente.

3.- MÉTODOS

3.1.- CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE CEREBRO DE FETO DE RATA

3.1.1.- Material biológico

Para el cultivo de células de cerebro de feto de rata se utilizaron ratas Wistar hembras adultas. En el día 17 de preñez (E17), tras anestesia de las madres con Fluothane (halotano) (AstraZeneca Farmacéutica, S.A. España), se extrajeron los embriones por procedimientos quirúrgicos asépticos, colocándolos en placas Petri con solución salina de Hank's (Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA). Después de ser extraídos los sacos embrionarios, los fetos se decapitaron y tras la apertura craneal mediante sección de la calota, se realizó la disección del encéfalo con la ayuda de una lupa binocular. Se conservaron ambos hemisferios cerebrales desechando el cerebelo y la región hipotalámica. Tras ser liberados de las meninges se depositaron en un tubo estéril con solución salina de Hank's (Bio Whittaker).

3.1.2.-Técnica del cultivo

Una vez realizada la extracción de los hemisferios cerebrales, el material obtenido se trasladó a una campana de flujo laminar. Tras lavar los tejidos con solución salina de Hank's, se resuspendieron en medio DMEM (Gibco, Invitrogen Corp., Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con sueros y se dispersaron pasándolos 3-5 veces a través de una pipeta de 10 ml y a continuación se sometieron a otros 3-5 pases suaves a través de agujas de calibre sucesivamente menor (20, 21 y 22 gauges) con el fin de disgregar individualmente las células. Concluido este proceso de dispersión se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 750 r.p.m. Concluida la dispersión, y con el fin de poder emplear la misma densidad celular en todos los experimentos, se efectuó contaje celular en cámara de Neubauer, se ajustó el volumen de la suspensión para obtener la densidad deseada y finalmente se procedió a la siembra celular en las siguientes condiciones:

-Para los *estudios bioquímicos* la siembra se efectuó en placas Petri de 35 mm de diámetro. El volumen de la suspensión celular se ajustó para obtener una densidad de $2,7 \times 10^6$ células (totales)/ml y cada placa recibió 1,5 ml de dicha suspensión, lo que corresponde a una densidad celular de aproximadamente $4,5 \times 10^5$ células/cm² o 4×10^6 células/placa.

-Para los *estudios morfológicos* la siembra celular se efectuó en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro alojados en placas multipocillo (24 pocillos) (Corning Glass Work, Corning, NY, USA). El volumen de suspensión celular se ajustó para obtener una densidad de 3×10^6 células (totales)/ml depositándose 100 µl de la misma en cada cubreobjetos, lo que equivale a una densidad de $2,65 \times 10^5$ células/cm² o 3×10^5 células/pocillo. Transcurridos 30-60 minutos se añadieron 0,4 ml de medio de cultivo a cada pocillo alcanzándose un volumen final de 0,5 ml/pocillo. Previamente a la siembra celular, tanto placas como pocillos fueron tratados con poli-D-lisina (Sigma, Inc. St Louis, MO, USA) a una concentración de 15 mg/ml durante un mínimo de 3 horas. Posteriormente se lavaron con agua destilada autoclavada y se dejaron secar en condiciones estériles hasta su utilización.

3.1.3.- Medios de cultivo

Medio completo

Fue el medio empleado en todos los experimentos para la realización del cultivo y la incubación durante las primeras 6 horas. Su composición fue la siguiente: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 4,5 g/l de glucosa (Bio Whittaker), suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) (Bio Whittaker), L-glutamina 4 mM (Bio Whittaker), penicilina 200 U/ml (Gibco), estreptomycin 200 U µg/ml (Gibco) y anfotericina B 0,5 µg/ml (Gibco).

Medio definido

Se empleó para la realización de todos los procedimientos experimentales salvo cuando se especifique lo contrario. Consistió en partes iguales de DMEM (4,5 g/l de glucosa) y Nutrient Mixture Ham's F12 (Gibco) suplementado con L-glutamina 4mM, HEPES 0.35 % (Sigma), bicarbonato sódico 0.1 % (Merck, Darmstadt, Alemania), transferrina 50 µg/ml (Sigma), putrescina 10 µM (Sigma), corticosterona 100 nM (Sigma), selenito sódico 30 nM (Sigma), triyodotironina 15 nM (Sigma), penicilina 200 U/ml, estreptomycin 200 µg/ml, y anfotericina B 0,5 µg/ml.

Los medios de cultivo se prepararon frescos para cada experimento o cada 2 semanas y se filtraron en condiciones estériles en unidades de filtración (0.22 µm, Millex®-GS, Millipore Ibérica, Madrid, España) antes de su uso.

3.1.4.- Protocolo de incubación.

Seis horas después de la siembra celular, el medio completo se reemplazó por medio definido conteniendo FGFb (25ng/ml) (PeproTech) y las células se incubaron durante 7 u 8 días en los experimentos de GH y GHRP-6 o 4 días en los de VIP. A continuación se expusieron a distintos agentes siguiendo los protocolos experimentales establecidos en cada experimento. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ saturada de humedad y a 37 °C.

Al final de cada experimento, las células se procesaron de diferentes formas, dependiendo de los parámetros a analizar y de acuerdo a las técnicas que se detallan más adelante.

3.2.- INMUNOCITOQUÍMICA

3.2.1.- Fijación y preparación de los cultivos celulares

Los estudios inmunocitoquímicos se efectuaron sobre cubreobjetos alojados en placas multipocillo de 24 pocillos (Corning Glass Work). Transcurrido el tiempo de incubación establecido en cada caso, se retiró el medio de cultivo y las células se fijaron mediante inmersión en una solución de paraformaldehído (Merck) al 4% en PBS 0,1M pH 7,4 (Bio-Rad Laboratorios, Inc. Hercules, CA, USA) durante 15 minutos a 4°C. Tras eliminar los restos de fijador mediante lavados con PBS 0,1M (3x5 minutos), las células se incubaron en una solución H₂O₂ (Merck, Hohenbrunn, Alemania) al 0,3 % (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente

con el fin de bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, en los casos de localización intracelular del antígeno en estudio (MBP), las células se permeabilizaron mediante incubación durante 20 minutos a -20°C en una solución de etanol/acético en una proporción 95:5. Después de nuevos lavados en PBS, y para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, las células permanecieron durante 20 minutos en una solución de bloqueo conteniendo 5% de suero normal de cabra (SNCa) (DAKO, Barcelona, España), glicina 0,02M (USB, Cleveland, Ohio, USA) y BSA 0,1 % en PBS 0,1M, y finalmente se sometieron a análisis inmunocitoquímico.

3.2.2.- Inmunocitoquímica

Transcurrido el periodo de bloqueo, las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 16-20 horas a 4°C . Para la identificación de preOD se empleó un anticuerpo monoclonal frente al antígeno de membrana O4 (cedido amablemente por el Dr. Paíno, Unidad de Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España) a una dilución 1:10, y para la identificación de OD maduros se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a MBP (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA) a una dilución 1:300. Todas las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios se efectuaron en PBS 0,1M conteniendo 1% de SNCa. A continuación las células se lavaron con PBS 0,1M/glicina 0,02 M/BSA 0,1% (3x5 minutos) y se incubaron con un anticuerpo secundario frente a IgG de ratón (obtenido en cabra) (Dako) conjugado con biotina a una dilución de 1:200 y 1:400 para O4 y MBP respectivamente, durante una hora a temperatura ambiente. Después de nuevos lavados con PBS (3x5 minutos) se procedió a la incubación en el complejo ABC (Vectastain® Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) diluido en PBS según las instrucciones del fabricante, durante una hora a temperatura ambiente.

El revelado de la reacción se llevó a cabo mediante hidrólisis de diamionobenzidina (DAB) (Sigma), para lo cual las células se incubaron durante 5-10 minutos en una solución de tetrahidrocloruro de 3,3' diaminobenzidina al 0.03 % y H_2O_2 al 0.01% (v/v) en PBS 0.1 M. Tras varios lavados con agua destilada, las células se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Merck), se deshidrataron mediante sucesivas inmersiones en soluciones de etanol a concentraciones crecientes (70, 90, 100%), se aclararon con xilol y finalmente se montaron con DPX (Sigma) sobre portaobjetos y se analizaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse E400, Tokio, Japón).

3.3.- INMUNOHISTOQUÍMICA

3.3.1.- Fijación y preparación de los tejidos.

Los animales fueron anestesiados mediante inhalación de halotano. Posteriormente se procedió a la apertura de la cavidad torácica y exposición del corazón y grandes vasos. A través del ventrículo izquierdo se insertó una cánula en la aorta ascendente, seccionándose a continuación la aurícula derecha para crear la salida del circuito de perfusión. A través de la cánula aórtica se infundieron en primer lugar aproximadamente 250 ml de heparina sódica al 0,0125 % en suero salino fisiológico, seguidos de 800-1000 ml de la solución fijadora consistente en paraformaldehído al 4 % en PB 0,1M, pH 7,4 (NaH_2PO_4 39mM, Na_2HPO_4 61 mM). Terminada la perfusión y tras la apertura del cráneo se extrajo el cerebro y se postfijó por inmersión en la misma solución fijadora durante 16-18 h a 4°C . A continuación se procedió

a la crioprotección de los tejidos mediante su inclusión en una solución de sacarosa (Merck) al 30% en PBS 0,1M a 4°C por un periodo de 24-48 horas (hasta la sedimentación del tejido en el fondo del recipiente) y finalmente a su congelación bajo una capa gruesa de hielo seco pulverizado. Mediante el uso de un criostato (Cryocut 1800, Leica, Bensheim, Alemania) se obtuvieron secciones histológicas de 25 µm de espesor que se conservaron a -80 °C en solución crioprotectora (glicerol 30 %, etilenglicol 30 % en PB 0,1 M) hasta su utilización.

3.3.2.- Inmunohistoquímica

Todos los procedimientos referidos a continuación se realizaron en flotación, con agitación suave y a temperatura ambiente salvo que se especifique lo contrario. Antes de ser procesados, los tejidos fueron mantenidos a temperatura ambiente durante unos minutos y sometidos a lavado intensivo en PBS 0,1M pH 7,4 con el fin de eliminar todo resto de solución crioprotectora. Posteriormente los cortes se sometieron a un baño de citrato sódico durante 3 minutos a 90 °C, tras dejar enfriar los cortes 15 minutos se lavaron en PBS. A continuación se procedió al bloqueo de la actividad peroxidasa mediante incubación durante 15 minutos en una solución de H₂O₂ al 0,3 % (v/v) en PBS 0.1M. Después de nuevos lavados con PBS y con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, los tejidos permanecieron en una solución de bloqueo (PBS 0,1M, SNCa 5%, Tritón X-100 0,2%) durante una hora y seguidamente se incubaron con el anticuerpo anti MBP (Oncogene) correspondiente en una solución de PBS 0,1M, SNCa 1% y Tritón X-100 0,2% durante 16-20 horas. Finalizado este periodo las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas durante una hora con un anticuerpo secundario adecuado conjugado con biotina (Dako) y diluido en la misma solución empleada para la dilución del anticuerpo primario. A continuación se lavaron otra vez con PBS y se incubaron en el complejo ABC durante una hora más. Finalmente, tras nuevos lavados, se llevó a cabo el revelado de la reacción antígeno-anticuerpo mediante inmersión durante 3 minutos en la solución de revelado Liquid DAB+Substrate Chromogen System, (Dako). La reacción antígeno anticuerpo se paró mediante lavados con PBS, tras los cuales las secciones fueron montadas sobre portaobjetos SuperFrost®Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemania), deshidratadas mediante inmersión durante 30-60 segundos en soluciones de etanol de concentraciones crecientes (70, 90, 100%) y aclaradas con xilol. Por último, se dejaron secar durante una noche, se cubrieron con cubreobjetos montados con DPX y se analizaron mediante microscopía óptica.

Para la cuantificación de la inmunotinción se fotografiaron las zonas de interés con una cámara fotográfica Nikon FDX-35 y las imágenes obtenidas se procesaron mediante un digitalizador de imágenes Nikon Coolscan III. La intensidad de la señal se cuantificó mediante la aplicación informática NIH Image 1.62.

3.4.- ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN INMUNOBLOT

Mediante esta técnica se analizó la expresión de MBP y CREB en extractos de proteínas de hipocampo y corteza cerebral anterior. Para la detección de MBP se empleó un anticuerpo monoclonal específico suministrado por Oncogene. Además, se analizó en extractos de células cerebrocorticales la activación de cuatro proteínas: las quinasas ERK1, ERK2, y Akt y el factor de transcripción CREB.

3.4.1.- Obtención de extractos de células procedentes de cultivo

Estos estudios se llevaron a cabo en cultivos de células cerebrocorticales en placas Petri de 35 mm de diámetro. Tras los diferentes tratamientos las células se lavaron con PBS y se recogieron en solución de lisis (HEPES 50 mM, pirofosfato sódico 10 mM (Sigma), FNa 100 mM (Sigma), EDTA 2 mM (Sigma), VO_4Na_3 2 mM (Sigma), triton 1% (Bio-Rad), glicerol 10% (Merck), PMSF 2m M (Sigma), aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma) y se incubaron durante 15 minutos en hielo, la lisis se completó mediante una breve sonicación de 20 segundos. A continuación, los extractos celulares se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.4.2.- Obtención de los extractos de tejidos

Una vez las ratas fueron decapitadas se procedió a la apertura del cráneo y extracción del cerebro. La disección del cerebro se realizó en frío en una placa de Petri con suero salino. Se obtuvieron ambos hipocampos, corteza cerebral anterior de cada hemisferio e hipófisis, que fueron depositados en tubos eppendorff y sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras de tejido se almacenaron a -80° C hasta su procesamiento.

Para la extracción de proteínas se homogenizaron los tejidos con un homogenizador eléctrico (Polytron®, Kinematica AG, Littau-Luzern, Suiza) en frío con buffer de lisis (HEPES 50 mM, pirofosfato sódico 10mM, fluoruro sódico 100mM, EDTA 2 mM, ortovanadato sódico 2 mM, Tritón X-100 1%, glicerol 10%, PMSF 2mM, aprotinina 10mg/ml y leupeptina 10mg/ml) en una proporción peso volumen 1:8. Se incubó los homogeneizados en hielo durante 30 minutos, se centrifugo en frío a 14.000 r.p.m. durante 30 minutos y los sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a -80°C hasta su utilización.

3.4.3.- Cuantificación de proteínas

Con el fin de analizar cantidades iguales de proteína de cada muestra se determinó la concentración de proteínas totales en el sobrenadante mediante el kit comercial de BCA (BCA TM Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). La posterior cuantificación se llevó a cabo mediante Nanodrop (Uv-Vis NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific). En los extractos de células procedentes de cultivo se determinó la concentración total de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) para construir la curva patrón. La absorbancia de las muestras se midió a 595 nm en un espectrofotómetro GenesisTM (SpectronicTM Instruments, Inc., Rochester, NY, USA).

3.4.4.- Electroforesis y transferencia de las proteínas

La preparación de los extractos de proteínas (10-40 $\mu\text{g}/\text{muestra}$) para la electroforesis se llevó a cabo igualando el volumen de todas las muestras con buffer de lisis y añadiendo posteriormente tampón de carga 3x (Tris-ClH 0,186M pH 6,8, SDS 9%, glicerol 15%, 2-mercaptoetanol 6%, azul de bromofenol 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para obtener una concentración final 1x. Finalmente, antes de ser aplicadas al gel las muestras se sometieron a una temperatura de 90°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas e inactivar las proteasas endógenas.

La preparación de los geles se realizó siguiendo los protocolos habituales para geles de proteínas (Laemmli, 1970). La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y un sistema discontinuo formado por un primer gel de alineación ("stacking") donde las proteínas se empaquetan antes de entrar en el gel de separación, lo que permite una mayor resolución. El gel de separación consiste en una mezcla de poliacrilamida (30% acrilamida (Sigma) y 0,8% bis-acrilamida (Bio-Rad), a una concentración final del 10% para todas las proteínas excepto para MBP para la que se utilizaron geles al 12,5%, Tris-base 0,4M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfato amónico 0,1% (p/v) y Temed 0,1% (v/v). La solución del gel de alineación consistió en una mezcla de poliacrilamida a una concentración final del 3%, Tris-CIH 0,125M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfato amónico 0,1% (p/v) y Temed 0,1% (v/v). La electroforesis se realizó mediante la aplicación de una corriente de 100 voltios en una cubeta S-600 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) en presencia de buffer de electroforesis (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 1%). Terminada la electroforesis, las proteínas se transfirieron por electrotransferencia a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF) (Hybond™-P, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) mediante una corriente continua de 25 voltios aplicada durante 16 horas a 4°C en tampón de transferencia (Tris base 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%)

3.4.5.- Detección de las proteínas (Inmunoblot)

Una vez transferidas las proteínas, se procedió a la detección de las mismas mediante el uso de anticuerpos específicos. Para ello primero se incubó la membrana durante una hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo compuesta por un 5% de leche desnatada (Bio-Rad) y Tween-20 al 0,2% en PBS 0,01M para bloquear los lugares de unión inespecíficos de la membrana. A continuación la membrana se incubó con el anticuerpo primario en una solución de leche desnatada 0.05% y Tween-20 0.2% en PBS 0,01M, durante una hora a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche en el caso de CREB. Tras realizar tres lavados de 10 minutos con la misma solución para retirar el exceso de anticuerpo primario, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario específico anti-IgG de ratón o conejo, según el anticuerpo primario empleado, conjugado con peroxidasa (Dako), diluido de nuevo en la misma solución, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se retiró el exceso de anticuerpo secundario mediante tres lavados de 10 minutos en PBS 0,001M. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación leve. Las bandas inmunoreactivas se visualizaron mediante una reacción de quimioluminiscencia con el sistema de detección Supersignal® Substrate WB (Pierce, Rockford, IL, USA) como sustrato de la peroxidasa asociada al anticuerpo secundario. Tras incubar la membrana durante 5 minutos en el sustrato, se analizó la señal emitida mediante el sistema Gel Doc XR (Bio-Rad), donde se cuantificó la densitometría de las bandas mediante el programa Quantity One (Bio-Rad). En el caso de los Western de extractos celulares, tras ser incubada con este sustrato la membrana fue expuesta a una película de radiografía (MG-SR, Konica, Tokio, Japón) durante un tiempo variable entre 15 segundos y 15 minutos, transcurridos los cuales se procedió al revelado de la misma. Tras el revelado de la película fotográfica, las señales obtenidas se procesaron con un digitalizador de imágenes (LaCie, modelo G520A, Massy Cedex, Francia) y su intensidad se cuantificó mediante densitometría utilizando la aplicación informática NIH Image 1.62. Los resultados obtenidos del análisis densitométrico se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias (u.d.a.) desestimándose aquellos valores para los cuales no había homogeneidad en la carga. Finalizado el procedimiento, se confirmó la homogeneidad en la cantidad de proteína aplicada y

transferida mediante un stripping de la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente y reincubación con el anticuerpo de β -actina (Sigma).

3.5.- ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS

En el presente trabajo se analizó la activación de cuatro proteínas: las quinasas ERK1, ERK2, y Akt y el factor de transcripción CREB. Todas ellas se activan mediante fosforilación de residuos específicos, por lo que el análisis de su activación se efectuó mediante detección inmunológica de las formas fosforiladas de cada proteína, empleando para ello la técnica de Western immunoblot según el protocolo descrito anteriormente.

La identificación de las formas activas de MAPK, Akt y CREB se efectuó mediante el empleo de anticuerpos primarios que reconocen específicamente las formas fosforiladas de cada proteína: para el estudio de la activación de MAPK se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas ERK1 y ERK2 (Sigma), a una dilución 1:15.000; para el estudio de la actividad de Akt se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce específicamente la proteína fosforilada en Ser473 (Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, USA) a una dilución 1:1000; finalmente para el análisis de la activación de CREB se empleó un anticuerpo policlonal que reconoce CREB específicamente cuando éste se halla fosforilado en Ser133 (Cell Signaling Technology®) a una dilución 1:600.

Con el fin de normalizar los niveles de proteína fosforilada con respecto a la cantidad total (fosforilada y no fosforilada) de proteína, las membranas se lavaron con Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Rockford, Illinois, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar los anticuerpos específicos frente a las formas fosforiladas y se reincubaron en presencia de un anticuerpo policlonal anti-MAPK (ERK1/2) (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:10.000, un anticuerpo policlonal anti-Akt (Cell Signaling Technology®) a una dilución 1:1000 o un anticuerpo policlonal anti-CREB (Cell Signaling Technology®) a una dilución 1:500 capaces de reconocer todos ellos tanto las formas fosforiladas como no fosforiladas de las proteínas respectivas. Los resultados obtenidos se expresaron como unidades densitométricas arbitrarias (u.d.a) de la señal de la banda de proteína fosforilada corregidas respecto a la señal de la banda de proteína total. Los anticuerpos primarios empleados y las diluciones a las que se utilizaron se detallan en la siguiente tabla:

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
MBP	1:600	Serotec
ERK-1/2-P	1:15.000	SIGMA
ERK-1/2	1:10.000	SIGMA
Akt-P (Ser473)	1:1.000	Cell Signaling Technology
Akt	1:1.000	Cell Signaling Technology
CREB-P (Ser 133)	1:600	Cell Signaling Technology
CREB	1:500	Cell Signaling Technology

3.6.- ESTEREOTAXIA

El ventrículo lateral derecho se localizó utilizando el atlas de Paxinos y Watson. Se anestesió a la rata mediante inhalación de halotano y se situó en el aparato de estereotaxia de tal forma que el extremo superior de la barra incisal quedara 3mm por debajo de la línea interaural, se expuso el bregma, punto desde el cual se midieron las coordenadas -0.8 mm anteroposterior, $+1.4$ mm lateral y 3 mm dorsoventral. Se implantó una cánula de acero inoxidable de 28 gauge en el ventrículo lateral, la cual iba conectada mediante un catéter de cloruro de polivinilo (Brain Infusión Kit II 3-5 mm, Alzet, Cupertino, CA, USA) a una bomba osmótica de infusión continua, minibomba osmótica Alzet model 1007D (Alzet® Osmotic Pumps,), que suministra un volumen de 0.5 μ l/hora durante un periodo de 7 días.

3.7.- RADIOINMUNOENSAYO DE IGF-I

Tras el sacrificio de los animales por decapitación se recogieron las muestras de sangre de los vasos cervicales y tronco para la determinación de la concentración de IGF-I inmunoreactivo (IGF-I-IR) en suero. Cuando los animales se perfundieron las muestras de sangre se recogieron directamente del corazón antes de la perfusión. Las muestras se mantuvieron durante 4-6 horas a 4°C antes de ser centrifugadas. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta el momento de la determinación de IGF-I-IR por RIA. Se utilizó un kit comercial de DSL (Mouse/Rat IGF-I RIA DSL-2900, Diagnostic Systems Laboratorios, Inc. Webster, Texas, USA). Para evitar posibles variaciones, todas las muestras de un mismo experimento fueron valoradas en el mismo ensayo y las muestras se valoraron por duplicado.

3.8.- CUANTIFICACIÓN DEL ARNm POR RT-PCR A TIEMPO REAL

Mediante esta técnica se cuantificaron en corteza cerebral anterior, hipocampo e hipófisis los ARNm de GH, R-GH, IGF-I, R-IGF-I, ghrelina, las dos isoformas del receptor de secretagogos R-GHS-1a y R-GHS-1b, BDNF, CXCL12, y las citoquinas IL1 β , IL-6, IL10, TNF- α y TGF- β . Las muestras de tejido se recogieron según se ha descrito anteriormente para el Western inmunoblot.

Se utilizó el equipo de PCR en tiempo real de Applied Biosystem (7300 Real Time PCR System), empleando sondas específicas fluorescentes Taqman (Applied Biosystem, Lincoln Centre Drive Foster City, California, USA) marcadas con el fluoróforo FAM. En este sistema, el primer ciclo en el que se detecta fluorescencia se define como ciclo umbral Ct (*Cycle threshold*) y es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial.

3.8.1.- Extracción y cuantificación de ARN total

Para el aislamiento de ARN total, los tejidos se homogenizaron en Tri Reagent (Ambion® for Applied Biosystems): las cortezas cerebrales anteriores en 3 ml, los hipocampos en 2 ml y las hipófisis en 250 μ l, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez extraído el ARN, se resuspendió en agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water, Ambion®) y se cuantificó mediante espectrofotometría ultravioleta midiendo la absorbancia a 260 nm en un NanoDrop (Uv-Vis NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific), estimándose la pureza del ARN mediante el cociente de la absorbancia a 260 y 280 nm. Las muestras cuyo cociente 260/280 no se encontraban entre 1,7-2,2 fueron sistemáticamente desechadas. Además, se comprobó

la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa, de tal manera que se descartaron aquellas muestras cuyas bandas 28S y 18S no aparecieron como bandas discretas y aproximadamente en una proporción 2:1 respectivamente.

3.8.2.- Transcripción reversa

En todos los casos, 1 µg de ARN total fue sometido a una reacción de retrotranscripción usando random hexámeros como primers. Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador PX2 (Thermo) con las siguientes condiciones de reacción: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos y 85°C durante 5 segundos. Finalmente, las muestras de ADNc fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.8.3.- PCR cuantitativa

La medida de la expresión génica utilizando la PCR en tiempo real es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno). Para ello, cada muestra se amplificó por duplicado, amplificándose en paralelo a cada producto de amplificación el ADNc del ARN 18S que se utilizó para corregir las variaciones en la cantidad y procesamiento del ARN de partida.

Los ensayos Taqman (sonda+primer) empleados (todas de Applied Biosystem) se muestran en la siguiente Tabla:

Ensayo Taqman	Referencia	Ensayo Taqman	Referencia
GH	Rn 01495894-g1	R-GH	Rn 00567298-m1
Ghrelin	Rn 00572319-m1	IGF-I	Rn 99999087-m1
R-GHS1 a	Rn 00583419-s1	R-IGF-I	Rn 00583837-m1
R-GHS1b	Rn 00821417-m1	TNF-α	Rn 99999017-m1
IL-6	Rn 01410330-m1	IL-1β	Rn 00580432-m1
IL-10	Rn 00563409-m1	CXCL12	Rn 00573260-m1
TGF-β	Rn 00572010-m1	BDNF	Rn 01484924-m1

Para la PCR en tiempo real se utilizó el sistema 7300 Real Time PCR de Applied Biosystem, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl usando 10 µl de TaqMan Gene Expresión Master Mix (Applied Biosystem), 1 µl del ensayo Taqman específico y 1 µl del ensayo Taqman para ARN 18S usado como control endógeno, en placas de 96 pocillos en sistema de PCR en tiempo real 7300. La amplificación se realizó mediante un primer ciclo de activación de la enzima AmpliTaq

polimerasa y desnaturalización del ADN, de 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos consistentes en 15 segundos de desnaturalización a 95°C y 1 minuto a 60°C de hibridación y amplificación.

3.8.4.- Cuantificación y análisis de datos

El método utilizado se basa en la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa y en la amplificación durante la PCR de una determinada secuencia diana en presencia de una sonda fluorescente específica (sonda TaqMan) que hibrida con la secuencia diana que se está amplificando. La sonda TaqMan, de un tamaño aproximado de 20 a 30 bases, tiene unido un marcador fluorescente en el extremo 5' y una molécula en 3' que absorbe ("quencher") la fluorescencia emitida por el marcador en el otro extremo. Además, esta sonda está fosforilada en 3' para evitar su extensión durante la reacción de la PCR. Si la secuencia de interés está presente en la muestra, la sonda Taqman se hibrida específicamente con ella. Cuando se produce la etapa de extensión en la reacción de la PCR, la actividad 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa degrada la sonda Taqman liberando el fluorocromo, que, al quedar separado del amortiguador, emite una señal que puede ser captada por el sistema óptico del equipo. Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y es directamente proporcional al número de moléculas que están siendo amplificadas en cada uno de los ciclos y se puede visualizar por el incremento en la señal de fluorescencia. Además, la Taq polimerasa no digiere la sonda libre, sino únicamente la que está hibridada, por lo que la cantidad de señal fluorescente emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto acumulado. La medida de la intensidad de la fluorescencia se realiza de manera continua, lo que proporciona una información dinámica en tiempo real del proceso. El sistema de detección permite establecer el ciclo umbral-Ct-cycle threshold- o ciclo de la PCR a partir del cual la cantidad de fluorescencia emitida alcanza un cierto nivel de detección. El Ct es el parámetro que se emplea para la cuantificación y siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.

Llevamos a cabo una cuantificación relativa mediante el método $\Delta\Delta Ct$ en el que se comparan directamente los Cts del gen testado y del gen de referencia (ΔCt) en cada muestra, y posteriormente se comparan los ΔCt de la muestra experimental con respecto a la muestra de referencia ($\Delta\Delta Ct$). Tomamos como referencia el valor de la muestra con mayor número de ciclos.

A fin de conocer la cantidad de ADN inicial, es preciso realizar nuevas transformaciones matemáticas del valor Ct. El valor Ct de los productos se normalizó con el Ct del ARN 18S de cada muestra, y este valor a su vez se normalizó con el Ct del producto de amplificación del calibrador/Ct de RNA 18S del calibrador. Finalmente, se utilizó la transformación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (U.A.), representando el número de veces mayor que la referencia, habiéndose tomado como referencia el ΔCt de la muestra con menor expresión del gen.

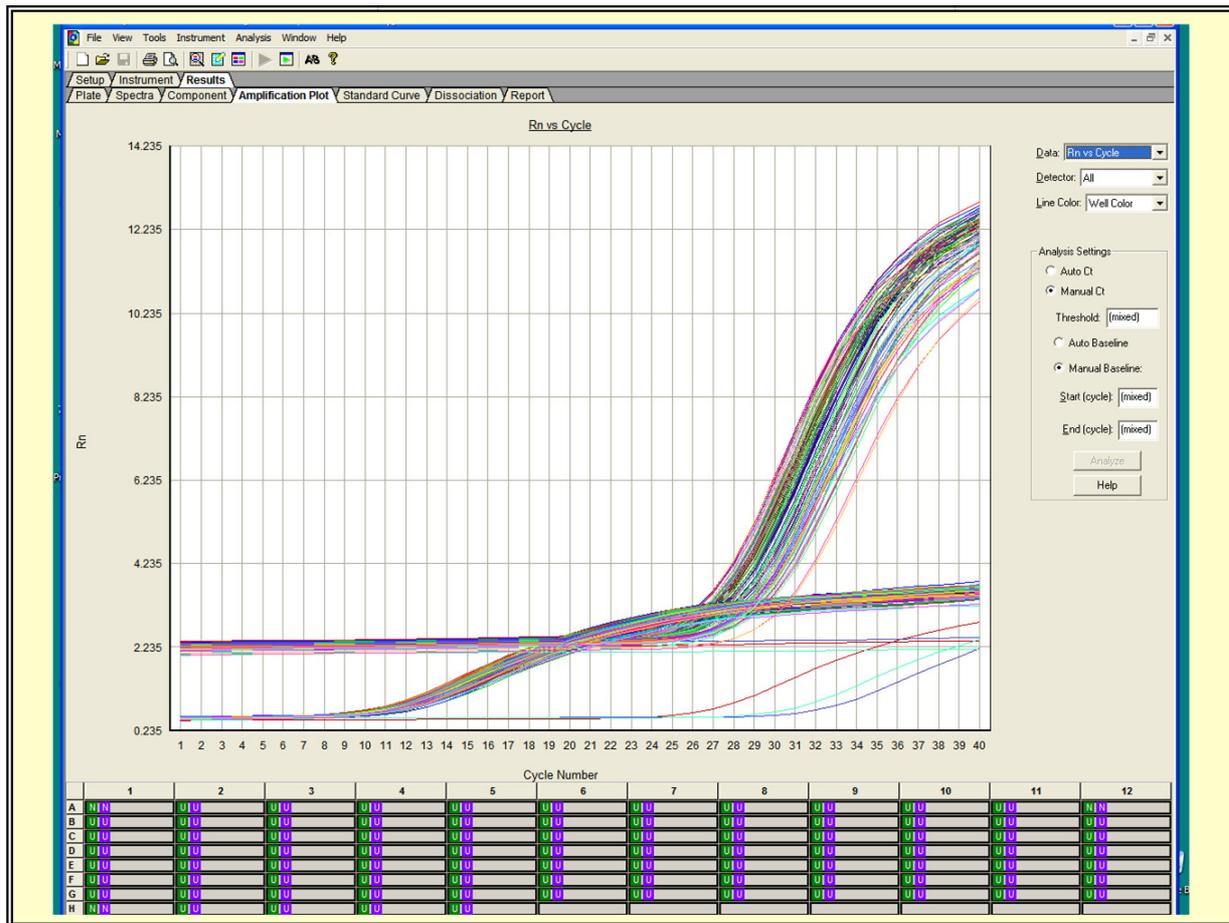


Figura 8: Representación de los perfiles típicos de amplificación por PCR con sondas Taqman. Representación del perfil de amplificación de muestras con el ensayo Taqman para BDNF usando como control endógeno RNA 18S.

Resultados

A.-SISTEMA GH/IGF-I EN EL ENVEJECIMIENTO

1- ALTERACIONES HIPOFISARIAS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS

1.1.- Expresión del ARNm de GH en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Con la finalidad de confirmar que las ratas viejas utilizadas en el presente trabajo presentaban las alteraciones de la expresión del gen de GH asociadas al envejecimiento así como la sensibilidad de la hipófisis al tratamiento con GH y GHRP-6, se estudió el nivel de expresión del ARNm de GH en hipófisis.

Como se observa en la Figura 1, la expresión del ARNm de GH en la hipófisis de ratas viejas se encuentra marcadamente disminuida con respecto a la de las ratas adultas. El tratamiento con GH produjo una disminución significativa en la expresión del ARNm de GH en la rata vieja en comparación con las ratas no tratadas de la misma edad. Por el contrario, el tratamiento con GHRP-6 no modificó la expresión del ARNm de GH.

Estos resultados sugieren que la GH exógena ejerce una acción inhibitoria de la expresión del ARNm de la GH hipofisaria, lo que confirma que la hipófisis de las ratas viejas mantiene su sensibilidad a la regulación por GH en el envejecimiento. Además, la demostración de la autorregulación de GH a nivel hipofisario evidencia la efectividad del tratamiento con GH en nuestro estudio.

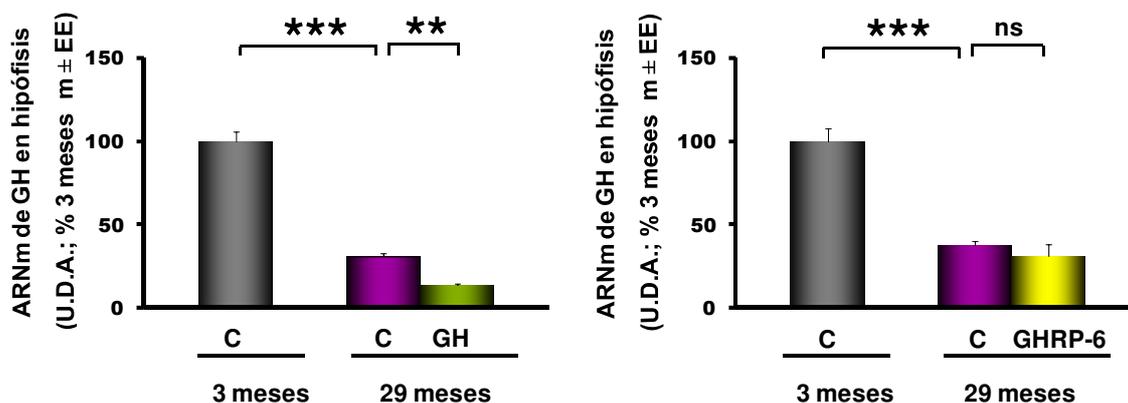


Figura 1. Expresión del ARNm de GH en la hipófisis. Cuantificación de los niveles del ARNm de GH mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ns, no significativo.

1.2.- Expresión del ARNm del IGF-I en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Además de ser considerado el principal mediador de las acciones de GH, el IGF-I juega un importante papel en la regulación de su secreción, siendo capaz de inhibir selectiva y específicamente tanto la transcripción del gen de la GH como su secreción hipofisaria.

Confirmando resultados previos de nuestro laboratorio (Velasco et al., 1998) se observó, como se muestra en la Figura 2, que la disminución del ARNm de GH en la hipófisis va acompañada de un aumento significativo del ARNm del IGF-I en la hipófisis de ratas viejas. El tratamiento con GH no modificó la expresión del ARNm del IGF-I en la hipófisis, mientras que el tratamiento con GHRP-6 produjo un incremento significativo del ARNm del IGF-I en las ratas viejas con respecto a las ratas viejas controles.

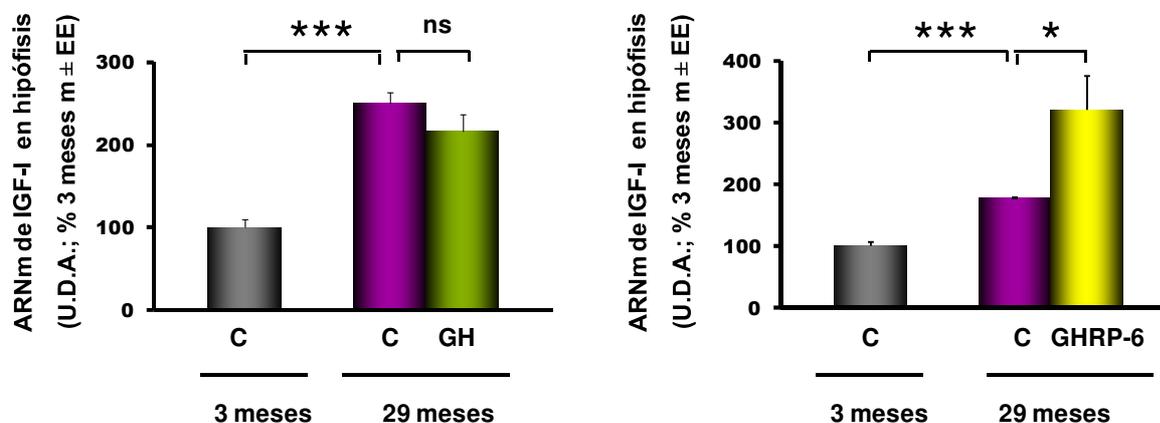


Figura 2. Expresión del ARNm del IGF-I en la hipófisis. Cuantificación de los niveles del ARNm del IGF-I en la hipófisis mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, p<0,05; ***, p<0,001; ns, no significativo.

2- CAMBIOS PERIFÉRICOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6 EN LOS NIVELES CIRCULANTES DEL IGF-I

El IGF-I circulante es considerado un marcador biológico de la actividad del eje GH/IGF-I. La disminución de la secreción de GH durante el envejecimiento se acompaña de una disminución de los niveles séricos del IGF-I. No existe unanimidad en la respuesta del IGF-I circulante al tratamiento con GH o GHS en el envejecimiento.

Nuestros resultados confirman que el envejecimiento se acompaña de una disminución de los niveles circulantes del IGF-I-IR. Como se observa en la Figura 3, el tratamiento con GH o GHRP-6 no produjo ningún cambio significativo en los niveles del IGF-I-IR en ratas viejas en comparación con las ratas viejas controles.

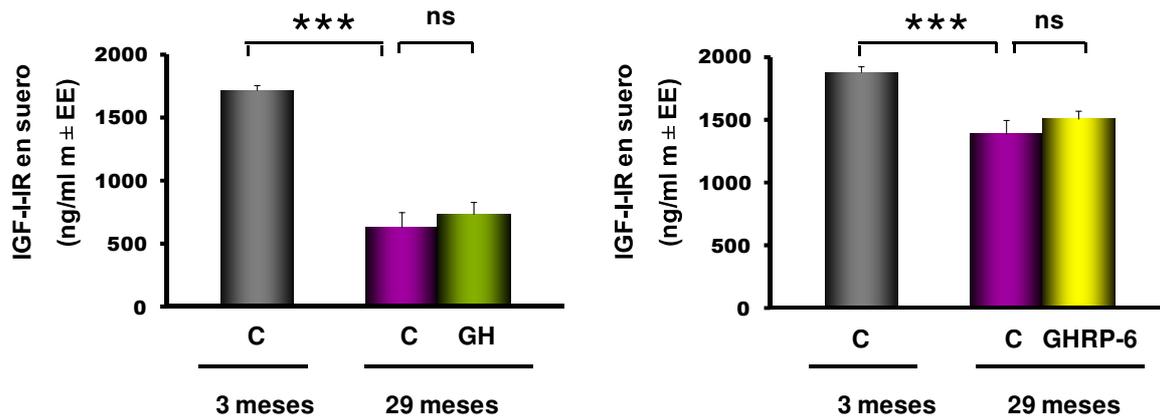


Figura 3. Niveles séricos del IGF-I-IR. Niveles del IGF-I en suero medidos por RIA en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE. ***, p<0,001; ns, no significativo.

La disminución de la expresión de la GH hipofisaria y de los niveles circulantes del IGF-I confirman que en las ratas viejas utilizadas en este estudio existía una depresión del eje GH/IGF-I.

3.- CAMBIOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS

3.1.- Expresión del ARNm del receptor de GH (R-GH) en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Dado que el R-GH cerebral vehiculiza las acciones centrales de la GH, estudiamos el efecto del envejecimiento en la expresión del ARNm del R-GH en cerebro y su posible modulación por el tratamiento con GH o GHRP-6.

Como se muestra en la Figura 4, el envejecimiento no altera los niveles del ARNm del R-GH ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Tampoco el tratamiento con GH o GHRP-6 produjo cambios significativos en los niveles del ARNm del R-GH en dichas áreas cerebrales.

3.2.- Expresión del ARNm del IGF-I en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Aunque el IGF-I hepático es el principal mediador de las acciones de GH, es bien conocido que el IGF-I es además sintetizado en numerosos tejidos extrahepáticos, incluido el cerebro (D'Ercole et al., 1986). El IGF-I extrahepático, actuando de forma autocrina o paracrina, podría jugar un papel importante en la respuesta fisiológica de los tejidos a GH.

Dado que el efecto de la administración de GH y/o GHS sobre la expresión del gen del IGF-I en el cerebro en relación con la edad está poco documentada decidimos estudiar si el tratamiento con GH o GHRP-6 modificaba la expresión del ARNm del IGF-I en la corteza cerebral anterior y/o en el hipocampo de las ratas viejas.

Como se muestra en la Figura 5 no se observan diferencias en la expresión del gen del IGF-I en la corteza cerebral anterior entre las ratas adultas jóvenes y las ratas viejas. En concordancia con estudios previos de nuestro laboratorio (Velasco et al., 2001), el tratamiento con GH produjo un aumento significativo del ARNm del IGF-I en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas. Sin embargo, el tratamiento con GHRP-6 no modificó la expresión del ARNm del IGF-I en la corteza cerebral anterior.

En el hipocampo, no se observan diferencias en la expresión del ARNm del IGF-I entre las ratas adultas jóvenes y los controles viejos. Tampoco se observó ningún cambio tras el tratamiento con GH o GHRP-6.

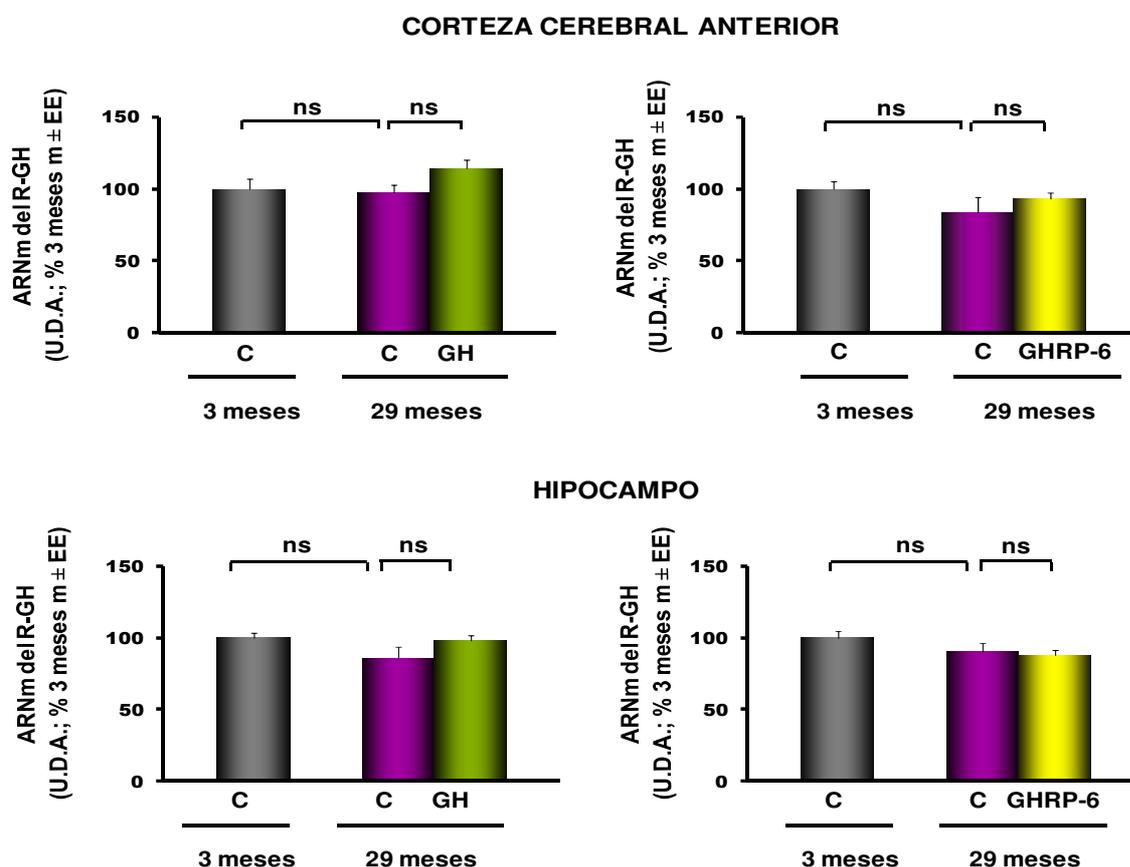


Figura 4. Expresión del ARNm del R-GH en la corteza cerebral anterior e hipocampo. Cuantificación de los niveles del ARNm del R-GH por PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ns, no significativo.

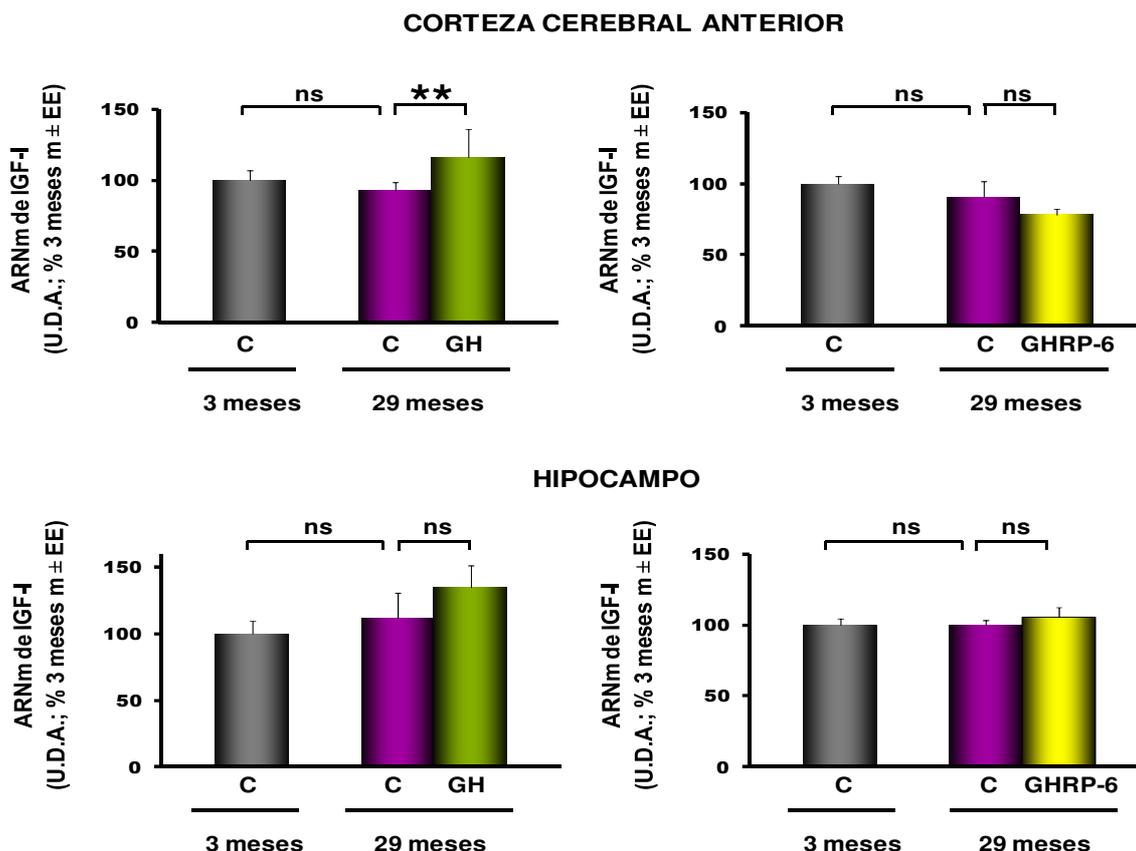


Figura 5. Expresión del ARNm del IGF-I en la corteza cerebral anterior e hipocampo. Cuantificación de los niveles del ARNm del IGF-I por PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

3.3.- Expresión del ARNm del receptor del IGF-I (R-IGF-I) en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Dada la importancia funcional del R-IGF-I, se cuantificaron los niveles del ARNm del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior e hipocampo de los distintos grupos experimentales.

Como se muestra en la Figura 6 no se observan diferencias en la expresión del gen del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior entre las ratas adultas jóvenes y las ratas viejas. El tratamiento con GH produjo un aumento significativo del ARNm del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas. Sin embargo, el tratamiento con GHRP-6 no modificó la expresión del ARNm del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior. En el hipocampo, no se observan diferencias en la expresión del ARNm del R-IGF-I entre las ratas adultas jóvenes y los controles viejos. Tampoco se observó ningún cambio tras el tratamiento con GH o GHRP-6.

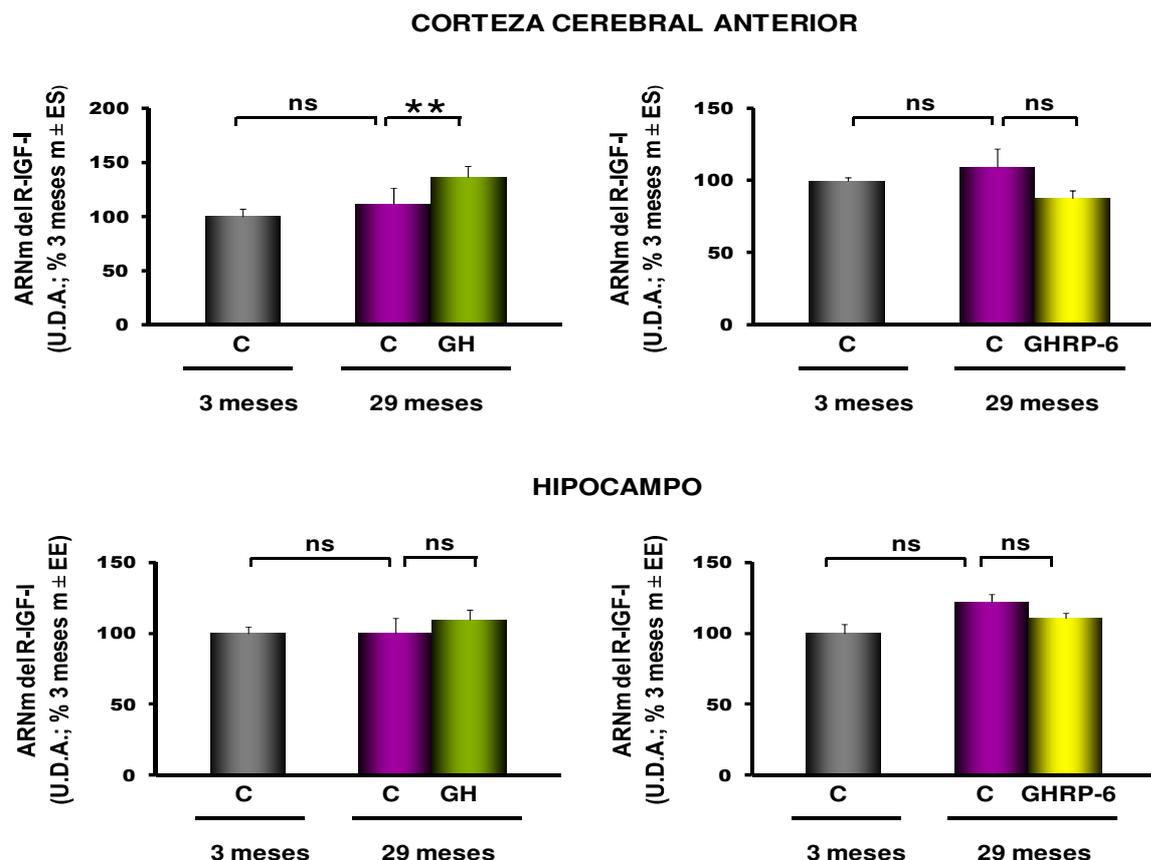


Figura 6. Expresión del ARNm del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior e hipocampo. Cuantificación de los niveles del ARNm del R-IGF-I por PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de los ARNms del R-GH, IGF-I y R-IGF-I no se modifican en el envejecimiento ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. El tratamiento con GH induce la expresión del ARNm del IGF-I y del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior pero no en el hipocampo de las ratas viejas.

3.4.- Expresión de los ARNms de los R-GHS en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Además de su papel como regulador de la secreción de GH, la ghrelina ejerce diversas funciones en el SNC. Se cree que cambios asociados con la edad en la expresión local de ghrelina o en la de sus dos receptores, R-GHS-1a y R-GHS-1b, pueden tener importantes repercusiones en el SNC. Para evaluar si ocurren cambios en la expresión de ghrelina y/o sus receptores en el cerebro envejecido medimos la expresión de sus ARNms en la corteza cerebral anterior e hipocampo. Además, investigamos el papel de GH y de GHRP-6 en la modulación de la expresión de los R-GHS en el envejecimiento.

Los niveles de los ARNm del R-GHS-1a y del R-GHS-1b fueron indetectables en la corteza cerebral anterior. En el hipocampo (Figura 7) no hubo cambios relacionados con la edad en la expresión del ARNm del R-GHS-1a pero se observó una disminución significativa en la expresión del ARNm del R-GHS-1b. Ninguno de los tratamientos modificó la expresión de los ARNm de los R-GHS. Los niveles de ghrelina fueron extraordinariamente bajos no permitiendo una correcta valoración de los mismos en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas.

Estos resultados son la primera evidencia de una disminución de la expresión del ARNm del R-GHS-1b en el hipocampo de la rata vieja y sugieren un papel de la ghrelina en las funciones cognitivas mediadas por el hipocampo.

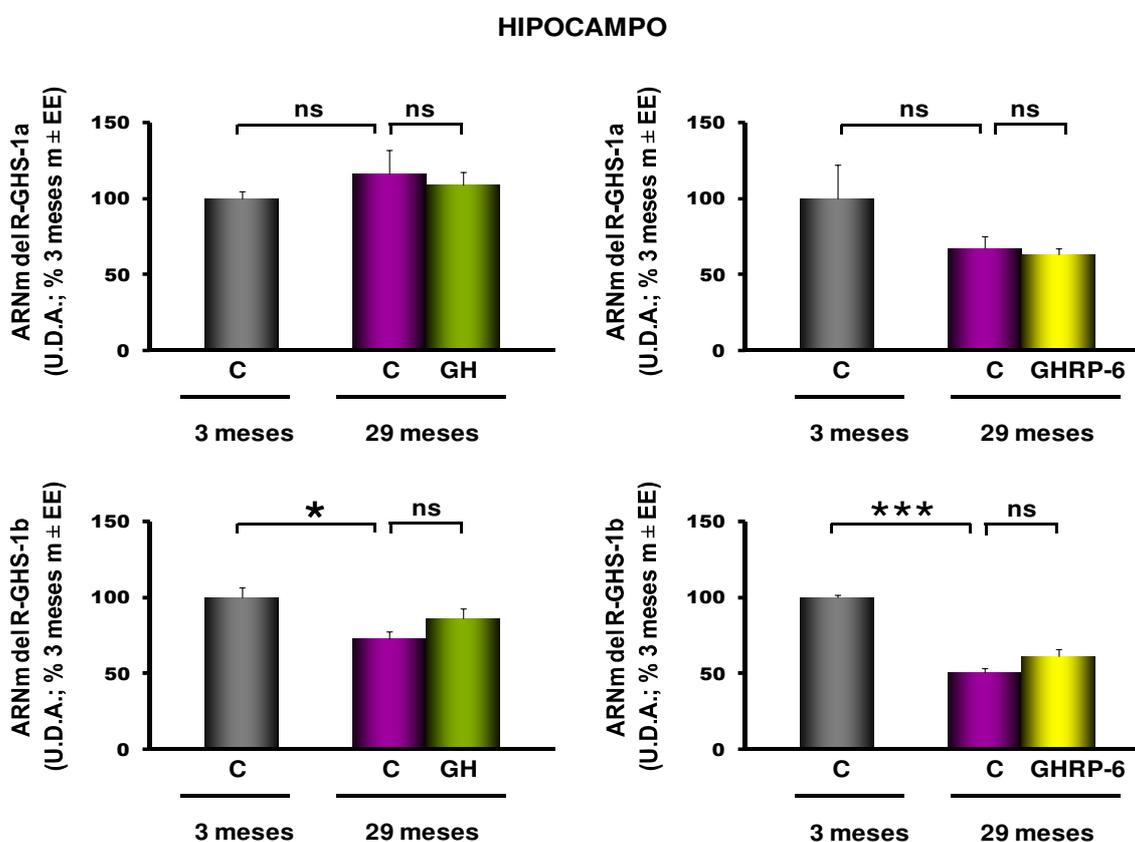


Figura 7. Expresión de los ARNm de los receptores R-GHS-1a y R-GHS-1b en el hipocampo. Cuantificación por PCR a tiempo real de los ARNm de R-GHS-1a y R-GHS-1b en el hipocampo de ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratados con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ns, no significativo.

B.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GH SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGÉNESIS

1.- EFECTO DE GH SOBRE LA OLIGODENDROGÉNESIS EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS

1.1.- Efecto de GH sobre el número de precursores de OD y de OD maduros

El papel de GH sobre el proceso de mielinización *in vitro* apenas ha sido explorado. En estudios aislados se ha observado que la GH es capaz de estimular la diferenciación de OD en agregados celulares cerebrales (Almazan et al., 1985).

En este estudio nos planteamos confirmar el efecto de GH en el proceso de oligodendrogénesis durante el periodo perinatal e investigar las vías de señalización intracelulares implicadas utilizando cultivos de células cerebrocorticales embrionarias. El estudio de la acción de GH sobre los pre-OD se efectuó mediante inmunocitoquímica frente al antígeno lipídico O4 que es un marcador de OD inmaduros. El efecto de la GH sobre el número de OD maduros se investigó mediante inmunocitoquímica frente a MBP.

En la Figura 8 se muestran los resultados del tratamiento con GH sobre los precursores de OD y OD maduros. La GH indujo un incremento tanto en el número de las células O4 (+) como de células MBP (+), lo que indica que, en las condiciones descritas, la GH es capaz de incrementar tanto la proliferación de OD inmaduros (expresión de O4) como la progresión de los mismos a OD maduros que expresan MBP.

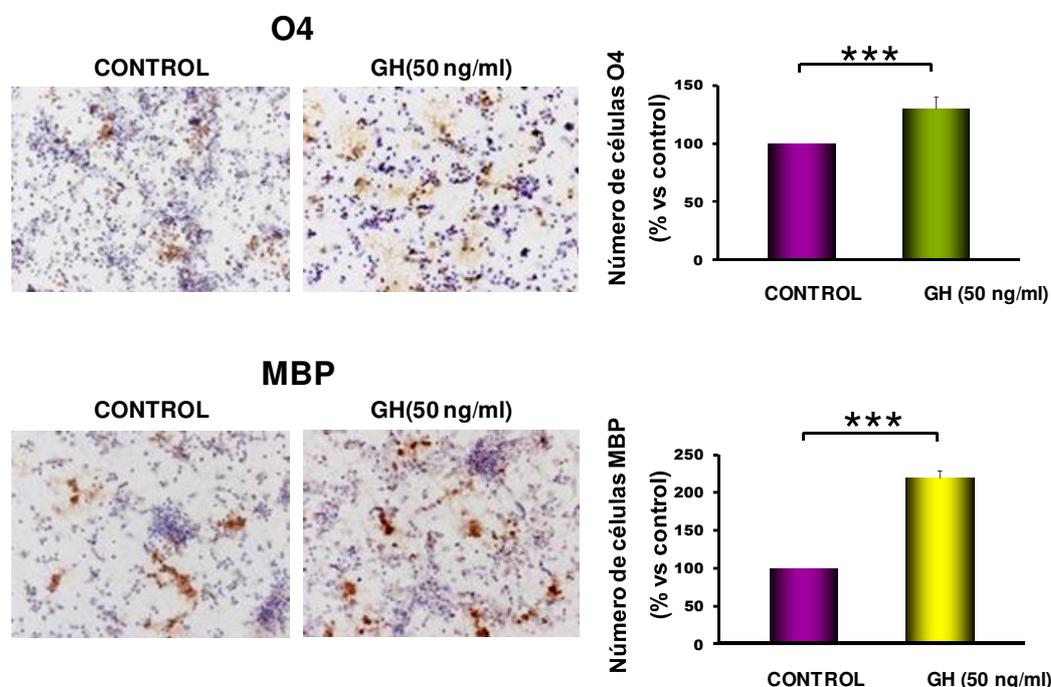


Figura 8. Efecto de GH en el número de células inmunoreactivas a O4 y MBP. Después de 7 u 8 DIV, para los experimentos de O4 o MBP respectivamente, las células cerebrocorticales fueron incubadas con GH (50 ng) durante 4 días. Transcurridos estos tiempos la expresión de O4 y MBP se determinó mediante inmunocitoquímica. Los resultados se expresan como la media \pm EE de 3 experimentos independientes. ***, $p < 0,001$.

Estos resultados sugieren que la GH es un importante factor de la diferenciación de los OD en células cerebrocorticales embrionarias confirmándose la implicación de GH en el proceso de mielinización y consecuentemente en el proceso de maduración cerebral durante el desarrollo embrionario.

1.2.- Activación de MAPK y Akt: estudio tiempo-respuesta

Una vez demostrada la efectividad de GH en el proceso de oligodendrogénesis *in vitro*, nuestro objetivo fue estudiar la implicación de las vías MAPK y PI3K en el efecto de la GH en dicho proceso.

Se llevó a cabo un estudio tiempo-respuesta para valorar la capacidad de GH de activar la vía MAPK en nuestro sistema. El estudio de la activación de la vía MAPK (ERK1/2) se realizó mediante Western inmunoblot donde se determinaron las variaciones en la concentración de las formas fosforiladas y no fosforiladas de las isoenzimas ERK1 y ERK2 en respuesta al tratamiento con GH.

El tratamiento con GH produjo una rápida estimulación de la fosforilación de ERK1/2 que alcanzó un pico máximo de activación entre los 5 y 10 minutos regresando a los niveles basales a los 30 minutos. Los niveles de ERK1/2 total no se modificaron. (Figura 9)

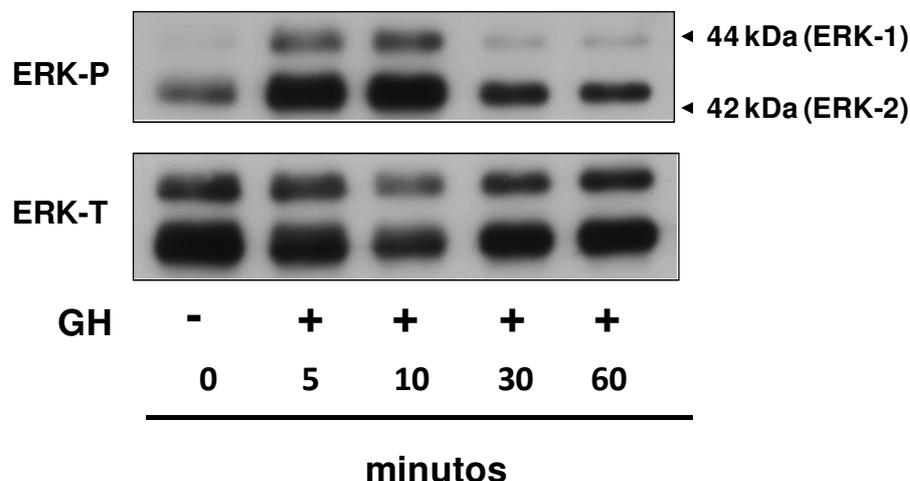


Figura 9. Curva tiempo-respuesta de la activación de la vía MAPK (ERK1/2) por GH. Después de 8 DIV, las células cerebrocorticales fueron incubadas con GH (50 ng) durante 5, 10, 30 y 60 minutos. Autorradiografía representativa de un Western inmunoblot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce las formas fosforiladas de MAPK (ERK1/2) (panel superior). En el panel inferior se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal que reconoce las formas fosforiladas y no fosforiladas de ambas proteínas.

Como reflejo de la activación de la vía PI3K se determinó la variación en las formas fosforiladas y no fosforiladas de Akt en respuesta a GH. (Figura 10). El tratamiento con GH resultó en un incremento de Akt fosforilado que fue evidente a los 5 minutos y máximo a los 30, manteniéndose los niveles elevados hasta los 60 minutos. Los niveles de Akt totales no se modificaron durante este tiempo.

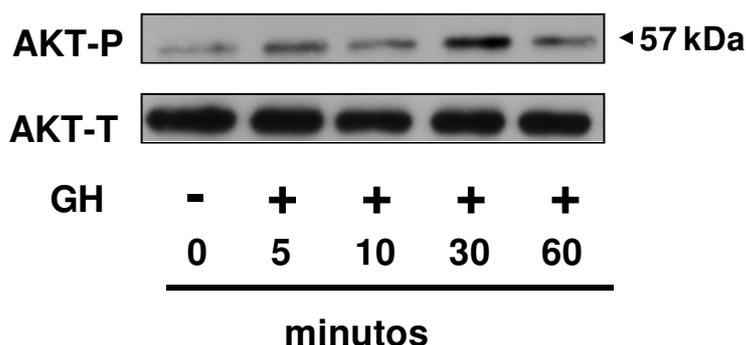


Figura 10. Curva tiempo-respuesta de la activación de la vía PI3K/Akt por GH. Después de 8 DIV, las células cerebrocorticales fueron incubadas con GH (50 ng) durante 5, 10, 30 y 60 minutos. Autorradiografía representativa de un Western inmunoblot, donde se empleó un anticuerpo monoclonal que reconoce la forma fosforilada de Akt (panel superior). En el panel inferior se representan los controles de carga obtenidos mediante el empleo de un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada y no fosforilada de la proteína.

Estos resultados confirman la capacidad de GH de activar las vías de señalización MAPK (ERK1/2) y PI3K en células cerebrocorticales de embriones de rata.

1.3.- Efecto de los inhibidores PD y LY en la inducción de O4 y MBP por GH

Demostrada la capacidad de GH de activar las vías de señalización de las MAPK y de la PI3K estudiamos la participación de cada una de estas vías de señalización en el proceso de oligodendrogénesis y en el efecto de GH sobre el mismo.

Para ello, tras bloquear con inhibidores específicos cada una de las vías se estudió la expresión de O4 y MBP por inmunocitoquímica en células cerebrocorticales tratadas y sin tratar con GH. Para la inhibición de la vía de las MAPK se utilizó el inhibidor PD098059 (PD). La vía de señalización de la PI3K se bloqueó con el inhibidor LY294002 (LY). Finalmente procedimos al bloqueo simultáneo de ambas vías mediante la adición conjunta a los cultivos de ambos inhibidores.

En la Figura 11 se observa como el bloqueo de la vía de las MAPK con el inhibidor PD098059 (15µg) y de la vía PI3K con el inhibidor LY294002 (2.5 µg) disminuyó marcadamente el efecto estimulador de GH sobre el número de células O4 (+) y MBP (+). Tanto PD como LY disminuyeron el número de células O4 (+) y MBP (+) en ausencia de GH. La presencia simultánea de ambos inhibidores abolió por completo la inducción de células O4 (+) y de MBP (+) en respuesta a GH.

Estos resultados indican que la activación de las vías de señalización MAPK y PI3K está implicada en el proceso de oligodendrogénesis y en la inducción de dicho proceso por GH.

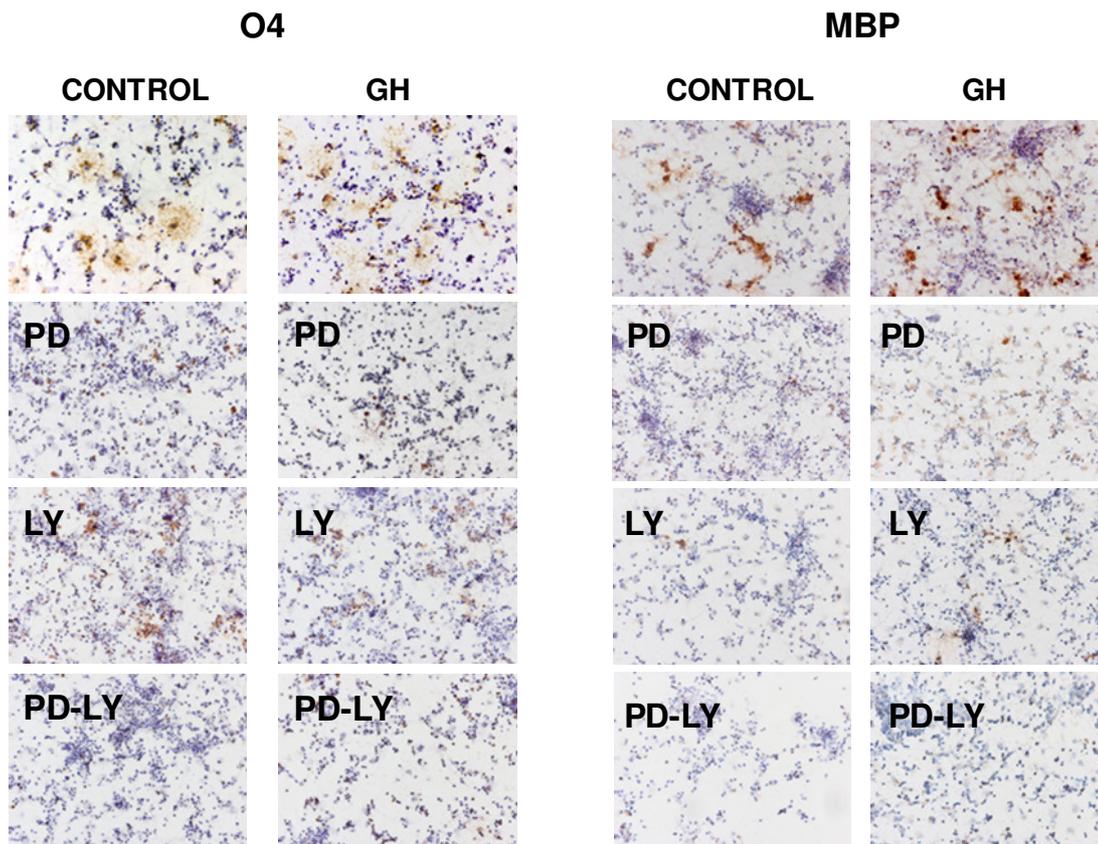


Figura 11. Efecto del bloqueo de las vías MAPK (ERK1/2), con el inhibidor PD098059, y PI3K/Akt, con el inhibidor LY294002, sobre la inducción de O4 y MBP por GH. Las células cerebrocorticales se trataron con GH (50 ng) en presencia o ausencia de PD098059 (15 μ M), LY294002 (2,5 μ M) o ambos simultáneamente. El número de células positivas a O4 y MBP se analizó por inmunocitoquímica.

1.4.- Efecto de GH sobre la activación de CREB

El factor de transcripción CREB juega un importante papel en la diferenciación de los oligodendrocitos y en la síntesis de mielina (Sato-Bigbee et al., 1999). En estudios previos demostramos (Palacios et al., 2005) que CREB es necesario para la inducción de MBP por IGF-I. Estos datos nos llevaron a investigar el efecto del tratamiento con GH sobre la activación del factor de transcripción CREB en células cerebrocorticales embrionarias en cultivo. Puesto que la fosforilación de CREB en el residuo Ser133 se correlaciona con su actividad transcripcional, la capacidad de GH para activar este factor se evaluó mediante la determinación de la forma fosforilada de CREB.

Como se muestra en la Figura 12, el tratamiento con GH indujo la fosforilación de CREB, que fue evidente a los 5 minutos y se mantuvo hasta los 60 minutos después de la adición de GH. La concentración de CREB total no cambió en este tiempo indicando que GH induce la activación de la proteína y no su nivel de expresión.

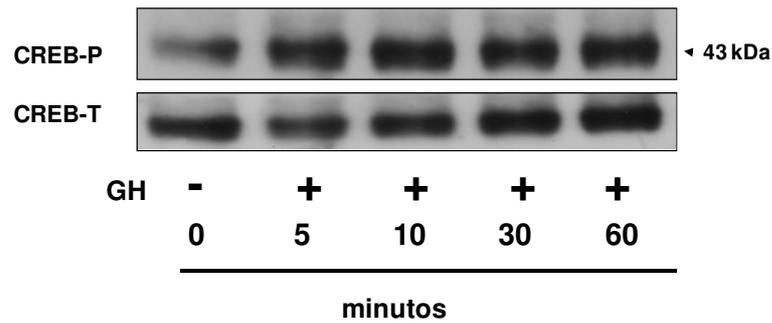


Figura 12. Activación del factor de transcripción CREB por GH: estudio tiempo-respuesta. Después de 8 DIV, las células cerebrocorticales se incubaron con GH (50 ng) durante 5, 10, 30 y 60 minutos. Se muestra la autorradiografía de un Western inmunoblot representativo realizado con un anticuerpo específico frente a la forma fosforilada de CREB (panel superior). La misma membrana se incubó con un anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada de CREB (panel inferior).

Estos resultados demuestran que la GH promueve la activación de CREB. Dado que CREB es necesario para la inducción de MBP por IGF-I, estos hallazgos sugieren la participación de CREB en el proceso de oligodendrogénesis inducido por GH.

2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GH SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

2.1.- Efecto del tratamiento con GH i.c.v. sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

En el envejecimiento se produce una pérdida de sustancia blanca en el cerebro de ratas (Knox et al., 1989; Sugiyama et al., 2002), primates (Peters et al., 2000; Sloane et al., 2003) y humanos (Albert, 1993). La desmielinización que ocurre en el envejecimiento se acompaña de un aumento en el número de oligodendrocitos (Peters et al., 1991; Peters, 1996), la formación de mielina redundante y un incremento del grosor de las vainas de mielina. Estos cambios indican la puesta en marcha de un proceso de remielinización (Peters y Sethares, 2002). Este proceso reparador ocurre en todas las etapas de la vida, pero se vuelve menos eficiente con la edad (Gilson y Blakemore, 1993; Ashcroft et al., 1995; Shields et al., 1999) debido a un enlentecimiento en el ritmo de mielinización (Shields et al., 1999; Sim et al., 2000). La hipomielinización que se observa en el cerebro envejecido sería, por lo tanto, resultado del enlentecimiento del proceso reparador de remielinización.

La hipomielinización cerebral presente en ratas viejas se acompaña de una disminución en la amplitud de los pulsos de secreción de GH y el consiguiente declive de los niveles circulantes del IGF-I, factor neurotrófico altamente implicado en oligodendrogénesis y mielinización (Woodruff y Franklin, 1999; Ye y D'Ercole, 1999; Hinks y Franklin, 2000). El papel de la GH sobre el proceso de oligodendrogénesis y mielinización del SNC *in vivo* es controvertido. La deficiencia de GH inducida inmunológicamente produce una alteración de la migración y diferenciación oligodendroglial, con el consecuente fallo de la mielinización (Pelton

et al., 1977). Además, los ratones Snell y Little *dwarfs*, ambos deficientes en GH, presentan alteraciones relacionadas con la mielinización, muchas de las cuales son revertidas después de la administración de GH (Noguchi, Sugisaki, Watanabe, et al., 1982; Noguchi, Sugisaki, Tsukada, 1982; Noguchi et al., 1983, 1985, 1988). Sin embargo, estudios posteriores (Lehman et al., 1999) no confirman estos hallazgos.

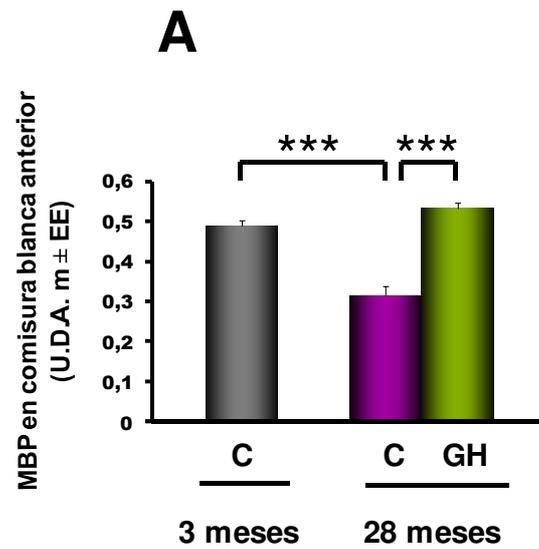
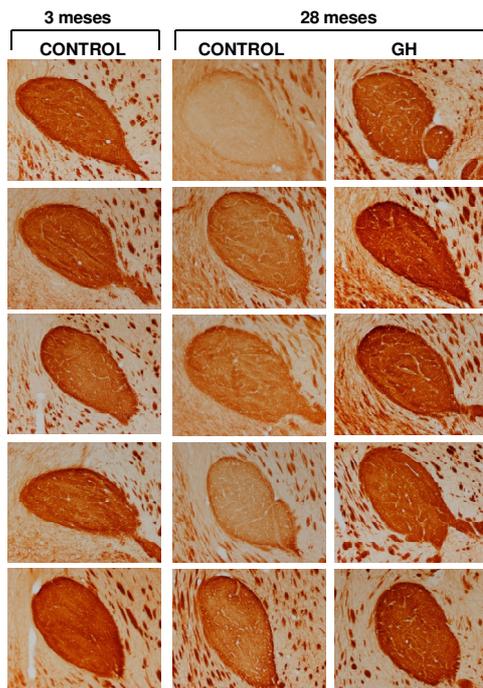
La evidencia mostrada en el anterior apartado de que la GH activa el proceso de oligodendrogénesis *in vitro*, nos llevó a estudiar si la administración exógena de GH era capaz de revertir la hipomielinización cerebral asociada al envejecimiento.

Con este objetivo un grupo de ratas viejas de 28 meses de edad se trataron con GH i.c.v. durante 7 días. Se analizó la expresión de MBP en la comisura blanca anterior y en el cuerpo calloso por su riqueza en sustancia blanca. Además, el cuerpo calloso al ser la conexión entre los dos hemisferios refleja el estado de una gran población de neuronas. El hipocampo se eligió por su implicación en el proceso de memoria.

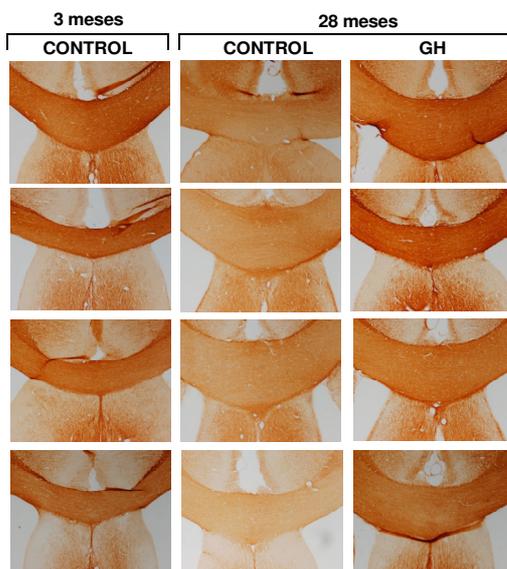
En la Figura 13 se muestran fotografías individuales correspondientes a las regiones de la comisura blanca anterior, cuerpo calloso y giro dentado del hipocampo de ratas pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. Nuestros resultados confirman un notable descenso del contenido de MBP en los animales viejos controles con respecto a los animales adultos jóvenes tanto en la comisura blanca anterior como en el cuerpo calloso y en el giro dentado del hipocampo. El tratamiento con GH indujo un dramático incremento en la expresión de MBP en las ratas viejas revirtiendo en muchos animales la hipomielinización hasta niveles similares a los encontrados en ratas adultas, como se observa en el análisis densitométrico de la expresión de MBP en la comisura blanca anterior (Figura 13, A).

Estos resultados son la primera evidencia de que la administración de GH i.c.v. es capaz de revertir la hipomielinización observada en el cerebro de ratas viejas en todas las áreas cerebrales estudiadas.

COMISURA BLANCA ANTERIOR



CUERPO CALLOSO



GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO

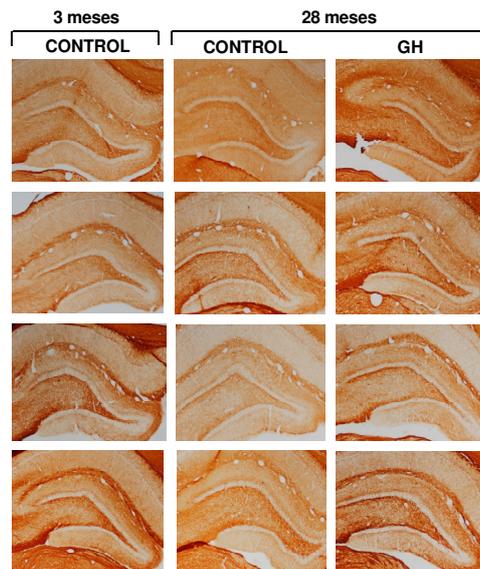


Figura 13. Efecto del tratamiento con GH i.c.v. sobre la expresión de MBP en diferentes áreas del cerebro. Inmunohistoquímica frente a MBP en secciones de tejido cerebral de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (28m) controles y tratadas con GH i.c.v. (0.5 µg/hora / 7 días). Las fotografías corresponden a la comisura blanca anterior (15 ratas), cuerpo calloso (12 ratas) y giro dentado del hipocampo (12 ratas). Se representa en A la cuantificación de la densidad óptica de la tinción de MBP en la comisura blanca anterior de los tres grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± EE. ***, $p < 0,001$.

2.2.- Efecto del tratamiento subcutáneo con GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

Una vez comprobado el efecto remielinizante de la administración i.c.v. de GH estudiamos la efectividad de GH administrada periféricamente como un tratamiento alternativo más próximo a una posible aplicación terapéutica. Con este objetivo, ratas de 29 meses de edad se trataron con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día) durante 7 días y se analizó la expresión de MBP por Western inmunoblot. La MBP es una proteína constituida por varias especies moleculares de distinto peso molecular cuyo patrón de expresión varía con la edad (Sugiyama et al., 2002). El análisis por Western inmunoblot permite, por tanto, analizar posibles cambios en las distintas especies moleculares de MBP.

Como se observa en la Figura 14, nuestros resultados muestran que en las ratas viejas existe una clara disminución de los niveles de la isoforma de 21 kDa, tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo, lo que resulta en una menor expresión de MBP inmunorreactiva total, como hemos expuesto en los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica. Además, se observan distintas bandas de bajo peso molecular que corresponden con formas degradadas de MBP cuya abundancia también varía con el envejecimiento. El tratamiento con GH s.c. durante 7 días no modificó los niveles de la banda de 21 kDa ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Estos resultados contrastan con los obtenidos mediante inmunohistoquímica donde observamos que la GH administrada por vía i.c.v. indujo un incremento en la expresión de MBP en el cerebro de las ratas viejas.

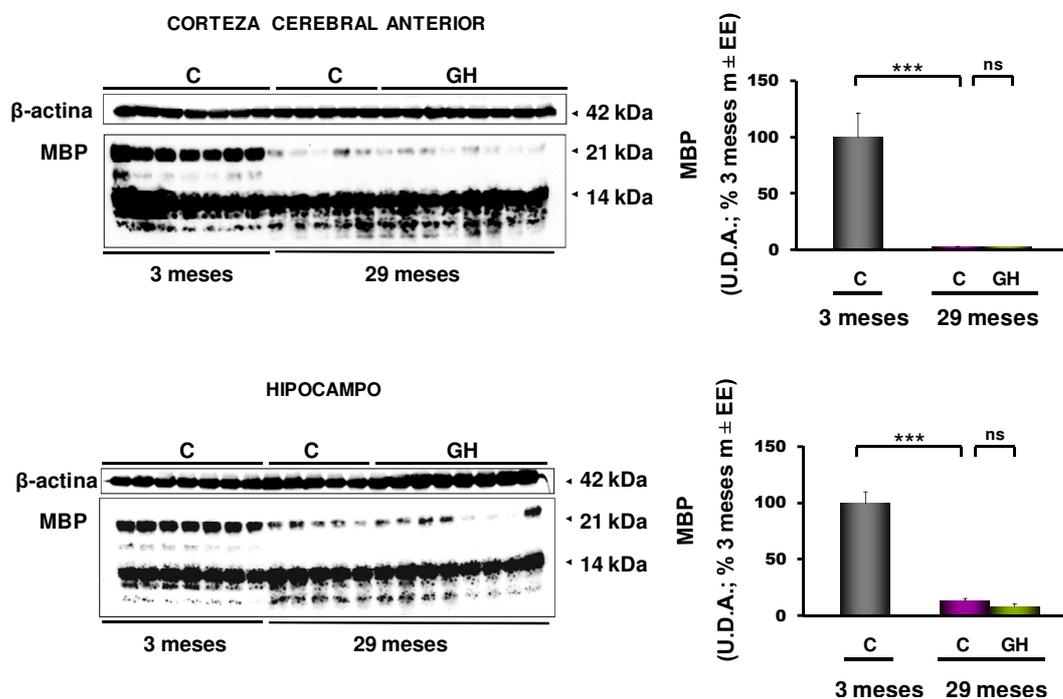


Figura 14. Efecto del tratamiento con GH s.c. sobre la expresión de MBP en diferentes áreas del cerebro. Western inmunoblot frente a MBP de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días). Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de la banda de 21 kDa de MBP corregida por β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ***, $p < 0,001$; ns, no significativo.

2.3.- Mediación del IGF-I en los efectos de GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

Diversas evidencias apoyan la posibilidad de que la GH ejerza acciones directas en el cerebro. Las acciones directas de GH en el SNC están avaladas por la presencia de su receptor en diversas áreas del cerebro, incluidas aquellas implicadas en la memoria y en la función cognitiva (Lobie et al., 1993; Nyberg, 2000), y por la evidencia de que la GH cruza la barrera hematoencefálica (Pan et al., 2005). Sin embargo, muchos de los efectos de GH están mediados por el IGF-I, factor con reconocidos efectos neuroprotectores (Fernandez et al., 1998, 1999; Carro et al., 2000, 2001). Por lo tanto, la GH puede actuar en cerebro directamente o a través de la inducción del IGF-I periférico o cerebral.

Con el objetivo de confirmar si la administración de GH s.c. ejercía o no una acción remielinizante en el cerebro de ratas viejas, seguimos el mismo diseño experimental que en el apartado anterior sólo que utilizando ratas más jóvenes (24 meses) y determinando la MBP por inmunohistoquímica, técnica más sensible que el Western immunoblot. Además, con la finalidad de definir el papel del IGF-I en el efecto de GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas, estudiamos la repercusión del bloqueo del R-IGF-I sobre la expresión de MBP en cerebro inducida por GH. Para ello en un grupo de ratas de 24 meses se bloqueó el R-IGF-I mediante la administración de JB-1 (10 ó 30 µg), antagonista del R-IGF-I, 30 minutos antes de la administración s.c. de GH (150 µg / 2 veces día) durante 7 días. Se analizó la expresión de MBP mediante inmunohistoquímica en diferentes áreas cerebrales.

Los resultados obtenidos se muestran en las fotografías correspondientes a las regiones de la comisura blanca anterior, del cuerpo calloso y del giro dentado del hipocampo de diferentes ratas de cada uno de los grupos experimentales (Figura 15). Se observa una marcada disminución en la expresión de MBP en la comisura blanca anterior, cuerpo calloso y en el giro dentado del hipocampo de las ratas viejas. El tratamiento con GH s.c. revirtió parcialmente los bajos niveles de expresión de MBP en el cerebro de las ratas viejas, cambio que no llegó a ser estadísticamente significativo. El bloqueo del R-IGF-I abolió la expresión de MBP inducida por GH en todas las áreas cerebrales estudiadas.

En las condiciones experimentales de este estudio se aprecia la tendencia de la acción remielinizante tras GH s.c. en el cerebro de las ratas viejas. Además, se confirma la mediación del IGF-I en el efecto remielinizante de GH.

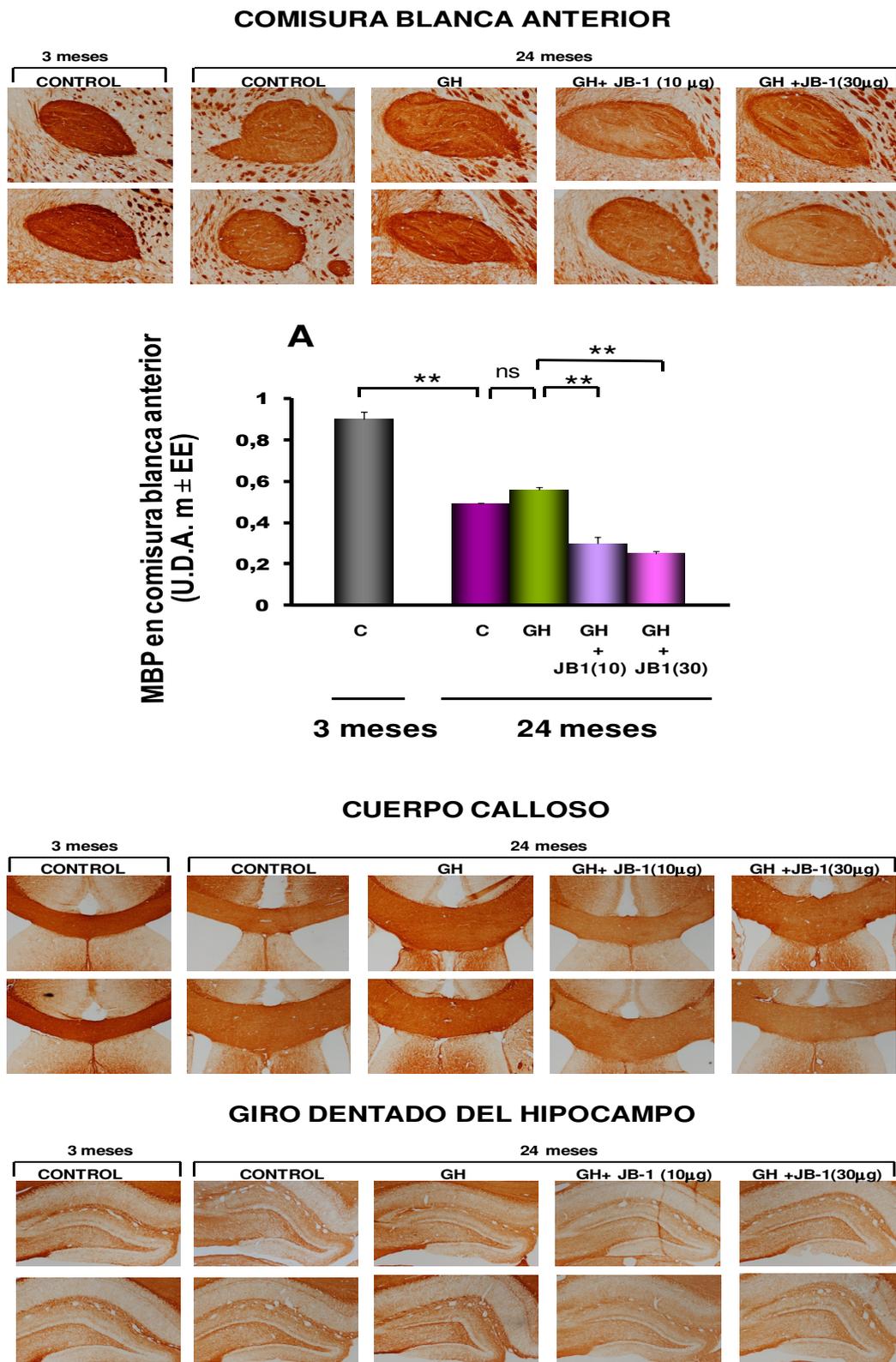


Figura 15. Efecto del tratamiento con GH y JB-1 sobre la expresión de MBP cerebral. Inmunohistoquímica frente a MBP en secciones de tejido cerebral de ratas adultas jóvenes (3m), ratas viejas (24m) control y ratas viejas tratadas con JB-1 (10 y 30 µg) previo a la administración de GH s.c. (150 µg/ 2 veces día/ 7 días). Las fotografías corresponden a las regiones de la comisura blanca anterior, cuerpo calloso y giro dentado del hipocampo. El diagrama representa la cuantificación densitométrica de la intensidad de la inmunotinción correspondiente a la comisura blanca anterior. Los resultados se expresan como media ± EE. **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

2.4.- Efecto de GH sobre la activación de CREB en el cerebro de ratas viejas

La GH es una de las señales extracelulares implicadas en la regulación de la transcripción mediada por CREB (Cui et al., 2008). En los resultados expuestos en un apartado anterior demostramos que la GH activa CREB en cultivos de células cerebrocorticales. El descenso de GH en el envejecimiento podría contribuir a la disminuida activación de CREB observada en el SNC de roedores (Foster et al., 2001; Hattiangady et al., 2005; Williams et al., 2008). Estos antecedentes nos llevaron a evaluar el papel de GH en la activación de CREB en el cerebro de la rata vieja.

Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 μ g / 2 veces al día) durante 7 días. Se determinó la activación de CREB por Western inmunoblot en la corteza cerebral anterior e hipocampo.

Como se muestra en la Figura 16, existe una pronunciada disminución de la activación de CREB en la corteza cerebral anterior e hipocampo de las ratas viejas. La administración de GH s.c. a ratas viejas no modificó la activación de CREB ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo.

Estos resultados indican que, en nuestras condiciones experimentales, la GH no activa la fosforilación de CREB en el cerebro de la rata envejecida.

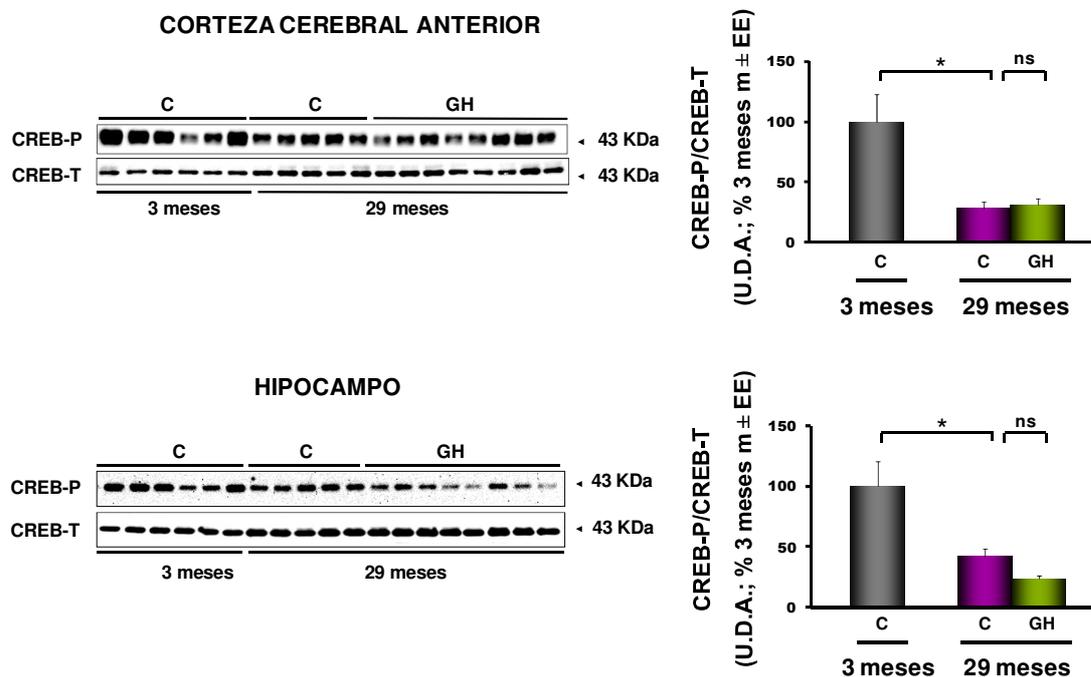


Figura 16. Efecto de GH sobre la activación de CREB. Inmunoblots frente a CREB de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días). Se muestran las autorradiografías de Western inmunoblots representativos realizados con un anticuerpo específico frente a la forma fosforilada, CREB-P (paneles superiores). Las mismas membranas se incubaron con un anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada, CREB-T (paneles inferiores). Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de CREB-P corregida por la forma no fosforilada de CREB-T. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; ns, no significativo.

C.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GHRP-6 SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENÉISIS

1.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE OD EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS.

La información disponible sobre el papel de los GHS y ghrelina en oligodendrogénesis y mielinización del SNC es escasa. Estudios previos han demostrado la presencia del R-GHS1a en oligodendrocitos (Lee, Chung, et al., 2010). En un modelo de lesión medular el tratamiento con ghrelina mejora la recuperación funcional inhibiendo la apoptosis de los oligodendrocitos (Lee, Chung, et al., 2010; Lee et al., 2011). Además, se ha observado una relación entre los GHS y otros factores implicados en la mielinización del SNC como el IGF-I y el BDNF (Frago et al., 2002; Lee, Chung, et al., 2010).

Estos antecedentes nos llevaron a estudiar el papel de los GHS en el proceso de mielinización del cerebro de rata durante el desarrollo embrionario. Con este objetivo, células cerebrocorticales embrionarias se expusieron a diferentes concentraciones de GHRP-6 (10^{-5} M a 10^{-9} M).

En la Figura 17, se muestran los resultados del efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de GHRP-6 sobre la expresión de MBP en cultivos de células cerebrocorticales embrionarias. Como se observa en las fotografías, el tratamiento con GHRP-6 indujo la expresión de MBP a todas las concentraciones estudiadas (10^{-5} M a 10^{-9} M), observándose un efecto dosis-respuesta con un pico máximo a concentraciones de 10^{-8} M y un menor efecto a concentraciones superiores o inferiores.

MBP

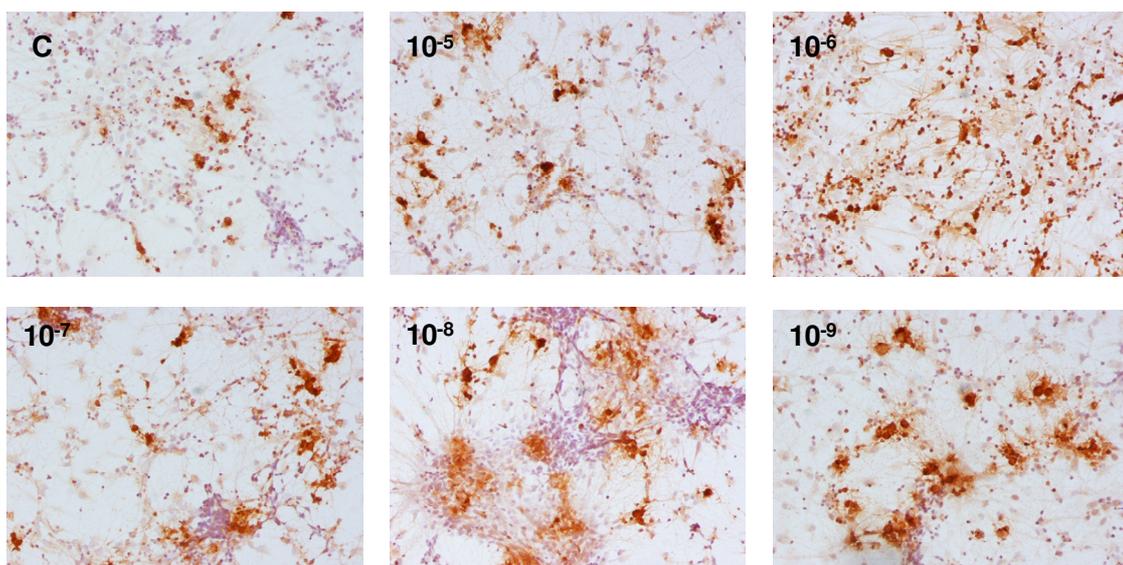


Figura 17: Efecto del tratamiento con GHRP-6 sobre la expresión de MBP en células cerebrocorticales embrionarias. Estudio inmunocitoquímico. Después de 8 DIV, las células cerebrocorticales fueron incubadas con distintas concentraciones de GHRP-6 (10^{-5} M a 10^{-9} M) durante 4 días. El análisis inmunocitoquímico se efectuó con un anticuerpo monoclonal frente a MBP.

Estos resultados evidencian por primera vez que GHRP-6 es capaz de promover la oligodendrogénesis en el cerebro durante el desarrollo embrionario y sugieren que la ghrelina pueda jugar un papel relevante en el proceso de mielinización del cerebro durante este periodo.

2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

2.1.- Efecto del tratamiento con GHRP-6 subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

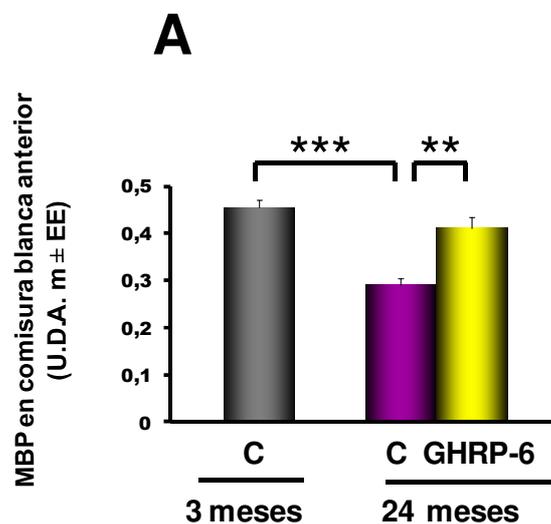
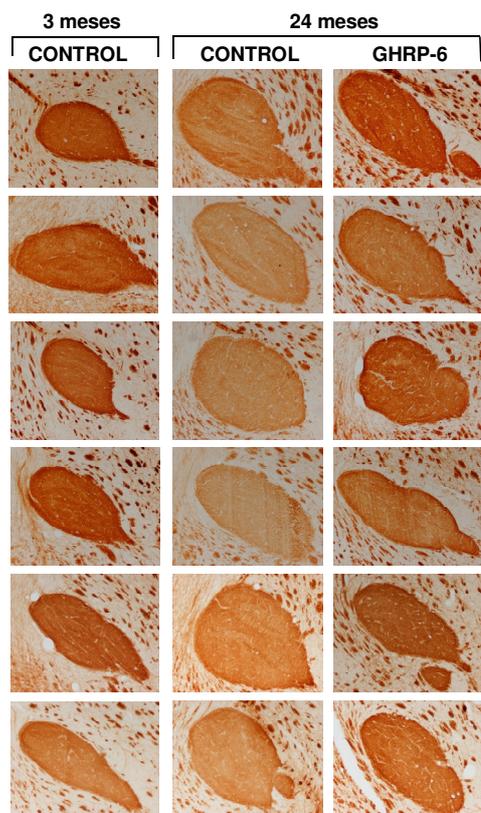
La activación por GH de la remielinización del cerebro de ratas viejas junto con el estímulo por GHRP-6 del proceso de oligodendrogénesis *in vitro* nos llevó a estudiar el efecto del tratamiento con GHRP-6 *in vivo* sobre la hipomielinización del cerebro de ratas viejas. Con este objetivo un grupo de ratas viejas de 24 meses de edad se trataron con GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día) durante 15 días.

En la Figura 18 se muestran las fotografías correspondientes a las regiones de la comisura blanca anterior, del cuerpo calloso y del giro dentado del hipocampo de diferentes ratas de cada uno de los grupos experimentales. Como en los estudios previos, se observa una marcada disminución en la expresión de MBP en la comisura blanca anterior, el cuerpo calloso y el giro dentado del hipocampo de las ratas viejas. En todas las áreas estudiadas el tratamiento con GHRP-6 s.c. incrementó el nivel de expresión de MBP en ratas viejas, llegando en algunas ratas a ser similar al existente en ratas adultas jóvenes.

Con el fin de confirmar los cambios en la expresión de MBP observados tras el tratamiento con GHRP-6 detectados por inmunohistoquímica, se realizó un nuevo estudio donde se analizó la expresión de MBP por Western immunoblot. Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses de edad se trató con GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día) durante 15 días. Como se observa en la Figura 19, existe una clara disminución de los niveles de la isoforma de 21 kDa de MBP en las ratas viejas, tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo. El tratamiento con GHRP-6 incrementó significativamente la expresión de la isoforma de 21 kDa en la corteza cerebral anterior, sin provocar cambios en el hipocampo.

Estos resultados son la primera evidencia de que GHRP-6 promueve la remielinización en el cerebro de ratas viejas.

COMISURA BLANCA ANTERIOR



CUERPO CALLOSO



GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO

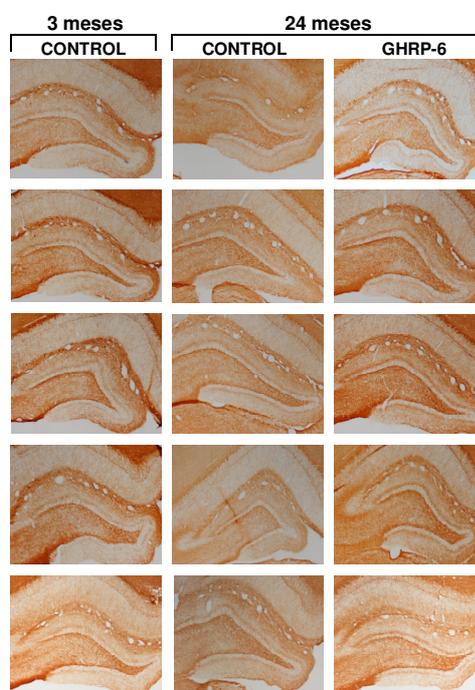


Figura 18. Efecto del tratamiento con GHRP-6 s.c. sobre la expresión de MBP en diferentes áreas del cerebro. Inmunohistoquímica frente a MBP en secciones de tejido cerebral de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (24m) controles y tratadas con GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Las fotografías corresponden a la comisura blanca anterior, cuerpo calloso y giro dentado del hipocampo. Se representa en A la cuantificación de la densidad óptica de la tinción de MBP en la comisura blanca anterior en los tres grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± EE. **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$.

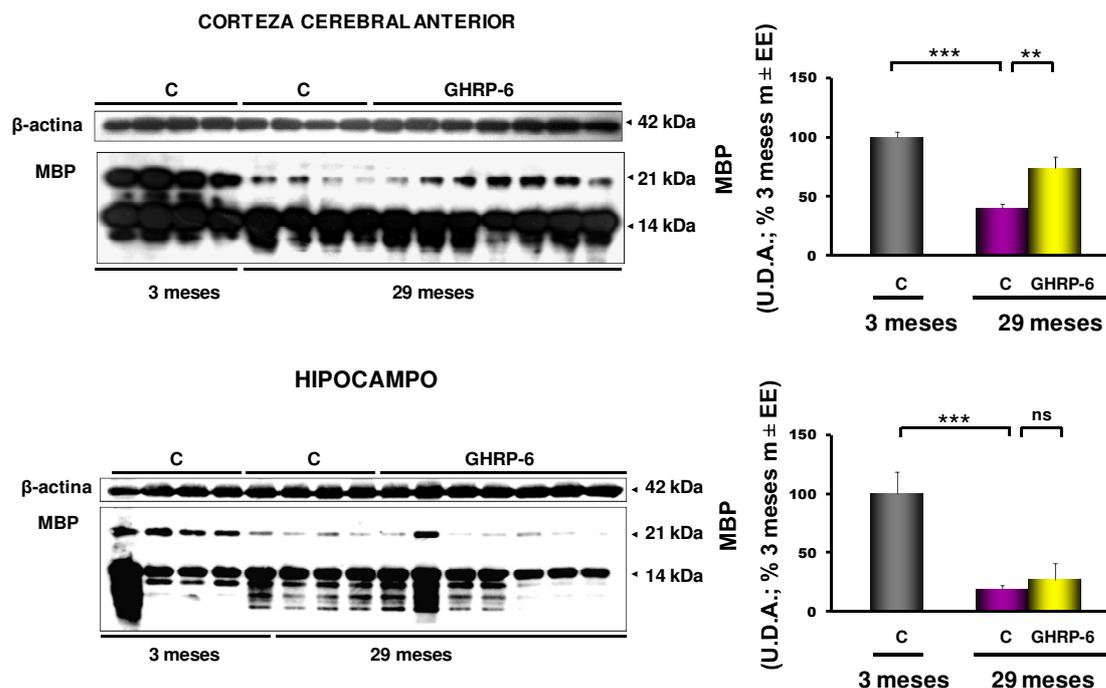


Figura 19. Efecto del tratamiento con GHRP-6 s.c. sobre la expresión de MBP en el cerebro. Inmunoblot frente a MBP de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (29m) controles y tratadas con GHRP-6 s.c (20 μ g/Kg / 2 veces día / 15 días). Autorradiografías correspondientes a Western inmunoblot representativos realizados con un anticuerpo específico frente a MBP. Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de la banda de 21 kDa de MBP corregida por β -actina, y en porcentaje con respecto al grupo de 3 meses. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, no significativo.

2.2.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por GHRP-6 en el cerebro de ratas viejas

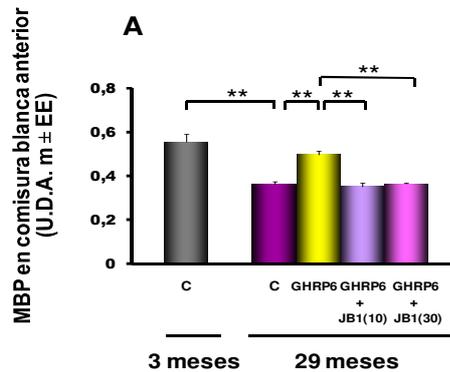
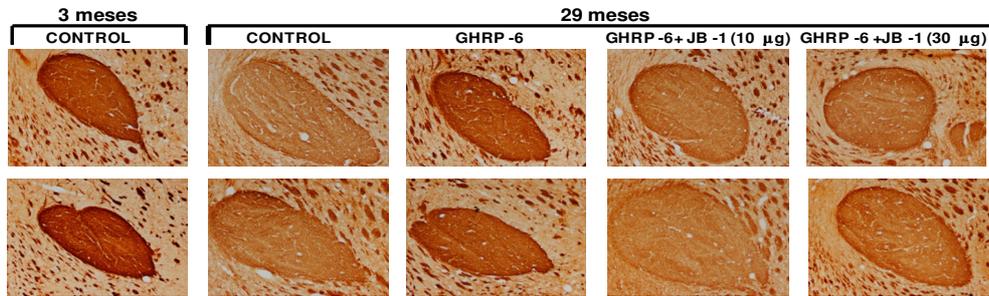
La acción remielinizante de GHRP-6 observada en el cerebro podría estar mediada por la activación del sistema GH/IGF-I a nivel hipofisario o de otras áreas cerebrales.

Con la finalidad de investigar un posible papel del IGF-I en el efecto de GHRP-6 sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas, se estudió la repercusión del bloqueo del R-IGF-I sobre la expresión de MBP en cerebro inducida por GHRP-6. Para ello, 30 minutos antes de la administración de GHRP-6 se bloqueó el R-IGF-I mediante la administración del antagonista de IGF-I JB-1(10 ó 30 μ g).

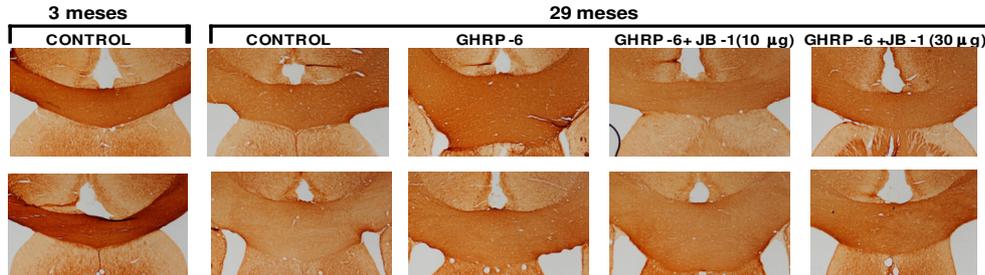
En la Figura 20 se muestran fotografías correspondientes a las regiones de la comisura blanca anterior, del cuerpo calloso y del giro dentado del hipocampo de diferentes ratas de cada uno de los grupos experimentales. Se observa una marcada disminución en la expresión de MBP en la comisura blanca anterior, cuerpo calloso y giro dentado del hipocampo de las ratas viejas. De nuevo confirmamos que el tratamiento con GHRP-6 s.c. revierte los bajos niveles de expresión de MBP en el cerebro de las ratas viejas. El bloqueo del R-IGF-I abole la acción remielinizante de GHRP-6 a las dos dosis estudiadas de 10 y 30 μ g.

Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto de GHRP-6 sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas está mediado por IGF-I.

COMISURA BLANCA ANTERIOR



CUERPO CALLOSO



GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO

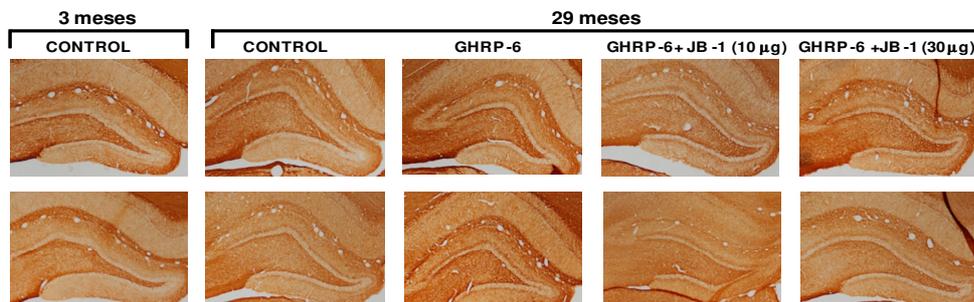


Figura 20. Efecto del tratamiento con GHRP-6 y JB-1 sobre la expresión de MBP en diferentes áreas del cerebro. Inmunohistoquímica frente a MBP en secciones de tejido cerebral de ratas adultas jóvenes (3m), ratas viejas (29m) control y ratas viejas tratadas con JB-1(10 µg y 30 µg) previo a la administración de GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día/ 15 días). Las fotografías corresponden a las regiones de la comisura blanca anterior, cuerpo calloso y giro dentado del hipocampo. Se representa en A la cuantificación de la densidad óptica de la tinción de MPB en la comisura blanca anterior en los diferentes grupos experimentales. Los resultados se expresan como media ± EE. **, $p < 0,01$.

3.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS

El papel de los GHS en la activación de CREB ha sido poco explorado. Estudios recientes donde se evidencia que tanto la ghrelina (Ma et al., 2011) como GHRP-6 (Tian et al., 2010) activan CREB, sugieren un papel de los GHS en la transcripción mediada por CREB. Estos antecedentes nos llevaron a estudiar si GHRP-6 podría activar la fosforilación de CREB en el cerebro de la rata vieja.

Con este objetivo, un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces día) durante 15 días. Finalizado el tratamiento se determinó la activación de CREB por Western inmunoblot en la corteza cerebral anterior e hipocampo.

Como se observa en la Figura 21, la administración de GHRP-6 a ratas viejas no modificó la disminuida activación de CREB ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo.

Estos resultados indican que en nuestras condiciones experimentales GHRP-6 no activa la fosforilación de CREB en el cerebro de la rata vieja.

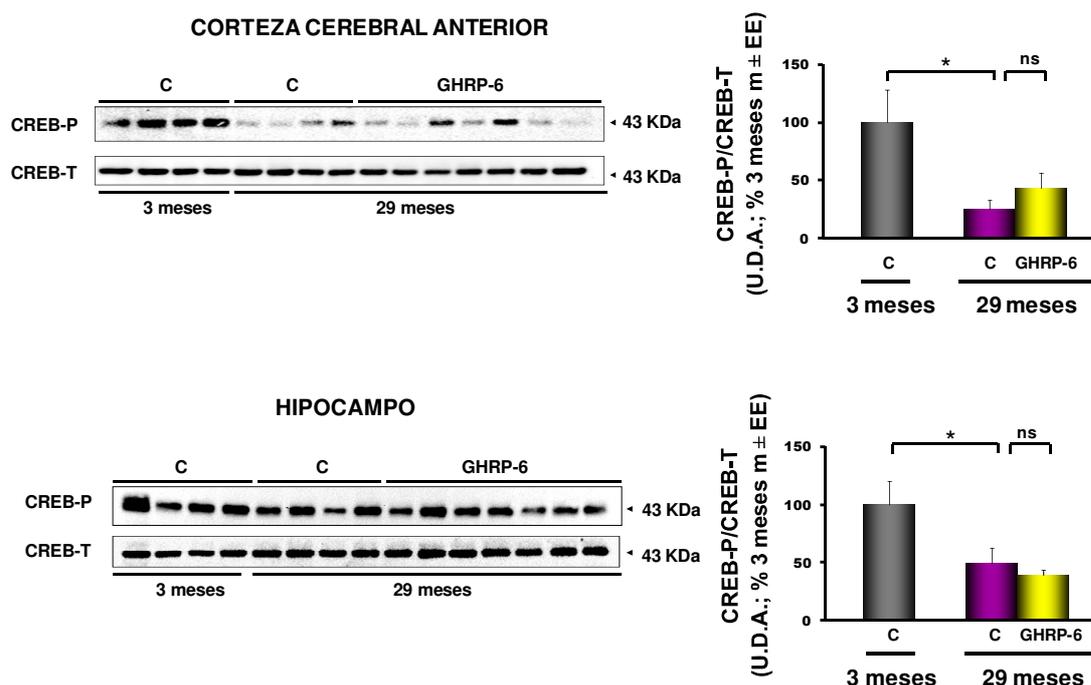


Figura 21. Efecto de GHRP-6 sobre la activación del factor de transcripción CREB en el cerebro. Inmunoblot frente a CREB de extractos proteicos de la corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (29m) controles y tratadas con GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg/ 2 veces día / 15 días). Se muestran las autorradiografías de Western inmunoblots representativos realizados con un anticuerpo específico frente a la forma fosforilada, CREB-P (paneles superiores). Las mismas membranas se incubaron con un anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada, CREB-T (paneles inferiores). Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de CREB-P corregida por la forma no fosforilada de CREB-T. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; ns, no significativo.

D.- ALTERACIONES DE BDNF RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO

1.- Expresión del ARNm de BDNF en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Numerosos estudios han implicado a BDNF en los procesos que regulan la mielinización tanto en el SNC como en el SNP (McTigue et al., 1998; Chan et al., 2001; Cosgaya et al., 2002; Hempstead y Salzer, 2002; Notterpek, 2003; Tolwani et al., 2004). El efecto del envejecimiento en la expresión del ARNm de BDNF y de su proteína en cerebro es controvertido. En función de la especie, el área estudiada y la técnica de cuantificación utilizada se han descrito aumentos (Kato-Semba et al., 1998), disminuciones (Narisawa-Saito y Nawa, 1996; Hayashi et al., 1997; Croll et al., 1998; Murer et al., 2001; Hattiangady et al., 2005; Silhol et al., 2005) o no alteraciones (Croll et al., 1998; Kato-Semba et al., 1998; Webster et al., 2002; Bimonte et al., 2003) de su expresión.

Estudios previos indican la existencia de una interrelación entre BDNF y el sistema GH/IGF-I. Se ha observado que la infusión periférica de IGF-I produce un aumento cualitativo en la inmunotinción de BDNF en el hipocampo (Carro et al., 2001), e incluso revierte parcialmente la disminución de BDNF debida a una lesión (Kazanis et al., 2004). El tratamiento con ghrelina induce la expresión de BDNF en el hipocampo (Ma et al., 2011). Estos antecedentes nos indujeron a analizar la expresión de BDNF en el cerebro de ratas viejas y su posible modulación por GH o GHRP-6.

Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 µg / 2 veces día) durante 7 días o con GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día) durante 15 días. Se analizó la expresión del ARNm de BDNF por PCR a tiempo real en la corteza cerebral anterior e hipocampo.

Como se observa en la Figura 22 tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo los niveles del ARNm de BDNF en ratas viejas fueron significativamente menores que en las ratas adultas jóvenes. El tratamiento con GH incrementó la expresión del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior, mientras que GHRP-6 la disminuyó. No se observó ningún efecto sobre la expresión del ARNm de BDNF en el hipocampo tras el tratamiento con GH o GHRP-6.

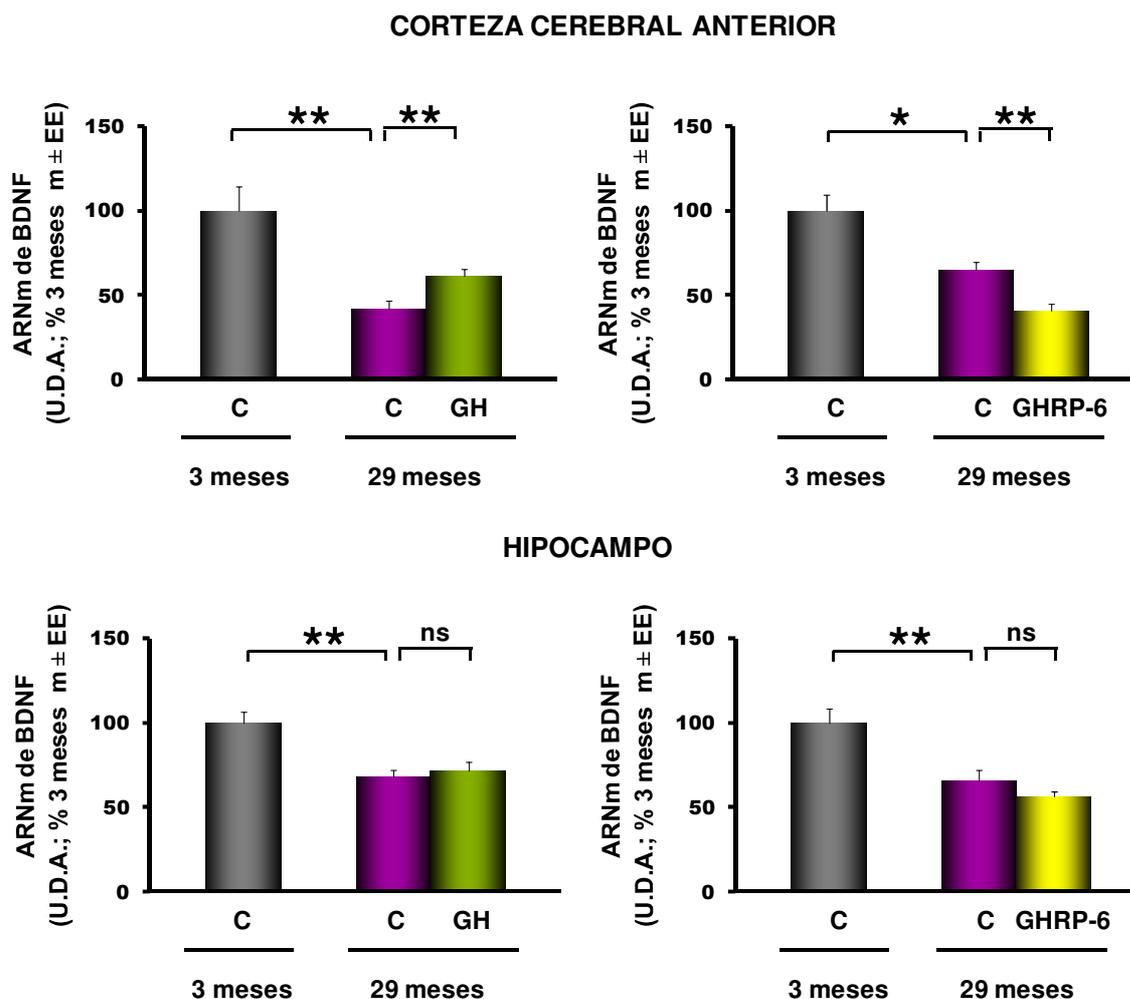


Figura 22. Expresión del ARNm de BDNF en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c (20 μ g/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

2.- Expresión del ARNm de BDNF en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Aunque la presencia de BDNF y de su receptor TrkB en la hipófisis se evidenció hace más de una década (Kononen et al., 1995; Conner et al., 1996; Höpker et al., 1997) su función no está claramente definida. Se ha sugerido que el BDNF de la hipófisis anterior está involucrado en el control de la función tiroidea (Rage et al., 2007) así como en la regulación del eje hipofisio-adrenal (Kononen et al., 1995). No existe consenso sobre las alteraciones en la expresión del ARNm de BDNF y de su proteína en la hipófisis durante el envejecimiento.

En este estudio hemos investigado los cambios en la expresión del ARNm de BDNF hipofisario relacionados con el envejecimiento y su posible regulación por manipulaciones del eje somatotropo. Para ello hemos utilizado el diseño experimental expuesto en el anterior apartado.

En la Figura 23 se muestran los niveles del ARNm de BDNF en la hipófisis en el envejecimiento y el efecto del tratamiento con GH o GHRP-6. De acuerdo con algunos estudios previos (Rage et al., 2007) observamos un aumento de la expresión del ARNm de BDNF en la hipófisis de ratas viejas que disminuyó tras el tratamiento con GH pero no con GHRP-6.

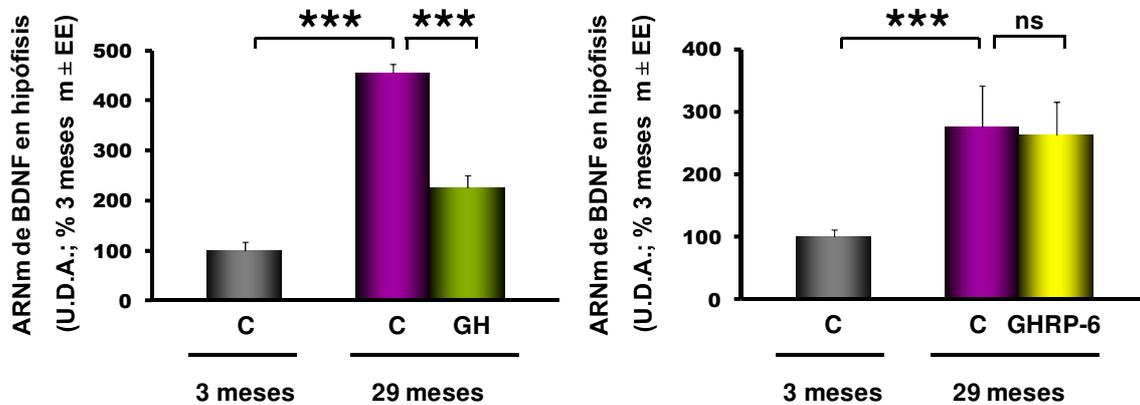


Figura 23. Expresión del ARNm de BDNF en la hipófisis. Cuantificación de los niveles del ARNm de BDNF mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ***, $p < 0,001$; ns, no significativo.

Estos resultados indican que el envejecimiento induce cambios en la expresión del ARNm de BDNF que son específicos de tejido, aumentando en la hipófisis y disminuyendo en las áreas cerebrales estudiadas.

El tratamiento con GH, pero no con GHRP-6, revierte los cambios en la expresión del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior e hipófisis, lo que sugiere una relación entre GH y BDNF en ambos órganos, y evidencia que la GH regula la expresión de BDNF en el envejecimiento

E.- ALTERACIONES INFLAMATORIAS EN EL CEREBRO RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO

1.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6

El envejecimiento cerebral se ha asociado con un cierto grado de inflamación crónica. Estudios previos han evidenciado un aumento relacionado con la edad en la expresión de ciertas citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , principalmente en el hipocampo y en áreas concretas de la corteza cerebral (Murray et al., 1997; Ye y Johnson, 1999; Terao et al., 2002; Katafuchi et al., 2003; Xie et al., 2003; Bodles y Barger, 2004; Maher et al., 2004; Sandhir et al., 2004; Nolan et al., 2005; Sierra et al., 2007). La inflamación crónica subyacente en el SNC puede favorecer el proceso desmielinizante que se observa en el cerebro envejecido. En este sentido, estudios *in vitro* han demostrado que el TNF- α induce desmielinización (Selmaj y Raine, 1988). La esclerosis múltiple, proceso inflamatorio cerebral, cursa con desmielinización del SNC.

Durante las últimas décadas numerosos estudios han puesto de manifiesto una íntima relación entre el sistema endocrino y el sistema inmune (Hattori, 2009). Aunque se conoce que la GH ejerce diversas funciones sobre las células y órganos del sistema inmune (Hattori, 2009), su papel etiopatológico es controvertido. Los GHS, además de inducir la secreción de GH, ejercen potentes efectos en la regulación de la inflamación y de las citoquinas inflamatorias (Taub, 2008; Hattori, 2009) inhibiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α en diversos modelos experimentales.

1.1.- Expresión del ARNm de la IL-1 β en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Estos antecedentes nos llevaron a estudiar el patrón de expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en la corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas viejas y a evaluar el efecto del tratamiento con GH y GHRP-6 sobre estos parámetros.

Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 μ g / 2 veces al día) durante 7 días o con GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces al día) durante 15 días. Una vez finalizado el tratamiento se valoraron los niveles de los ARNms de la IL-1 β , IL-10 y el TNF- α en la corteza cerebral anterior y en el hipocampo mediante PCR a tiempo real.

Como se muestra en la Figura 24, los niveles del ARNm de la IL-1 β no se modifican en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas pero sí en el hipocampo, donde aparecen significativamente aumentados. El tratamiento con GH produjo un incremento significativo en los niveles del ARNm de IL-1 β tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo de las ratas viejas. Por el contrario, GHRP-6 no modificó los niveles del ARNm de la IL-1 β en la corteza cerebral anterior mientras que produjo una disminución en el hipocampo.

Nuestros resultados confirman un aumento asociado con la edad de la IL-1 β en el hipocampo sin observarse cambios significativos en la corteza cerebral anterior y sugieren un papel estimulador de la GH de la expresión de la IL-1 β en ambas áreas cerebrales. Por el contrario, los efectos observados tras el tratamiento con GHRP-6 sugieren que GHRP-6 pueda atenuar los cambios inflamatorios relacionados con la edad que ocurren en el hipocampo.

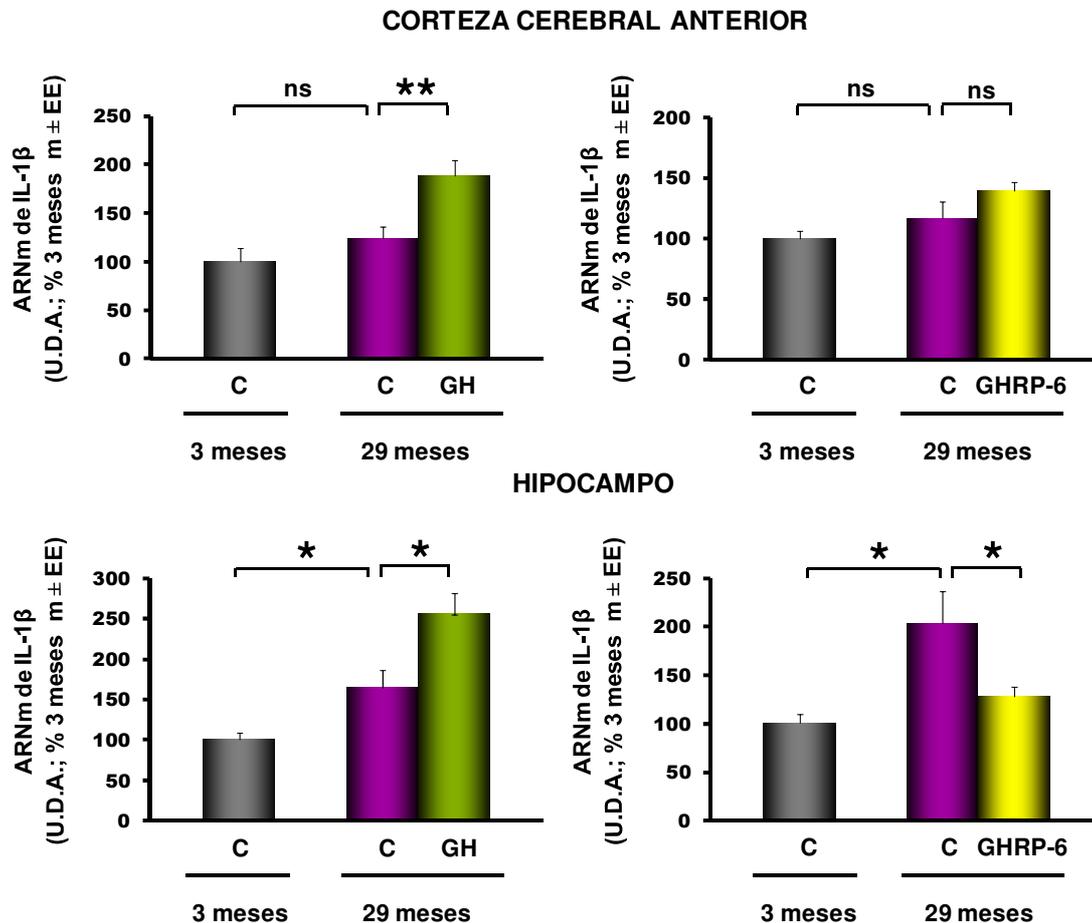


Figura 24. Expresión del ARNm de la IL-1 β en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de la IL-1 β en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3 m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

1.2.- Expresión del ARNm de TNF- α en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

No se observaron cambios significativos relacionados con el envejecimiento en la expresión del ARNm de TNF- α ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo (Figura 25). El tratamiento con GH produjo un aumento significativo en los niveles del ARNm de TNF- α en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas pero no en el hipocampo. Sin embargo, el

tratamiento con GHRP-6 no modificó significativamente los niveles del ARNm de TNF- α en ninguna de las áreas estudiadas.

Estos resultados indican que la expresión de TNF- α en el cerebro de ratas viejas no se altera en las áreas cerebrales estudiadas. El tratamiento con GH, pero no con GHRP-6, induce la expresión del ARNm de TNF- α en la corteza cerebral anterior.

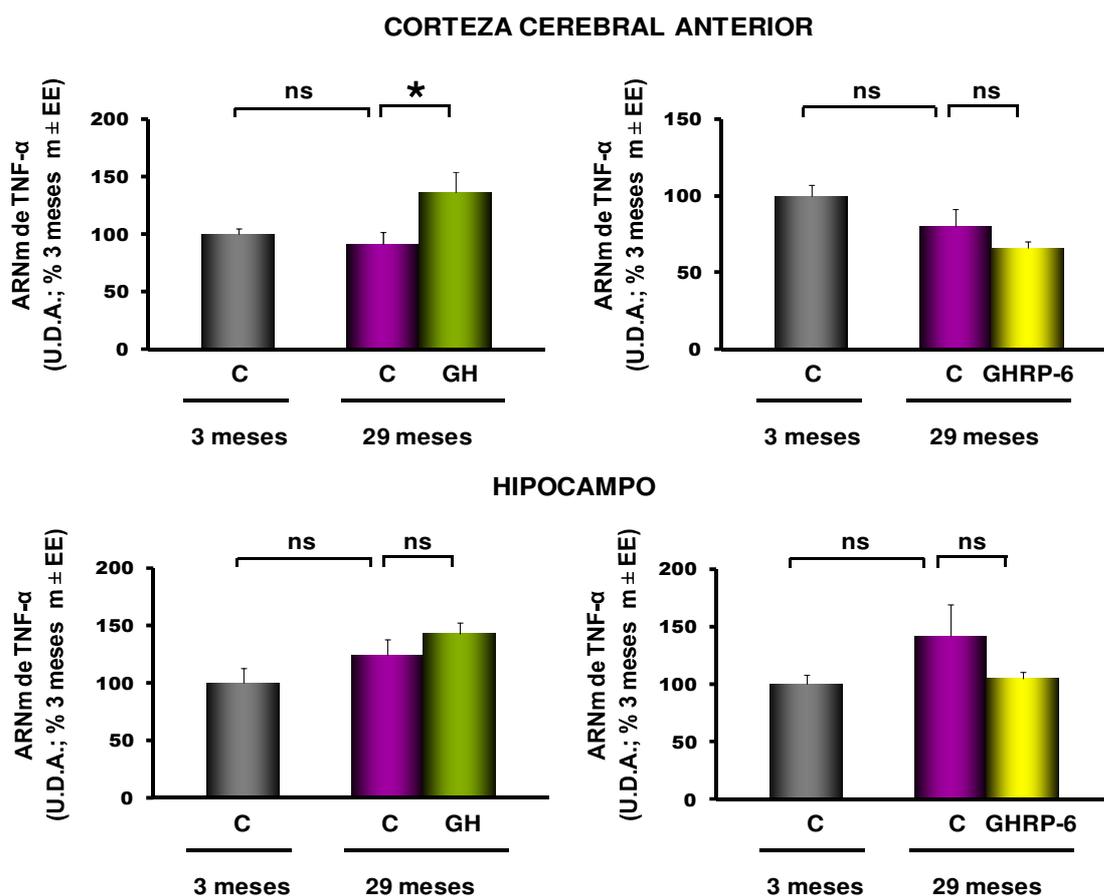


Figura 25. Expresión del ARNm de TNF- α en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de TNF- α en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μ g / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; ns, no significativo.

1.3.- Expresión del ARNm de la IL-10 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

En la Figura 26 se muestran los resultados del tratamiento con GH o GHRP-6 sobre la expresión del ARNm de la IL-10. Se observa una tendencia a una disminución de la expresión de la IL-10 en el cerebro de la rata vieja junto con un cierto estímulo tras el tratamiento con GH y, sobre todo, con GHRP-6. Ninguno de estos cambios son significativos dada la dispersión de los datos.

Estos resultados sugieren que la expresión de la IL-10 no se altera significativamente, al menos en las áreas cerebrales estudiadas, durante el envejecimiento. El tratamiento con GH o GHRP-6 no modifica la expresión de la IL-10 en las áreas cerebrales analizadas.

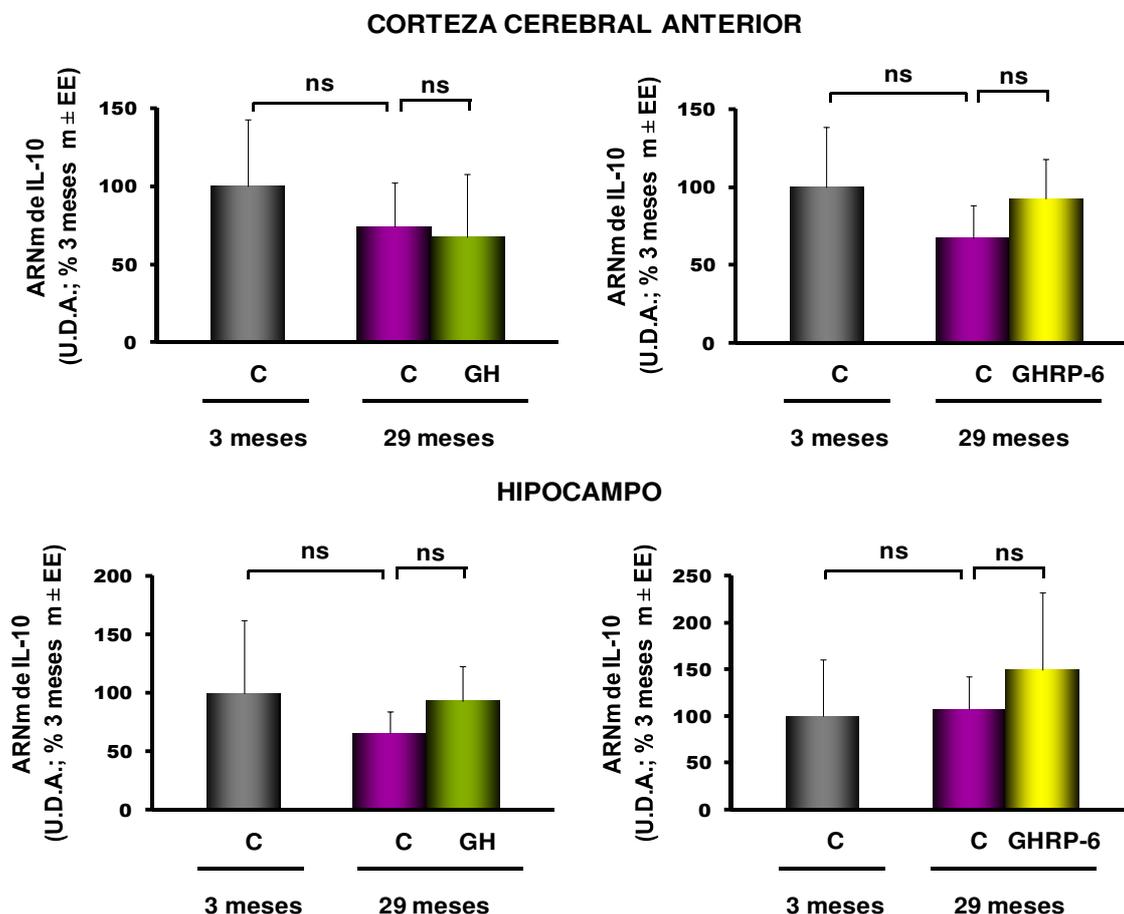


Figura 26. Expresión del ARNm de la IL-10 en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de la IL-10 en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ns, no significativo.

1.4.- Expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

CXCL12 se expresa constitutivamente en el SNC donde participa en el proceso de mielinización durante el desarrollo (Stumm et al., 2003). Además, se ha observado que la señalización mediada por CXCL12 y su receptor CXCR4, regula la migración, proliferación y diferenciación de precursores neurales en el SNC tras lesiones desmielinizantes (Carbajal et al., 2010; Patel et al., 2010). Los resultados expuestos en anteriores apartados indican que tanto la administración de GH como la de GHRP-6 es capaz de revertir la disminución de la expresión de MBP cerebral observada en animales viejos, lo que implica una activación del proceso de remielinización del cerebro en el que CXCL12 podría estar implicado.

Basados en estos antecedentes nos propusimos estudiar el patrón de expresión de CXCL12 en la corteza cerebral anterior e hipocampo de las ratas viejas e investigar el efecto de GH o GHRP-6 sobre este parámetro.

Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 μg / 2 veces al día) durante 7 días o con GHRP-6 s.c. (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ / 2 veces al día) durante 15 días. Una vez finalizado el tratamiento se valoraron los niveles del ARNm de CXCL12 en la corteza cerebral anterior y en el hipocampo mediante PCR a tiempo real.

Como se muestra en la Figura 27, el envejecimiento no alteró los niveles del ARNm de CXCL12 ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Tampoco el tratamiento con GH o con GHRP-6 produjo cambios significativos en los niveles del ARNm de CXCL12 en dichas áreas.

Estos resultados muestran que el envejecimiento no afecta a la expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro. El tratamiento con GH o GHRP-6 no produce ningún cambio en los niveles de CXCL12, lo que sugiere que CXCL12 no participa en la remielinización observada con estos tratamientos.

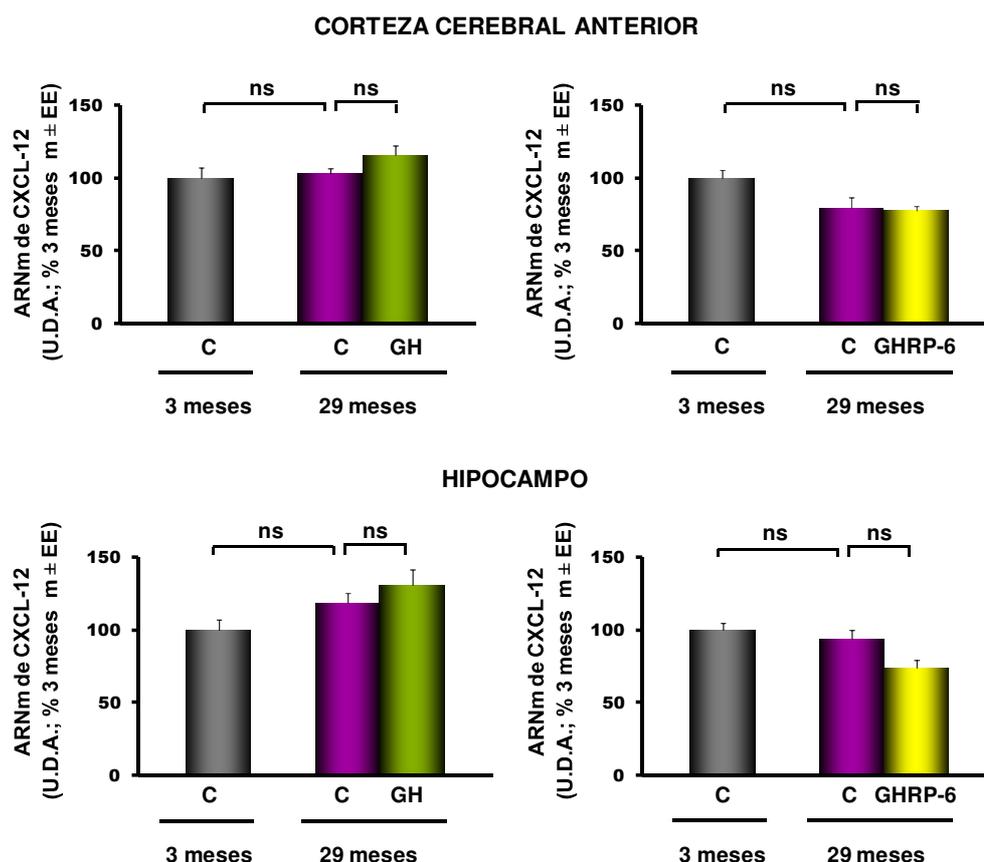


Figura 27. Expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de CXCL12 en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ns, no significativo.

2.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN LA HIPÓFISIS DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6

2.1.- Expresión de los ARNms de IL-1 β y TNF- α en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Los sistemas inmune y endocrino mantienen una comunicación bidireccional. Al igual que las células inmunes, las células neuroendocrinas segregan citoquinas y expresan sus receptores. Está bien establecido que tanto la IL-1 β como el TNF- α pueden modular directamente la secreción de la GH a través de receptores específicos en el hipotálamo y en la hipófisis (Dinarelli et al., 1986; Uehara et al., 1987; Scarborough, 1990; Elsasser et al., 1991). Por otro lado, se cree que la GH también modula la secreción de citoquinas (Bozzola et al., 2003).

En esta parte del estudio analizamos el patrón de expresión de las citoquinas IL-1 β y TNF- α en la hipófisis de ratas viejas y evaluamos el efecto de la GH y el GHRP-6.

Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 μ g/2 veces al día) durante 7 días o con GHRP-6 s.c. (20 μ g/Kg / 2 veces al día) durante 15 días. Una vez finalizado el tratamiento se valoraron los niveles de los ARNms de la IL-1 β y el TNF- α en la hipófisis mediante PCR a tiempo real.

Como se muestra en la Figura 28 no se observaron diferencias en la expresión de los ARNms de la IL-1 β y TNF- α en la hipófisis entre las ratas adultas jóvenes y las ratas viejas. El tratamiento con GH produjo un aumento significativo en los niveles de los ARNms de la IL-1 β y el TNF- α en la hipófisis de las ratas viejas, mientras que el tratamiento con GHRP-6 aumentó significativamente los niveles del ARNm de la IL-1 β pero no los del TNF- α .

Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de los ARNms de la IL-1 β y del TNF- α en la hipófisis no sufren alteraciones asociadas al envejecimiento. La inducción de la expresión de la IL-1 β por GH y GHRP-6 y del TNF- α por GH pone de manifiesto una gran sensibilidad del patrón inflamatorio hipofisario a GH y a GHRP-6 durante el envejecimiento.

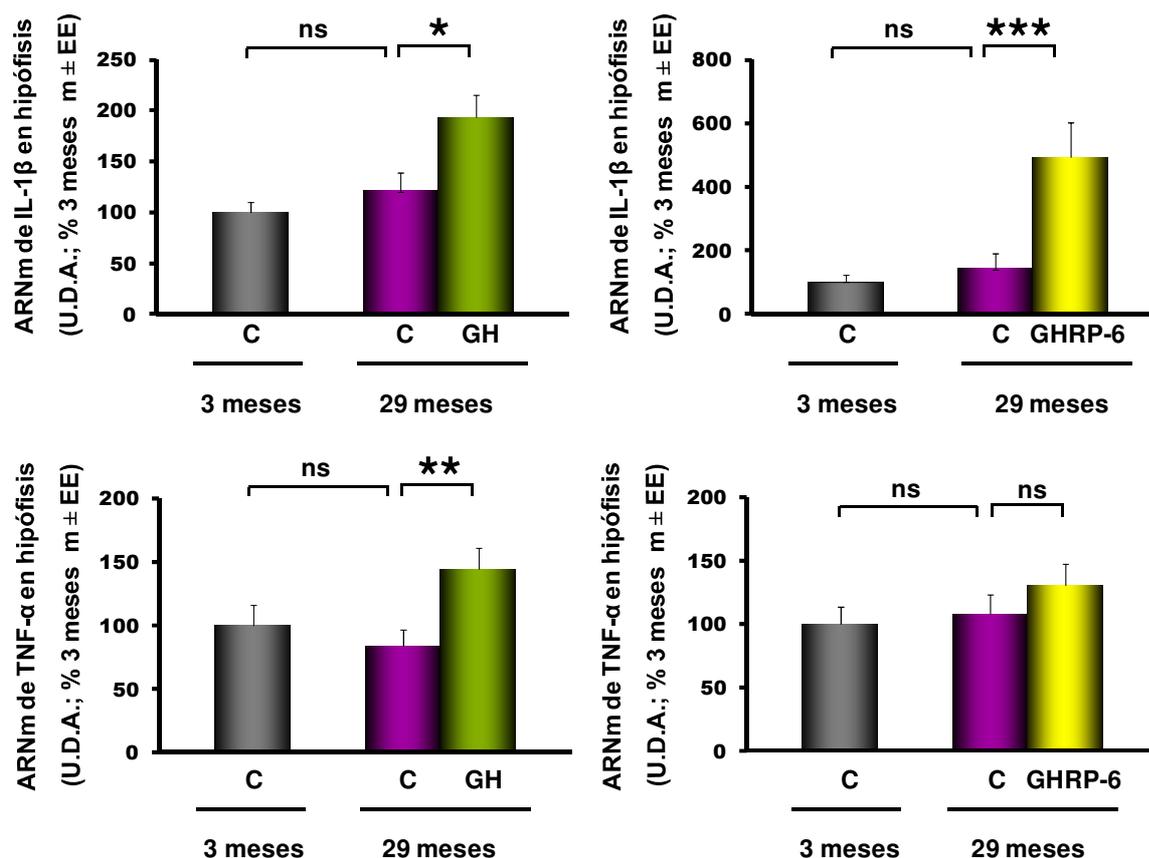


Figura 28. Expresión de los ARNm de IL-1β y TNF-α en la hipófisis. Cuantificación de los niveles de los ARNm de IL-1β y TNF-α en la hipófisis mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, p<0,05; **, p < 0,01, ***, p<0,001; ns, no significativo.

2.2.- Expresión del ARNm de CXCL12 en la hipófisis en ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Aunque su papel fisiológico no está definido, algunos estudios han evidenciado que la interacción entre CXCL12 y CXCR4 interviene en la regulación de la secreción hormonal de la hipófisis anterior (Florio et al., 2006; Massa et al., 2006) y en particular de GH (Lee et al., 2008). Se ha demostrado la expresión de CXCR4 en células somatotropas. *In vitro* en células hipofisarias normales y células tumorales GH4C1 y GH3 se ha observado la participación de CXCL12 en la regulación de la secreción de GH y en la proliferación de células somatotropas normales y tumorales (Lee et al., 2008). Se ha sugerido su implicación en la etiopatogenia de adenomas hipofisarios (Barbieri et al, 2007). Aunque recientemente Horiguchi et al. (2012) ha demostrado la expresión de CXCL12 en células de la hipófisis anterior, se desconoce el efecto del envejecimiento en su expresión hipofisaria.

En esta parte del estudio nos propusimos analizar el patrón de expresión de CXCL12 en la hipófisis de ratas viejas y su posible regulación por GH o GHRP-6. Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 µg / 2 veces al día) durante 7 días o

con GHRP-6 s.c. (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ / 2 veces al día) durante 15 días. Una vez finalizado el tratamiento se valoraron los niveles del ARNm de CXCL12 en la hipófisis de rata mediante PCR a tiempo real.

Como se muestra en la Figura 29 el envejecimiento va acompañado de un aumento significativo de los niveles del ARNm de CXCL12 en la hipófisis de ratas viejas. Ni el tratamiento con GH ni con GHRP-6 modificó la expresión del ARNm de CXCL12 en la hipófisis.

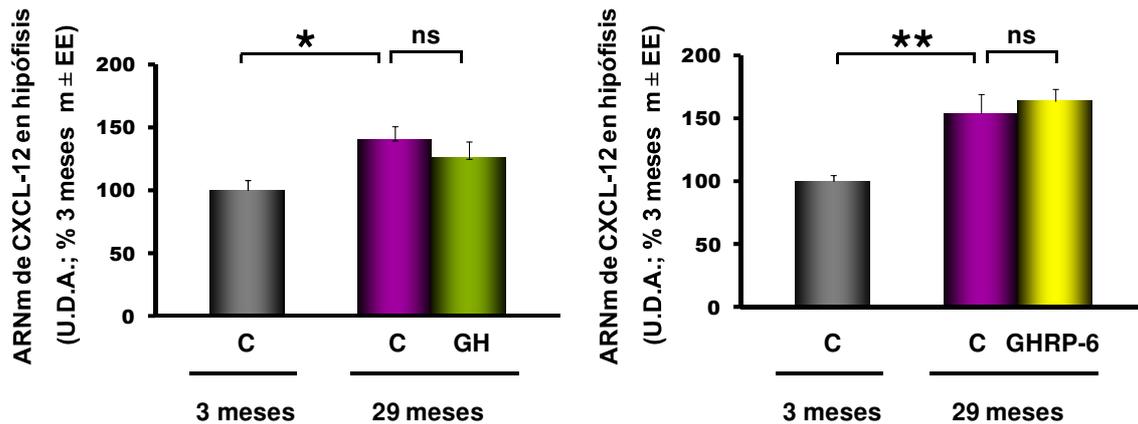


Figura 29. Expresión del ARNm de CXCL12 en la hipófisis. Cuantificación de los niveles del ARNm de CXCL12 en la hipófisis mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 μg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ / 2 veces día / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

Estos resultados muestran que la expresión de CXCL12 en la hipófisis aumenta con la edad, sugiriendo su implicación en las alteraciones funcionales y morfológicas que ocurren en la hipófisis envejecida.

El estudio de la expresión de las citoquinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 y de CXCL12 confirma la existencia de una interrelación entre los sistemas endocrino, inmune y el SNC y muestran que las alteraciones inflamatorias que acompañan al envejecimiento son área y citoquina-específicas.

F.- ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA MEMORIA EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6

Las alteraciones cognitivas que acompañan al proceso de envejecimiento coinciden con una progresiva disminución de las concentraciones circulantes de GH y este declinar cognitivo mejora mediante el tratamiento con GH (van Dam et al., 2000). Aunque con resultados contradictorios, varios estudios en humanos han tratado de establecer una correlación entre los niveles circulantes de IGF-I y la función cognitiva en ancianos (Sonntag et al., 2005). Los estudios basados en terapia sustitutiva con GH o IGF-I en ancianos son escasos y no concluyentes (Papadakis et al., 1995; Friedlander et al., 2001). La asociación entre la GH y los procesos cognitivos está fuertemente soportada por estudios en roedores que apoyan la hipótesis de que las alteraciones cognitivas relacionadas con la vejez son, al menos en parte, debidas al declinar del sistema GH/IGF-I (Sonntag et al., 2000; Ramsey et al., 2004; Schneider-Rivas et al., 2007).

Basados en estos antecedentes, en esta parte del estudio evaluamos, analizando el comportamiento de alternancia espontánea mediante el test del laberinto en Y, el efecto del tratamiento con GH o GHRP-6 sobre ciertas alteraciones cognitivas de las ratas viejas.

Con este objetivo un grupo de ratas de 29 meses se trataron con GH s.c. (150 µg / 2 veces al día) durante 7 días o con GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces al día) durante 15 días. Todas las ratas, jóvenes adultas y viejas, se sometieron al test del laberinto en Y. Se realizó un primer test del laberinto a todas las ratas previamente al tratamiento con GH o GHRP-6, y un segundo test finalizado el tratamiento. Se cuantificó el número de entradas totales así como el porcentaje de alternancia espontánea de cada animal durante 5 minutos.

En la Figura 30 se muestran los resultados del tratamiento con GH o GHRP-6 en el *comportamiento de alternancia espontánea* y en el *número de entradas totales* en el Test del Laberinto en Y. En el primer test, observamos en las ratas viejas una disminución, aunque no significativa, en el comportamiento de alternancia espontánea y en el número de entradas totales. En el segundo test, se observa un empeoramiento de estos parámetros una disminución significativa en el comportamiento de alternancia espontánea y en el número de entradas en las ratas viejas no tratadas con respecto a las ratas adultas. Tras el tratamiento con GH o GHRP-6 no se aprecia el empeoramiento de parámetros en las ratas viejas.

Estos resultados sugieren que tanto la GH como el GHRP-6 pueden mejorar ciertas alteraciones cognitivas de las ratas viejas.

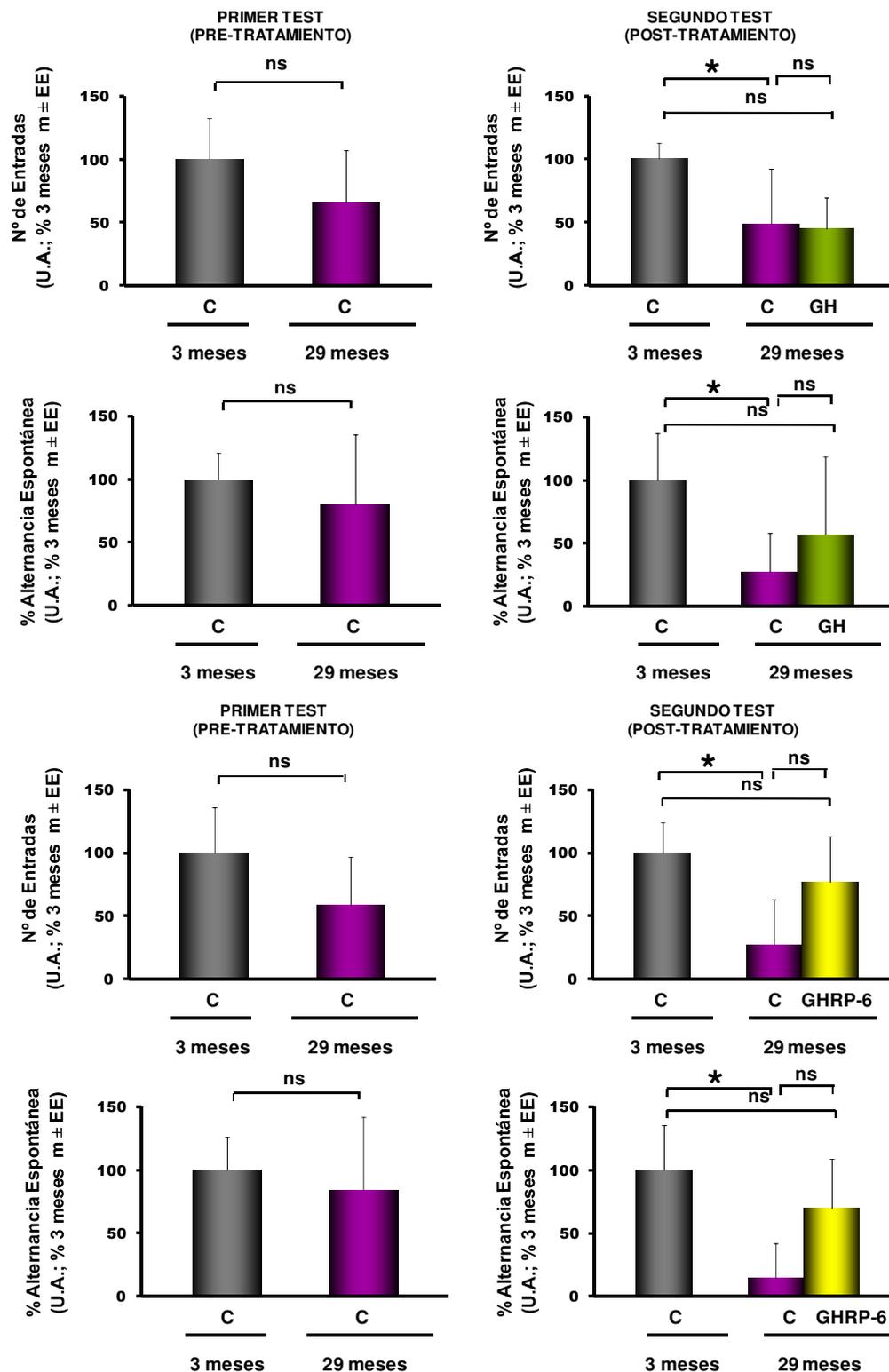


Figura 30. Efecto del tratamiento con GH o GHRP-6 en el *comportamiento de alternancia espontánea* y en el *número de entradas totales* en el test del laberinto en Y. Cuantificación del comportamiento de alternancia espontánea y del número de entradas totales mediante el test del laberinto en Y en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (29m) controles y tratadas con GH s.c. (150 µg / 2 veces día / 7 días) o GHRP-6 s.c. (20 µg/Kg / 2 veces día / 15 días). El test del laberinto en Y se realizó antes (primer test) y después del tratamiento (segundo test). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; ns, no significativo. U.A. (Unidades Arbitrarias).

G.- VIP Y ENVEJECIMIENTO

1.- ALTERACIONES DE LAS CÉLULAS VIPÉRGICAS CEREBRALES EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH

El VIP se expresa en altas concentraciones en la corteza cerebral, hipocampo, amígdala e hipotálamo (Dickson y Finlayson, 2009) donde ejerce funciones neuroprotectoras, neurotróficas y proliferativas (Dejda et al., 2005). En el envejecimiento existe una disminución en el número de neuronas inmunorreactivas de VIP en diversas áreas cerebrales (Chee et al., 1988; Andreose et al., 1994; Cha et al., 1997) así como una reducción de su expresión génica (Gozes et al., 1988; Krajnak et al., 1998; Duncan et al., 2001; Kalló et al., 2004). Dadas sus importantes funciones neuroprotectoras la disminución de VIP en el envejecimiento puede estar asociada a las alteraciones estructurales y cognitivas observadas en esta etapa de la vida. En estudios previos (Lara et al., 1994) evidenciamos que el IGF-I es un inductor de la expresión génica de VIP. Por consiguiente, la depresión del sistema GH/IGF-I que ocurre en el envejecimiento podría estar asociada al decaimiento de la expresión de VIP.

Con el objetivo de confirmar esta hipótesis, estudiamos el efecto del tratamiento con GH sobre el número de neuronas vipérgicas en el cerebro de la rata vieja. Para ello un grupo de ratas viejas de 28 meses de edad se trataron con GH i.c.v. (0,5 µg/h) durante 7 días. Finalizado el tratamiento se analizó mediante inmunohistoquímica el número y las características morfológicas de las neuronas vipérgicas en el cerebro.

En la Figura 31 se muestran las fotografías correspondientes a la hendidura cerebral de ratas representativas de los diferentes grupos experimentales. Nuestros resultados confirman un marcado descenso del número de neuronas vipérgicas en las ratas viejas controles con respecto a las ratas adultas. Además, en las ratas viejas se observa una alteración de la morfología de las células vipérgicas (panel C) con una pérdida de su forma bipolar característica y una disminución y acortamiento de las prolongaciones dendríticas. El tratamiento con GH induce un incremento en el número de células vipérgicas y una recuperación de las prolongaciones dendríticas propias de estas células.

Estos datos demuestran por primera vez que la administración de GH i.c.v. es capaz de revertir la disminución en el número de células vipérgicas así como sus alteraciones morfológicas en el cerebro de las ratas viejas.

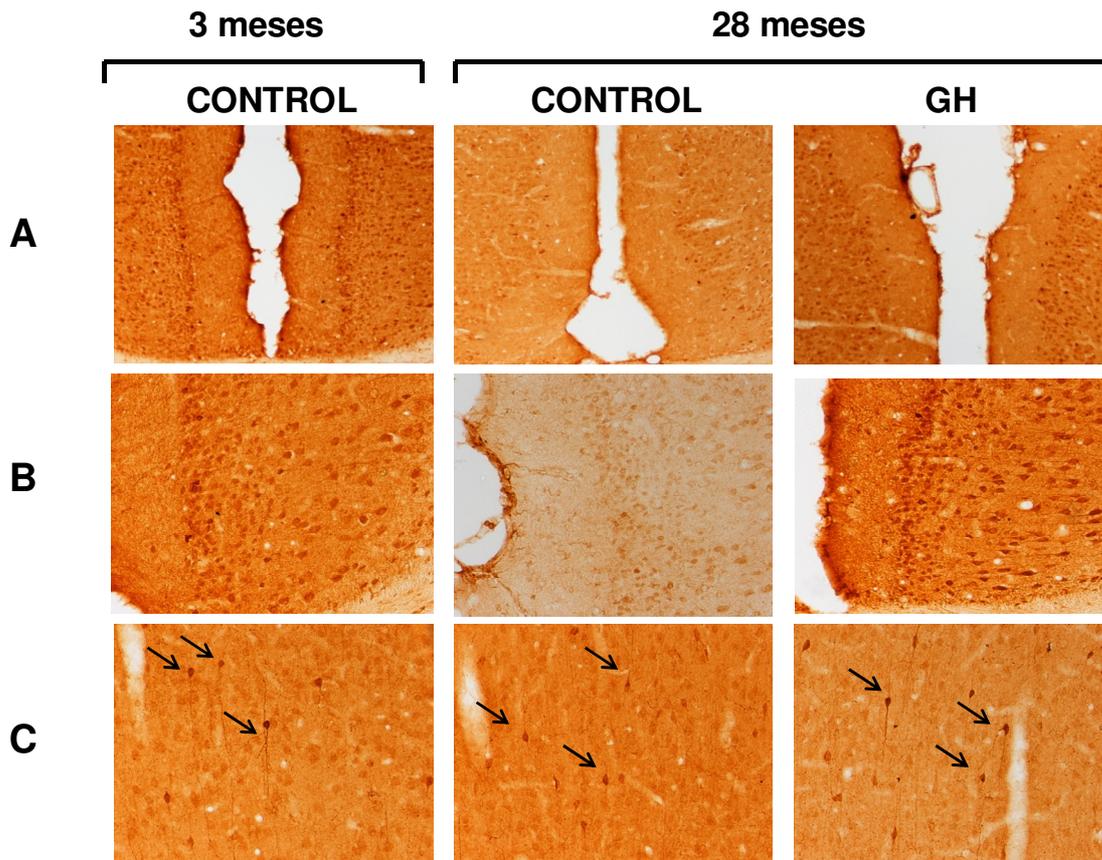


Figura 31. Efecto del tratamiento con GH i.c.v. sobre el número y la morfología de las células vipérgicas en el cerebro de ratas viejas. Inmunohistoquímica frente a VIP en secciones de tejido cerebral de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (28m) controles y tratadas con GH i.c.v. (0,5 µg/h / 7 días). Las fotografías corresponden a la hendidura cerebral de los hemisferios cerebrales. Se muestran 3 ratas representativas de cada grupo experimental. Panel A: detalle de la hendidura cerebral (10X). Panel B: detalle de la hendidura cerebral (40X). Panel C: células vipérgicas de la corteza cerebral (100X).

2.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE VIP SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENÉISIS

Entre las funciones neuroprotectoras de VIP, va adquiriendo progresiva solidez su implicación en el proceso de mielinización. VIP estimula la regeneración axonal y promueve la remielinización del nervio ciático tras axotomía (Rayan et al., 1995; Zhang et al., 2002). La administración intracerebroventricular de VIP a ratones recién nacidos previene las lesiones inducidas por excitotoxicidad en la sustancia blanca (Gressens et al., 1998). En la encefalitis experimental autoinmune, enfermedad desmielinizante del SNC, la administración de VIP protege frente a la recurrencia de la enfermedad (Gonzalez-Rey, Chorny, et al., 2006). Estas evidencias, junto con los resultados expuestos anteriormente, donde se demuestra que el tratamiento con GH aumenta el número de neuronas vipérgicas en el cerebro de ratas viejas, sugieren que VIP pueda contribuir a los efectos remielinizantes de la GH en el cerebro envejecido.

Con el fin de investigar esta hipótesis nos planteamos estudiar el efecto del tratamiento con VIP en la mielinización del cerebro de rata durante el desarrollo embrionario y en el envejecimiento.

2.1.- EFECTO DE VIP SOBRE LA OLIGODENDROGÉNESIS EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS

2.1.1- Efecto de VIP sobre el número de precursores de OD y de OD maduros.

Para el estudio de la acción de VIP en la oligodendrogénesis durante el periodo perinatal utilizamos cultivos de células cerebrocorticales embrionarias. El estudio de la acción de VIP sobre los pre-OD se efectuó mediante inmunocitoquímica frente al antígeno lipídico O4. El efecto de VIP sobre el número de OD maduros se investigó mediante inmunocitoquímica frente a MBP.

En la Figura 32 se observan los resultados del tratamiento con VIP sobre los precursores de OD y OD maduros. VIP indujo un incremento tanto en el número de las células O4 (+) como de células MBP (+) respecto al control a todas las concentraciones utilizadas, con un efecto máximo a la concentración de 10^{-11} M, indicando que VIP es capaz de incrementar tanto la proliferación de preOD como la progresión de los mismos a OD maduros capaces de expresar MBP

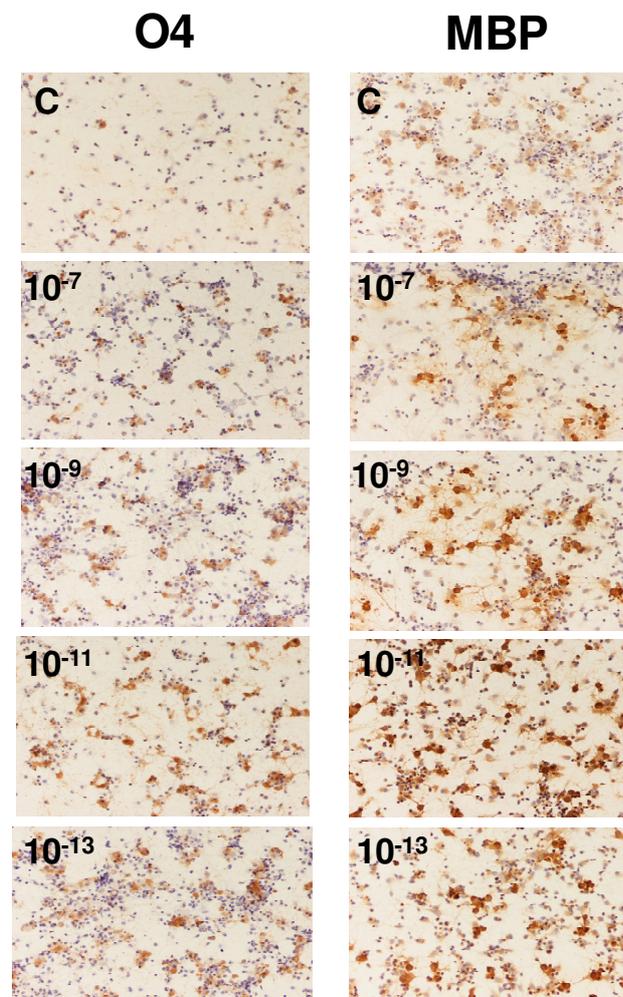


Figura 32. Efecto del VIP en el número de células inmunoreactivas a O4 y MBP. Después de 4 DIV, las células cerebrocorticales fueron incubadas con VIP (10^{-7} M a 10^{-13} M) durante 7 días (O4) u 8 días (MBP). Transcurridos estos tiempos la expresión de O4 y MBP se determinó mediante inmunocitoquímica. C, control.

Estos resultados evidencian que VIP es un importante factor de la diferenciación de los oligodendrocitos confirmándose la implicación de VIP en el proceso de oligodendrogénesis y consecuentemente en el proceso de maduración cerebral durante el desarrollo embrionario.

2.1.2.- Efecto de los inhibidores LY, PD y H89 en la inducción de MBP y/o O4 por VIP

VIP inicia sus acciones biológicas incrementando la síntesis de AMPc y la activación de la PKA. Además, estudios recientes indican que VIP induce la activación de las vías MAPK (Fernández et al., 2005), PI3K y PKC en diferentes tipos celulares. Demostrada la capacidad de VIP de activar las vías de señalización PKA, MAPK y PI3K en células cerebrocorticales (datos no mostrados) estudiamos su participación en el proceso de oligodendrogénesis y en el efecto de VIP sobre el mismo.

Para ello, tras bloquear con inhibidores específicos cada una de las vías de señalización se estudió la expresión de MBP y O4 por inmunocitoquímica en células cerebrocorticales tratadas o no con VIP. La vía de señalización de PI3K se bloqueó con el inhibidor LY294002 (LY). Para la inhibición de la vía de las MAPK se utilizó el inhibidor PD098059 (PD) y se inhibió la vía de la PKA con el inhibidor H89.

Como se muestra en la Figura 33, la presencia del inhibidor LY294002 bloqueó el incremento de MBP en respuesta a VIP con un efecto máximo a la dosis de 10 μ M. La presencia sólo del inhibidor disminuyó la expresión basal de MBP lo que sugiere que la vía de la PI3K participa en el proceso basal de oligodendrogénesis y en la inducción por VIP de dicho proceso.

MBP

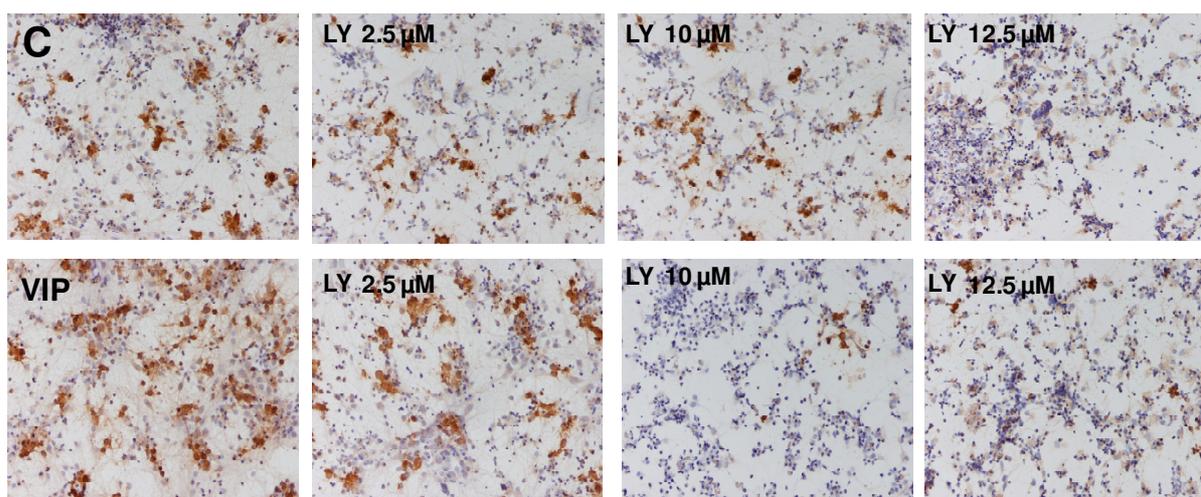


Figura 33. Efecto del bloqueo de la vía PI3K con el inhibidor LY294002 sobre la inducción de MBP por VIP. Estudio inmunocitoquímico. Después de 4 días de cultivo las células cerebrocorticales fueron tratadas durante 30 minutos con LY294002 a dosis de 2,5, 10 y 12,5 μ M, y finalmente incubadas en ausencia C (paneles superiores) o en presencia de VIP (10^{-11} M) (paneles inferiores) durante 8 días. El número de células MBP (+) se analizó por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal frente a MBP.

En la Figura 34 se muestran los resultados obtenidos tras la inhibición de la vía MAPK con el inhibidor PD098059. El bloqueo de las MAPK con el inhibidor PD098059 produjo una disminución parcial en el número de células MBP (+) con dosis de 15 μM que fue total con la dosis máxima utilizada (50 μM). La presencia solo del inhibidor abolió la expresión basal de MBP en los controles, lo que sugiere la implicación de la vía MAPK en el proceso basal de oligodendrogénesis.

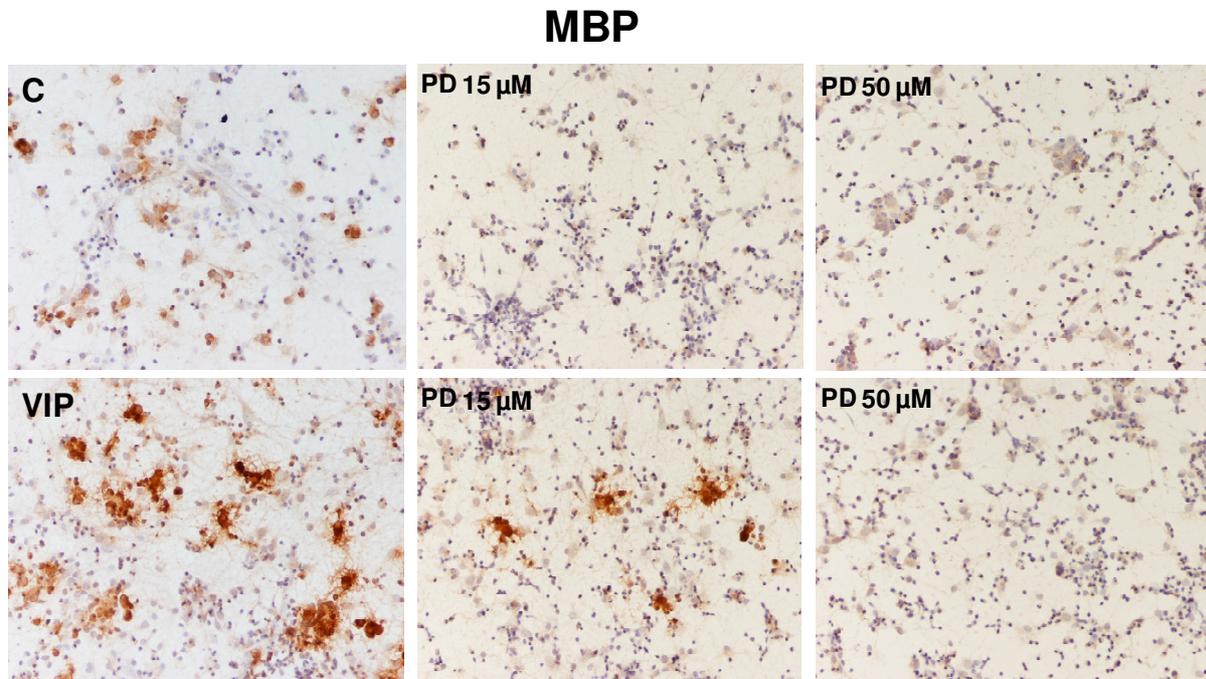


Figura 34. Efecto del bloqueo de la vía MAPK (ERK1/2) con el inhibidor PD098059 sobre la inducción de MBP por VIP. Estudio inmunocitoquímico. Después de 4 días de cultivo las células cerebrocorticales fueron tratadas durante 30 minutos con PD098059 (15 μM y 50 μM), y a continuación se incubaron en ausencia C (paneles superiores) o en presencia del VIP (10^{-11}M) (paneles inferiores) durante 8 días. El número de células MBP (+) se analizó por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal frente a MBP.

En la Figura 35 se muestran los resultados del bloqueo de la vía PKA con el inhibidor H89. Como puede observarse, el bloqueo de la vía PKA con el inhibidor H89 produjo una marcada disminución en la inducción de la expresión de O4 y de MBP por VIP a todas las dosis estudiadas (1,5 y 20 μM) que fue completa sobre el número de células MBP (+) con la dosis máxima analizada de 20 μM . La presencia solo del inhibidor disminuyó la expresión basal de O4 y MBP en los controles, lo que sugiere la implicación de la vía de la PKA en el proceso basal de oligodendrogénesis.

Estos resultados indican que la activación de las vías de señalización PI3K, MAPK y PKA está implicada en el proceso de oligodendrogénesis inducido por VIP así como en la oligodendrogénesis basal.

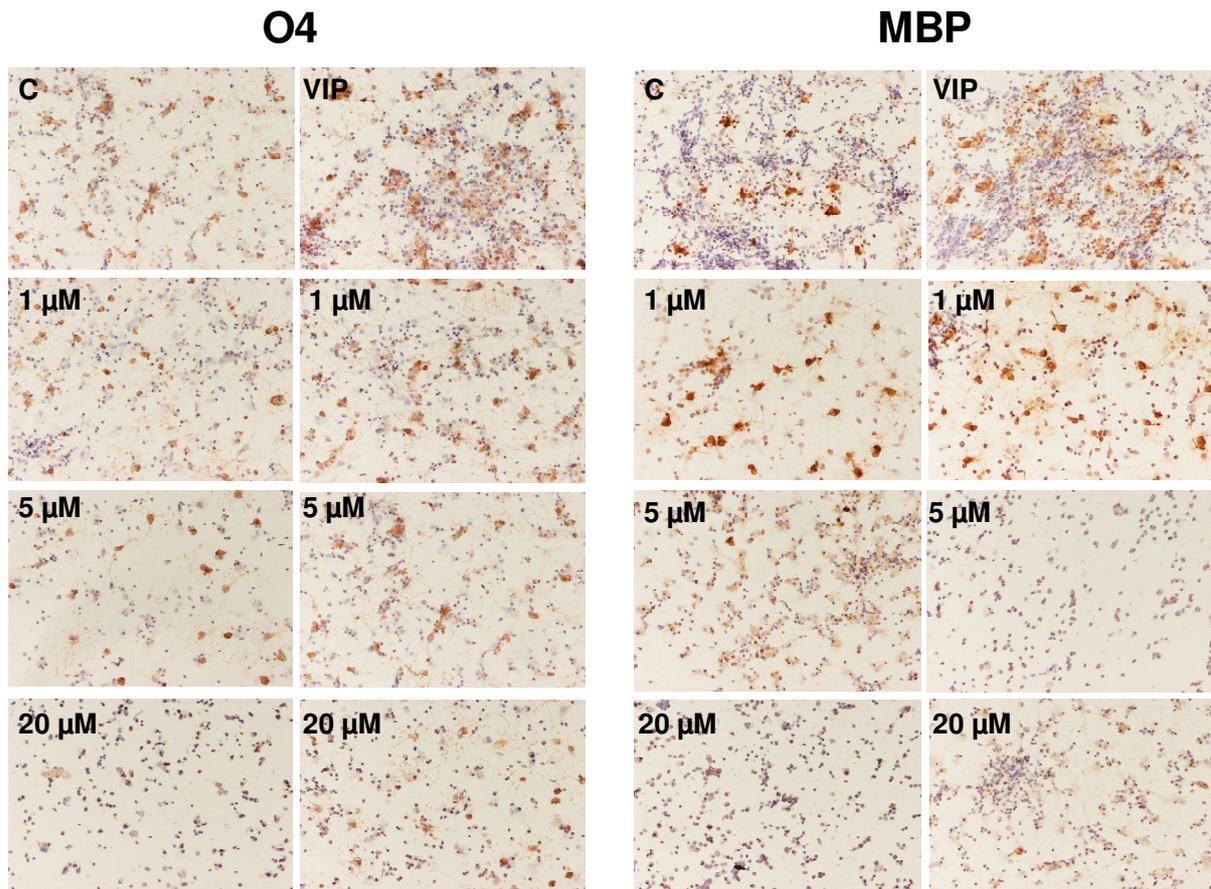


Figura 35. Efecto del bloqueo de la vía PKA con el inhibidor H89 sobre la inducción de O4 y MBP por VIP. Estudio inmunocitoquímico. Después de 4 días de cultivo las células cerebrocorticales fueron tratadas durante 30 minutos con H89 a dosis de 1, 5 y 20 μM , y finalmente incubadas en ausencia (A) o presencia (B) de VIP (10^{-11} M). El número de células O4 (+) y MBP (+) se analizó por inmunocitoquímica después de 7 y 8 días respectivamente de incubación con VIP. El análisis inmunocitoquímico se efectuó con un anticuerpo monoclonal frente a O4 y MBP.

2.1.3.- Efecto de VIP sobre la activación de CREB: estudio tiempo respuesta

VIP incrementa la síntesis de AMPc, el cual regula la transcripción de numerosos genes mediante la activación de la PKA y la consecuente fosforilación de CREB en la Ser133 (Montminy, 1997). Como hemos mencionado con anterioridad, la activación de CREB está íntimamente relacionada con la diferenciación de los oligodendrocitos. Por este motivo, analizamos el efecto de VIP sobre la fosforilación de CREB en las células cerebrocorticales.

Para ello, después de 4 DIV, las células cerebrocorticales se expusieron a VIP (10^{-11} M) durante 1, 5, 10, 30 y 60 minutos. Transcurridos estos tiempos se valoró la activación de CREB mediante la determinación de la forma fosforilada de CREB por Western immunoblot.

Como se muestra en la Figura 36, el tratamiento con VIP indujo un rápido incremento en los niveles de CREB fosforilado, que fue máximo 1 minuto después de la adición de VIP, disminuyendo progresivamente hasta los valores basales a los 30 minutos.

Estos resultados demuestran que VIP induce la activación de CREB en células cerebrocorticales en cultivo. Dada la implicación de CREB en mielinogénesis estos hallazgos sugieren que CREB participa en el proceso de oligodendrogénesis inducido por VIP.

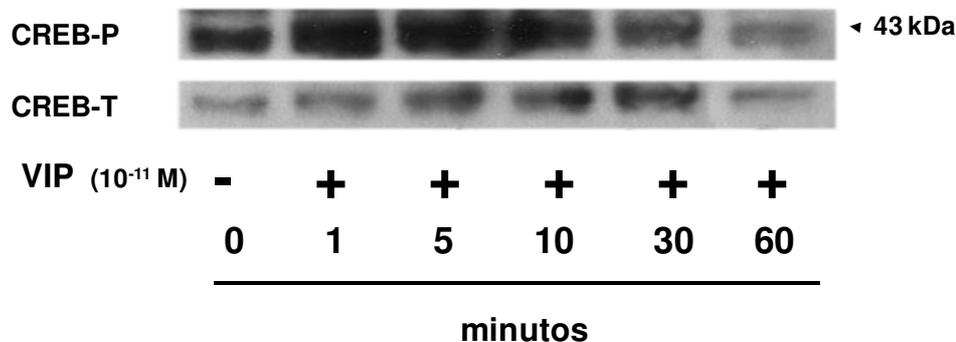


Figura 36. Activación del factor de transcripción CREB por VIP: estudio tiempo-respuesta. Después de 4 DIV, las células cerebrocorticales fueron incubadas con VIP (10^{-11} M) durante 1, 5, 10, 30 y 60 minutos. Se muestra la autorradiografía de un Western inmunoblot representativo realizado con un anticuerpo específico frente a la forma fosforilada, CREB-P (panel superior). La misma membrana se incubó con un anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como la no fosforilada, CREB-T (panel inferior).

2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE VIP SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

2.2.1- Efecto del tratamiento con VIP subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

El estímulo por VIP del proceso de oligodendrogénesis *in vitro* nos llevó a estudiar el efecto del tratamiento con VIP sobre la hipomielinización del cerebro de ratas viejas. Con este objetivo un grupo de ratas viejas de 24 meses de edad se trataron con VIP s.c. (3 nmol/día) en días alternos durante 15 días. Una vez finalizado el tratamiento se valoró el contenido de MBP en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante Western inmunoblot.

Como se observa en la Figura 37, existe una clara disminución de los niveles de MBP en las ratas viejas, fundamentalmente de la isoforma de 21 kDa, tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo, confirmando nuestros estudios previos. Además, se observan distintas bandas de bajo peso molecular que corresponden con formas degradadas de MBP cuya abundancia también aumenta con el envejecimiento. El tratamiento con VIP incrementó significativamente la expresión de la isoforma de 21 kDa en la corteza cerebral anterior, sin provocar cambios en el hipocampo.

Estos resultados son la primera evidencia que demuestra una acción estimulante del VIP sobre la remielinización en el cerebro de la rata vieja. Además sugieren que este efecto es área-específico.

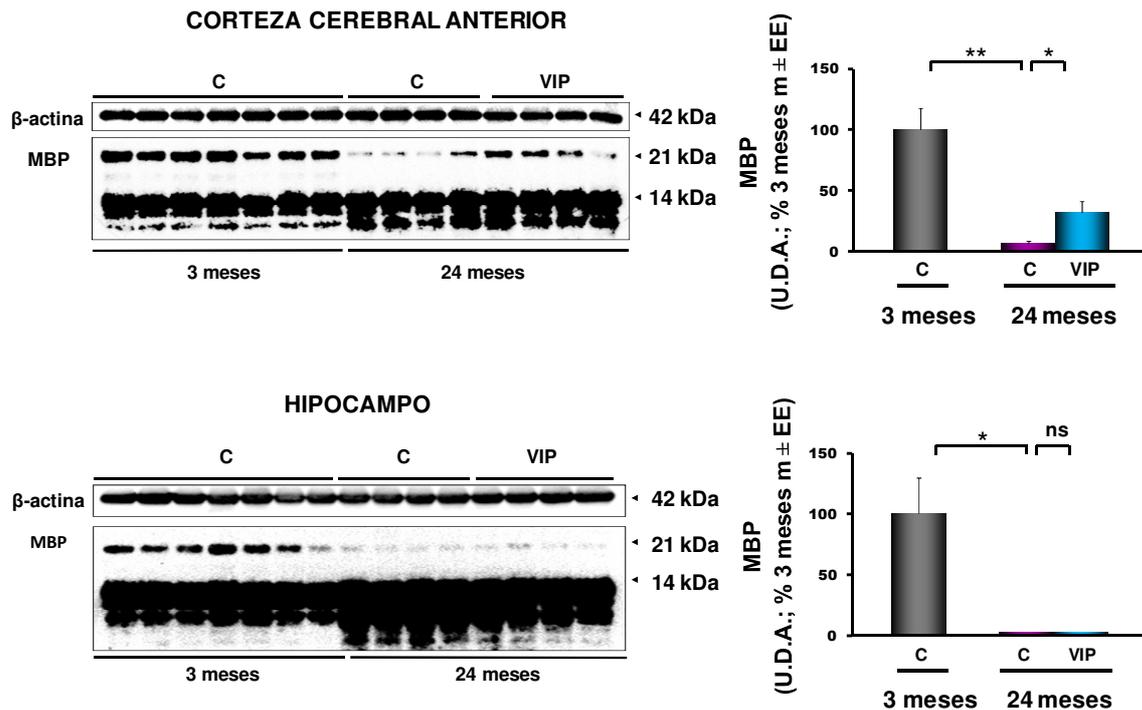


Figura 37. Efecto del tratamiento con VIP s.c. sobre la expresión de MBP en el cerebro. Western inmunoblots frente a MBP de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas adultas jóvenes (3 m) y ratas viejas (24 m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol / día / días alternos / 15 días). Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de la banda de 21 kDa de MBP corregida por β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

2.2.2.- Papel de BDNF en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas

a) Efecto del bloqueo de BDNF sobre la inducción de MBP por VIP

Numerosas evidencias apoyan la existencia de una interacción entre VIP y BDNF. En estudios previos de nuestro laboratorio observamos que VIP media en la inducción del gen de SS por BDNF (Villuendas et al., 2001). El BDNF a su vez regula la expresión de VIP en retina (Cellerino et al., 2003). Se ha demostrado que la neuroprotección inducida por VIP está mediada, al menos en parte, por el BDNF endógeno (Husson et al., 2005). Dado el importante papel de BDNF en el proceso de mielinogénesis del SNC, nos planteamos investigar si BDNF participa en el efecto remielinizante de VIP en el cerebro de las ratas viejas.

Con esta finalidad, se investigó el efecto del bloqueo de los receptores de BDNF sobre la expresión de MBP inducida por VIP.

En la Figura 38 se muestran Western inmunoblots representativos correspondientes a las regiones de la corteza cerebral anterior e hipocampo de diferentes ratas de cada uno de los grupos experimentales. En las ratas viejas se observa una marcada disminución en la expresión de la isoforma de 21 kDa de MBP tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo, donde es indetectable. De nuevo confirmamos que el tratamiento con VIP s.c. revirtió los niveles de expresión de la isoforma de 21 kDa de MBP en la corteza cerebral

anterior pero no en el hipocampo. El bloqueo de los receptores del BDNF con K_{252a} ($10^{-4}M$ y $10^{-5}M$) y $P75^{NTR}$ con PEP5 (100 ng y 500 ng) produjo una disminución en la acumulación de la banda de 21 kDa de MBP en la corteza cerebral anterior, inhibiendo el efecto de VIP.

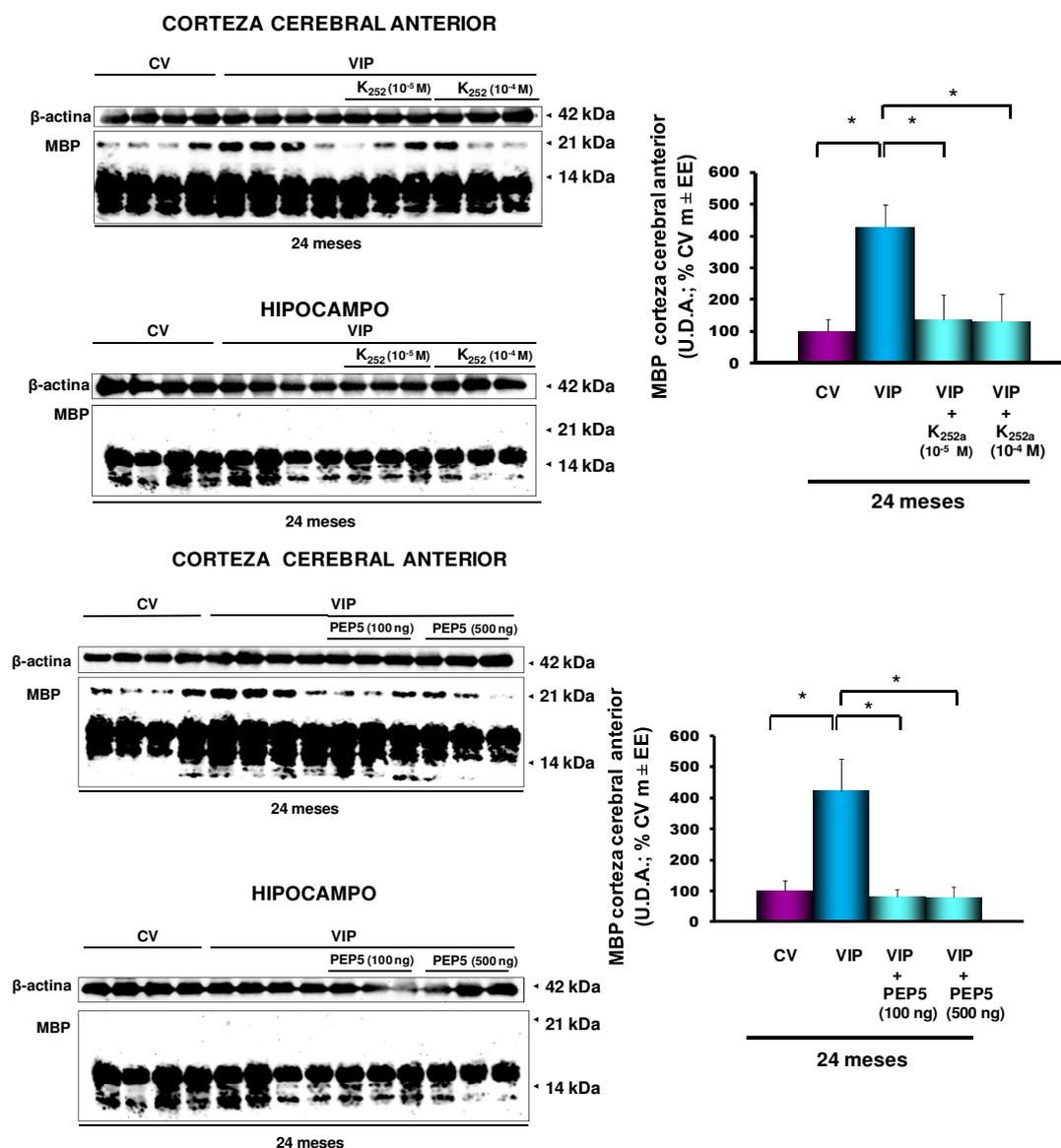


Figura 38. Efecto del bloqueo de BDNF sobre la expresión de MBP cerebral inducida por VIP. Inmunoblot frente a MBP de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas controles viejas (CV) (24 m), tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día), VIP+ K_{252a} ($10^{-4}M$ y $10^{-5}M$) o VIP+PEP5 (100 ng y 500 ng) en días alternos durante 15 días. Autorradiografías correspondientes a Western inmunoblots representativos realizados con un anticuerpo específico frente a MBP. Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de la banda de 21 kDa de MBP corregida por β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo control viejo de 24 meses. *, $p < 0,05$.

b) Efecto de VIP sobre la expresión de BDNF

Muchas de las acciones de VIP son indirectas y ocurren a través de factores que son liberados por VIP. El hecho de que el bloqueo de los receptores de BDNF inhibiera el efecto

mielinizante de VIP sugería que esta acción de VIP estuviera mediada por un efecto estimulante de VIP sobre la expresión del BDNF cerebral. Para clarificar esta hipótesis un grupo de ratas de 24 meses de edad se trató con VIP s.c. (3 nmol/día) en días alternos durante 15 días y se analizó la expresión del ARNm del BDNF por PCR a tiempo real en la corteza cerebral anterior e hipocampo.

Como se observa en los resultados obtenidos (Figura 39) los niveles del ARNm del BDNF están disminuidos en la corteza cerebral anterior pero no en el hipocampo de las ratas viejas. El tratamiento con VIP no modificó la expresión del ARNm del BDNF en ninguna de las áreas estudiadas.

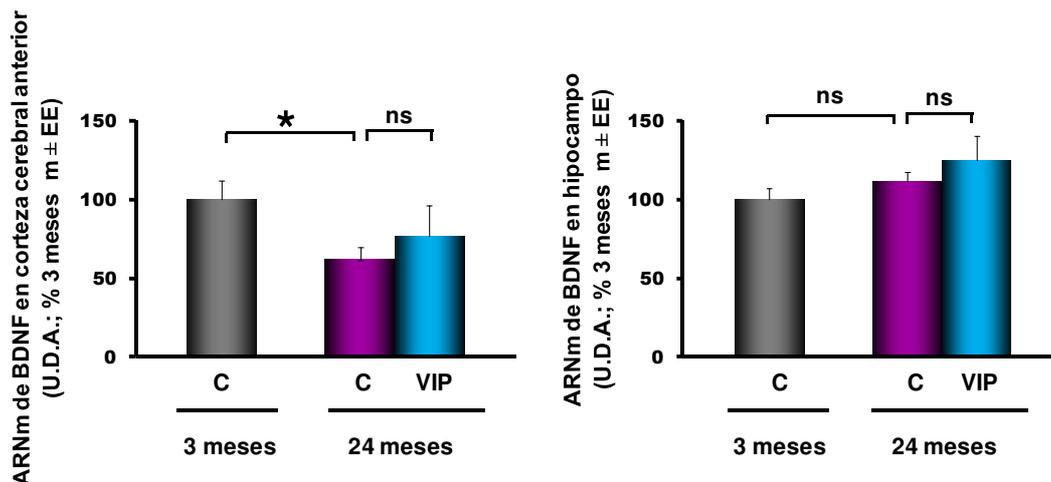


Figura 39. Expresión del ARNm de BDNF en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día / días alternos / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; ns, no significativo.

Estos resultados apoyan fuertemente la implicación de BDNF en la acción remielinizante de VIP en la corteza cerebral anterior de ratas viejas. Además sugieren que ambos receptores de BDNF, TrkB y P75^{NTR} participan en el efecto mielinizante de BDNF.

2.2.3.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas

a) Efecto del bloqueo del IGF-I sobre la inducción de MBP por VIP

La interacción entre IGF-I y VIP ha sido evidenciada en diversos estudios. En nuestro laboratorio observamos que el IGF-I induce la expresión de VIP en células hipofisarias (Lara et al., 1994) y que VIP media la acción proliferativa del IGF-I sobre células lactotropas. Otros autores han sugerido que el IGF-I es un mediador de la actividad de VIP en el crecimiento del embrión (Servoss et al., 2001). Estos estudios y el conocido papel que el IGF-I tiene en el proceso de mielinogénesis (Yao et al., 1995; Mason et al., 2000) nos llevaron a investigar si el IGF-I jugaba algún papel en la acción remielinizante de VIP en el cerebro de la rata vieja.

Para ello en un grupo de ratas de 24 meses se bloqueó la acción del IGF-I mediante la administración del antagonista del R-IGF-I, JB-1 (15 μ g) 30 minutos previos a la inyección de VIP s.c. (3 nmol/día) en días alternos durante 15 días. Se analizó la expresión de MBP en el cerebro por Western inmunoblot.

En la Figura 40 se muestran Western inmunoblots representativos correspondientes a las regiones de la corteza cerebral anterior e hipocampo de diferentes ratas de cada uno de los grupos experimentales. Como se observa, el bloqueo del R-IGF-I abole la acción remielinizante de VIP en la corteza cerebral anterior de la rata vieja. Los niveles de MBP en el hipocampo son indetectables en las ratas viejas en todas las condiciones experimentales estudiadas.

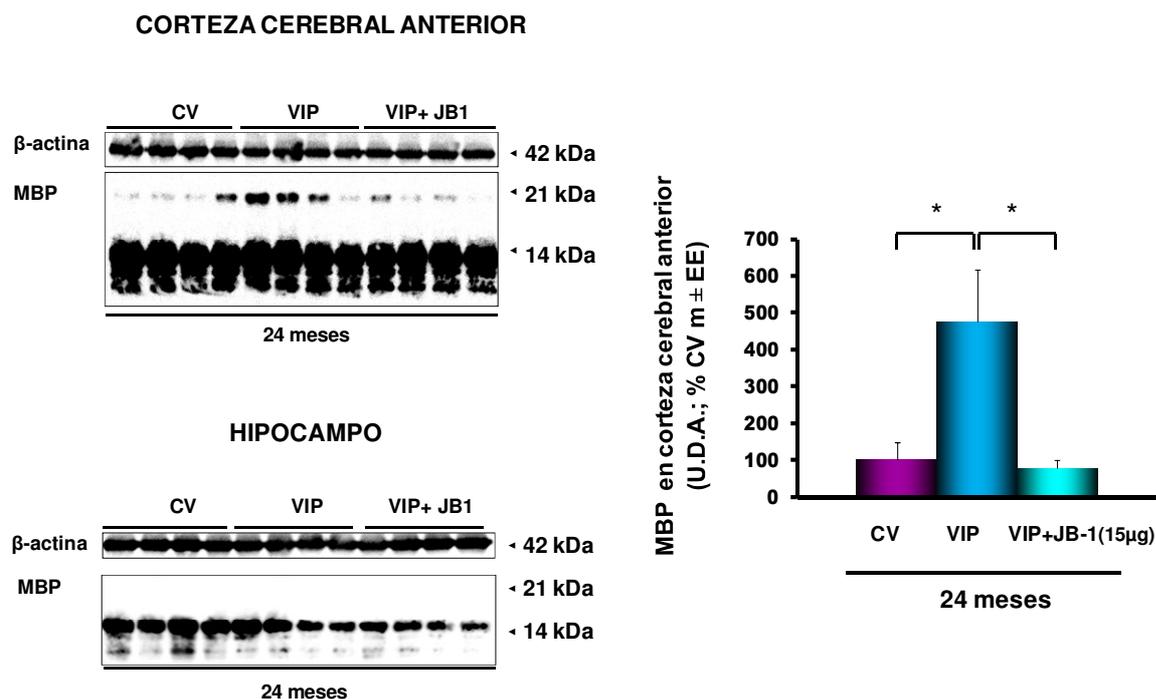


Figura 40. Efecto del bloqueo del IGF-I sobre la expresión de MBP cerebral inducida por VIP. Inmunoblot frente a MBP de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas controles viejas (CV) (24m), tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día) y con VIP+JB-1 (15 μ g) en días alternos durante 15 días. Autorradiografías correspondientes a Western inmunoblots representativos realizados con un anticuerpo específico frente a MBP. La gráfica representa la cuantificación densitométrica de la banda de 21 kDa de MBP corregida por β -actina. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo control de 24 meses. *, $p < 0,05$.

b) Efecto del tratamiento con VIP sobre la expresión del IGF-I y del R-IGF-I en el cerebro

La implicación del IGF-I en la acción remielinizante de VIP que habíamos observado nos llevó a estudiar si VIP podría estimular la expresión del IGF-I o del R-IGF-I en el cerebro de la rata vieja.

Como se muestra en la Figura 41, y hemos mencionado anteriormente, el envejecimiento no altera los niveles de los ARNm del IGF-I y R-IGF-I ni en la corteza cerebral

anterior ni en el hipocampo. La administración de VIP a ratas viejas tampoco modificó los niveles de expresión del ARNm del IGF-I y R-IGF-I en dichas áreas.

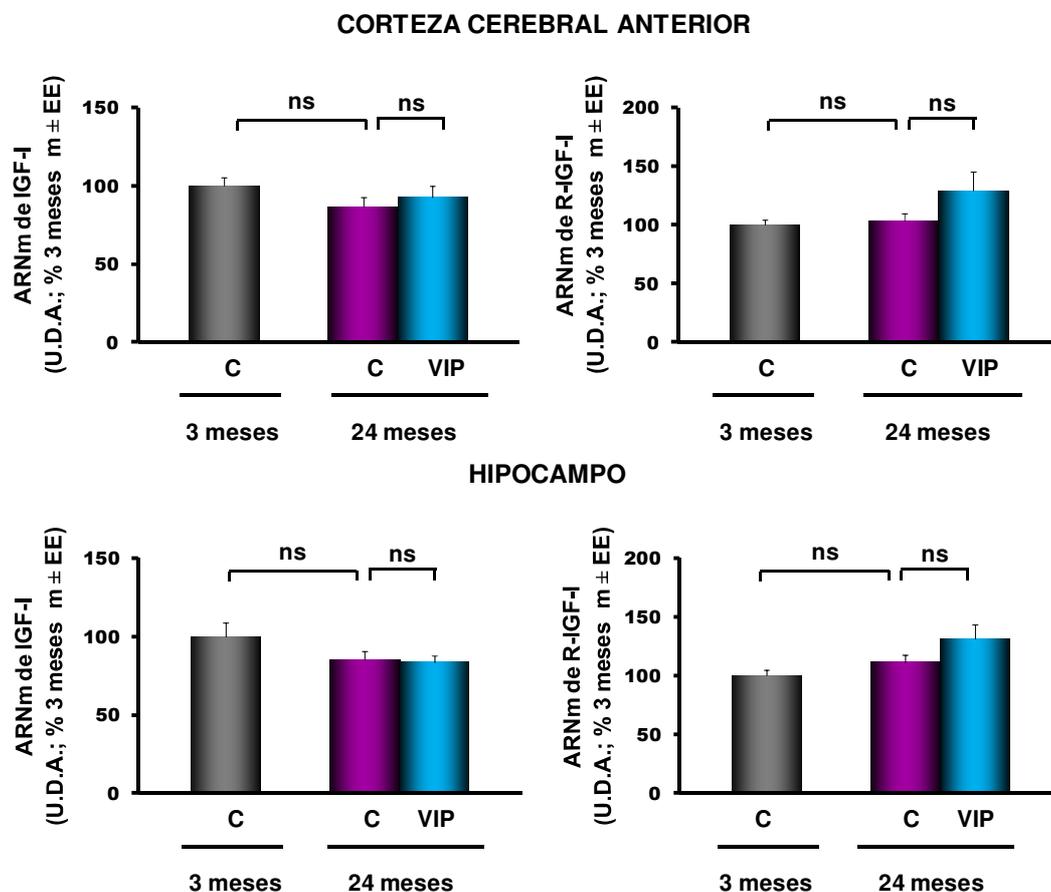


Figura 41. Efecto del tratamiento con VIP en la expresión del ARNm del IGF-I y del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior e hipocampo. Cuantificación de los niveles de los ARNms del IGF-I y del R-IGF-I por PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día / días alternos / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ns, no significativo

Los resultados obtenidos evidencian que la acción remielinizante de VIP en la corteza cerebral anterior de ratas viejas está mediada por el IGF-I, pero no relacionada con un incremento paralelo en la expresión del IGF-I o de su receptor.

3.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VIP

En los resultados expuestos en un apartado anterior demostramos que VIP activa CREB en cultivos de células cerebrocorticales. CREB además está presente en los oligodendrocitos donde es activado por diferentes vías de señalización. La baja expresión de VIP en el cerebro envejecido (Chee et al., 1988; Andreose et al., 1994; Krajnak et al., 1998; Duncan et al., 2001; Kalló et al., 2004) podría contribuir a la disminución de la activación de CREB observada en el SNC de las ratas viejas. Estos antecedentes nos llevaron a valorar el efecto del tratamiento con VIP en la activación de CREB en el cerebro de las ratas viejas.

Como se muestra en la Figura 42, no se aprecian diferencias significativas en la activación de CREB entre las ratas adultas jóvenes y las viejas en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. La administración de VIP a ratas viejas incrementó la activación de CREB en la corteza cerebral anterior y en el hipocampo aunque sin alcanzar valores estadísticamente significativos dada la alta variabilidad muestral.

Estos resultados indican que las ratas de 24 meses, a diferencia de las ratas de 29 meses, no presentan una disminución significativa de la activación de CREB en las áreas cerebrales estudiadas. La alta variabilidad muestral no permite establecer una conclusión sobre el efecto de VIP en la activación de CREB en el cerebro de ratas viejas.

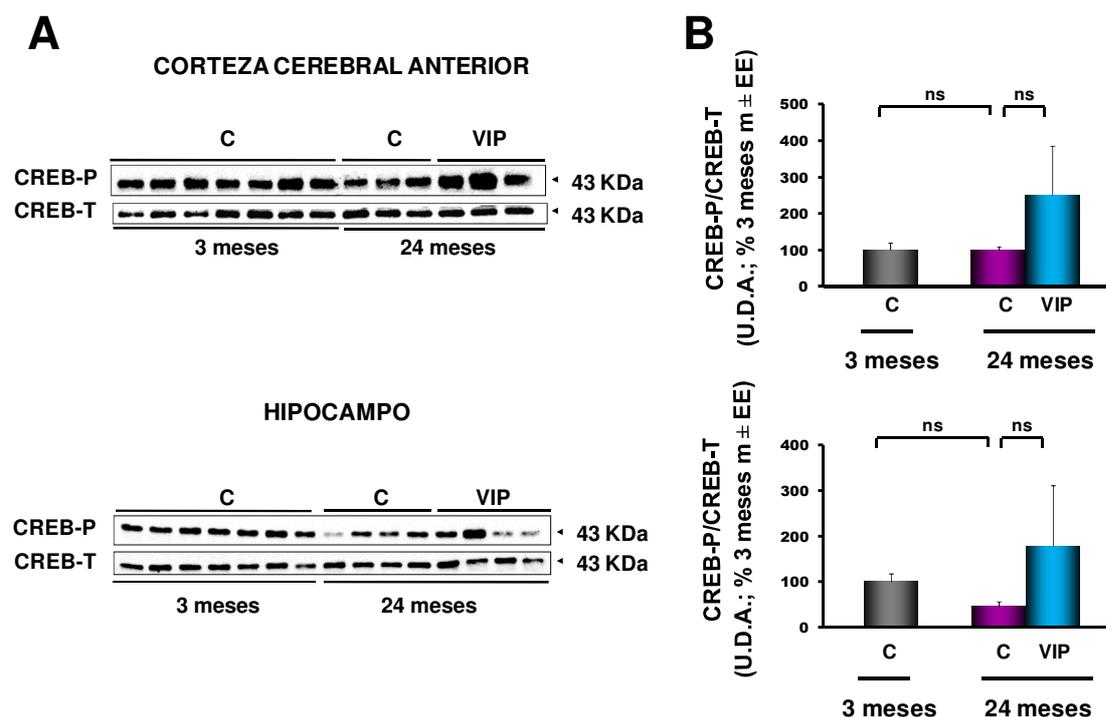


Figura 42. Efecto de VIP sobre la activación del factor de transcripción CREB en el cerebro. Inmunoblots frente a CREB de extractos proteicos de corteza cerebral anterior e hipocampo de ratas adultas jóvenes (3m) y ratas viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día/ días alternos/ 15 días). Cantidades iguales de proteína (20 µg) se analizaron mediante Western inmunoblot. A: Autorradiografías de Western inmunoblots representativos realizados con un anticuerpo específico frente a la forma fosforilada, CREB-P (paneles superiores). Las mismas membranas se incubaron con un anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada, CREB-T (paneles inferiores). B: Las gráficas representan la cuantificación densitométrica de CREB-P corregida por CREB-T, y en porcentaje con respecto al grupo de 3 meses. Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ns, no significativo.

4.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON VIP SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS

VIP ejerce funciones inmunomoduladoras actuando fundamentalmente como un potente factor antiinflamatorio (Delgado et al., 2004). Se ha demostrado que VIP protege de la neurodegeneración inducida por inflamación (Delgado y Ganea, 2003). En la encefalomiелitis experimental autoinmune, enfermedad inflamatoria caracterizada por una desmielinización del cerebro, VIP ejerce un efecto protector de la mielina a través de mecanismos antiinflamatorios (Fernández-Martín et al., 2006; Abad et al., 2010; Abad y Waschek, 2011). Dado que el envejecimiento está asociado con un cierto grado de inflamación cerebral, la acción remielinizante de VIP que hemos observado en el cerebro de rata vieja podría estar relacionada con sus efectos antiinflamatorios.

Para dilucidar esta hipótesis, estudiamos el efecto del tratamiento con VIP en la expresión de citoquinas en el cerebro de ratas viejas midiendo la expresión de los ARNm de la IL-1 β , la IL-6, el TNF- α y el TGF- β mediante PCR a tiempo real. Además, analizamos si el BDNF y/o el IGF-I modificaban el efecto de VIP sobre la expresión de citoquinas en el cerebro envejecido.

Para ello un grupo de ratas viejas de 24 meses de edad se trataron con VIP s.c. (3 nmol/día) en días alternos durante 15 días. El papel del BDNF se estudió mediante el bloqueo de sus receptores TrkB y P75^{NTR} con sus respectivos inhibidores K_{252a} (10⁻⁴M y 10⁻⁵M) y PEP5 (100 ng y 500 ng) inyectados 30 minutos antes de la administración de VIP. El bloqueo del receptor del IGF-I se llevó a cabo con el antagonista del IGF-I, JB-1 (15 μ g), administrado 30 minutos previos a VIP. Finalizado el tratamiento se determinó la expresión de los ARNm de las citoquinas en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real.

4.1.- Expresión del ARNm de la IL-1 β en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP

Como se observa en la Figura 43 las ratas de 24 meses de edad presentan niveles del ARNm de la IL-1 β en la corteza cerebral anterior significativamente superiores a los de las ratas jóvenes controles. Los niveles del ARNm de la IL-1 β en el hipocampo de las ratas viejas están también elevados aunque no se observan diferencias significativas. El tratamiento con VIP no produjo ningún cambio significativo en los niveles del ARNm de la IL-1 β ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo de las ratas viejas.

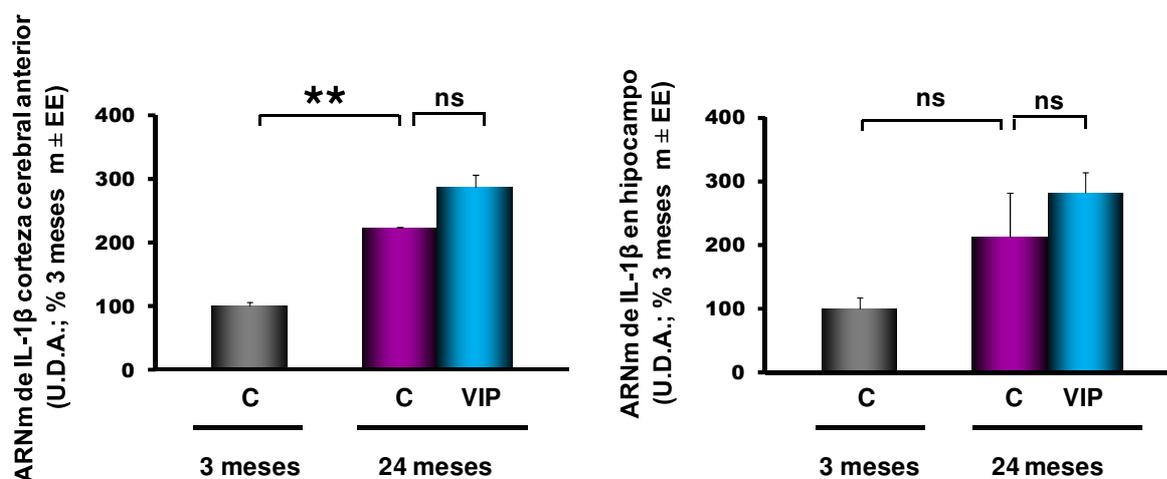


Figura 43. Expresión del ARNm de la IL-1 β en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de la IL-1 β en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día / días alternos / 15 días). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. **, $p < 0,01$; ns, no significativo.

4.2.- Expresión del ARNm de la IL-6 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP

Como se muestra en la Figura 44, el envejecimiento se acompaña de un incremento de los niveles del ARNm de la citoquina proinflamatoria IL-6 tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo. El tratamiento con VIP aumentó aún más los niveles del ARNm de la IL-6 en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas. En el hipocampo se observa una tendencia similar que no llega a ser significativo. Los inhibidores de BDNF e IGF-I abolen el efecto de VIP sobre la expresión de la IL-6 en la corteza cerebral anterior y el aumento en la expresión basal de la IL-6 observado en la corteza cerebral anterior e hipocampo de las ratas viejas.

Estos resultados muestran un incremento de la IL-1 β e IL-6 en el cerebro de la rata vieja. Además, sugieren un papel modulador de VIP en la expresión de la IL-6 al menos en la corteza cerebral anterior. Los efectos observados tras el bloqueo de los receptores de BDNF e IGF-I apoyan un papel mediador de BDNF e IGF-I en los efectos de VIP en la expresión de la IL-6, así como en el patrón inflamatorio cerebral.

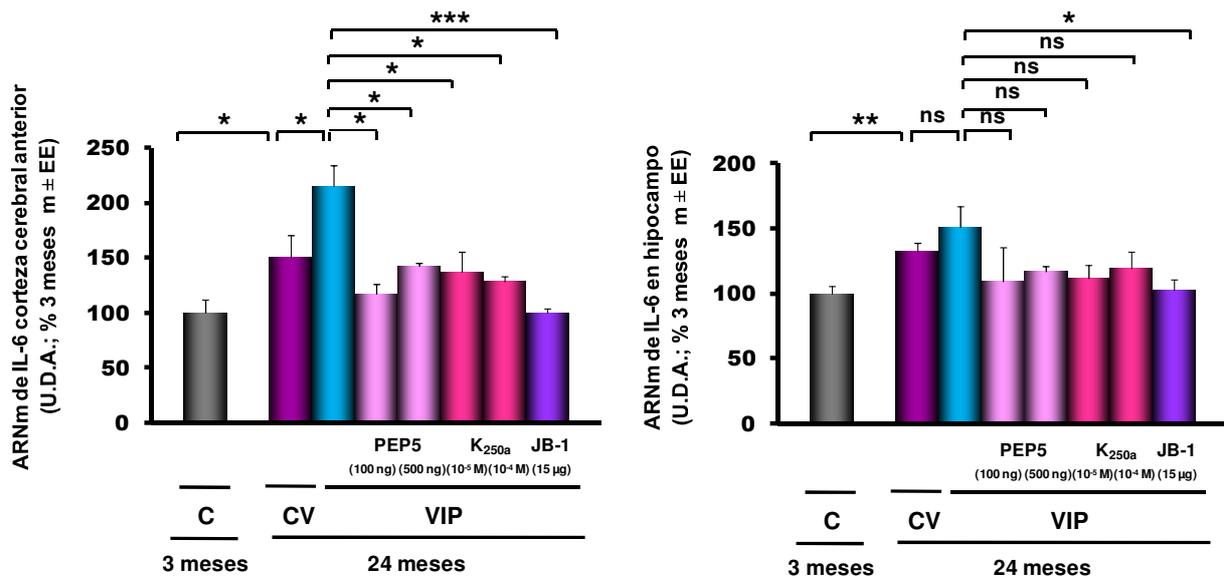


Figura 44. Expresión del ARNm de la IL-6 en el cerebro. Efecto de la inhibición de BDNF e IGF-I. Cuantificación de los niveles del ARNm de la IL-6 en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día), VIP+PEP5 (100 ng y 500 ng), VIP+K_{252a} (10⁻⁴ M y 10⁻⁵ M) o VIP+JB-1 (15 μ g) en días alternos durante 15 días. Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, no significativo.

4.3.- Expresión del ARNm de TNF- α en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP

Como se muestra en la Figura 45, en el envejecimiento no se alteran los niveles del ARNm de la citoquina TNF- α en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. El tratamiento con VIP produjo un aumento significativo en los niveles del ARNm de TNF- α tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo de las ratas viejas. En la corteza cerebral anterior y en el hipocampo el efecto del VIP sobre la expresión de TNF- α es abolido cuando se bloquean los receptores de BDNF, P75^{NTR} y TrkB, con los inhibidores PEP5 y K_{252a}. El bloqueo del receptor de IGF-I con JB-1 solo bloquea el efecto de VIP en la corteza cerebral anterior pero no en el hipocampo.

Estos resultados sugieren un papel estimulador de VIP de la expresión de TNF- α en todas las áreas cerebrales estudiadas. Los efectos observados tras el bloqueo de los receptores de BDNF e IGF-I apoyan un papel modulador de BDNF e IGF-I en los efectos de VIP.

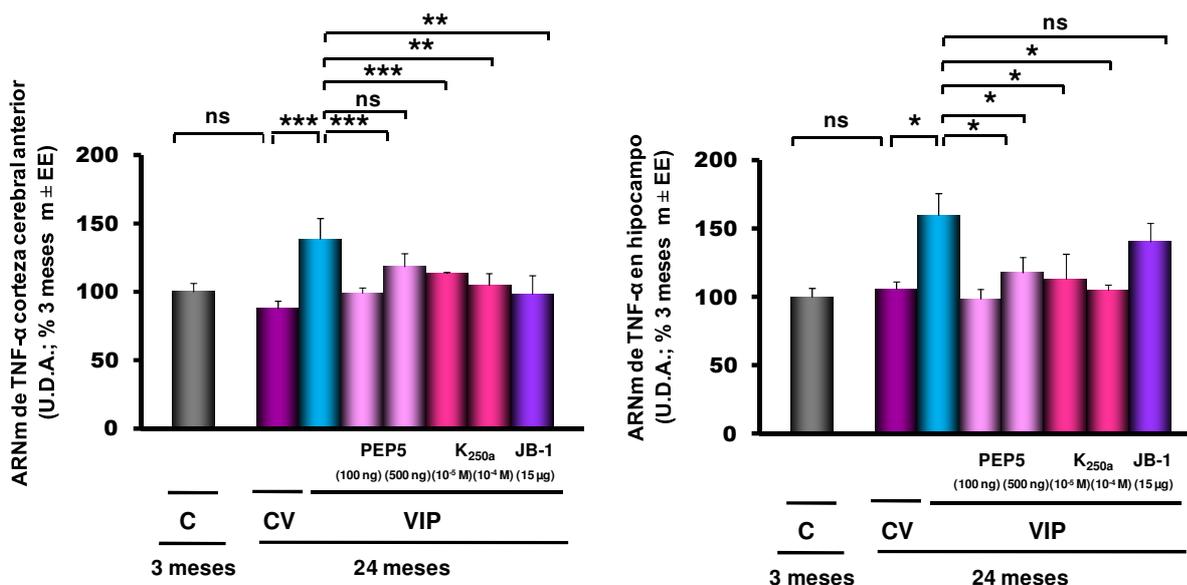


Figura 45. Expresión del ARNm de TNF- α en el cerebro. Efecto de la inhibición de BDNF e IGF-I. Cuantificación de los niveles del ARNm de TNF- α en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día / días alternos / 15 días), VIP+PEP5 (100 ng y 500 ng), VIP+K_{252a} (10⁻⁴M y 10⁻⁵M) o VIP+JB-1 (15 μ g). Los resultados se expresan como la media \pm EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, no significativo.

4.4.- Expresión del ARNm de TGF- β en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP

Como se muestra en la Figura 46, el envejecimiento va acompañado de un aumento significativo de los niveles del ARNm de la citoquina TGF- β tanto en la corteza cerebral anterior como en el hipocampo. El tratamiento con VIP no produjo ningún cambio significativo en los niveles del ARNm de esta citoquina ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Tampoco se observó ningún cambio significativo al bloquear los receptores de BDNF e IGF-I.

Estos resultados sugieren que existe un aumento de la expresión de TGF- β en el cerebro de las ratas viejas. VIP no ejerce ningún efecto en la expresión de TGF- β ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo de las ratas viejas.

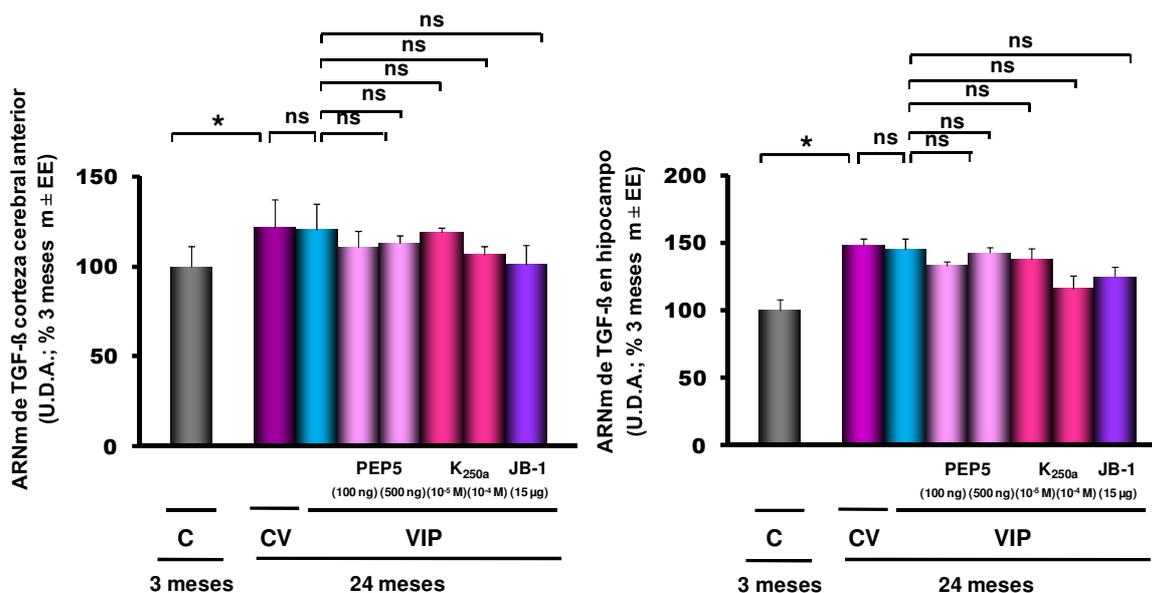


Figura 46. Expresión del ARNm de TGF-β en el cerebro. Efecto de la inhibición de BDNF e IGF-I. Cuantificación de los niveles del ARNm de TGF-β en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día/ días alternos/ 15 días), VIP+PEP5 (100 ng y 500 ng), VIP+K_{252a} (10⁻⁴ M y 10⁻⁵ M) o VIP+JB-1 (15 µg). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. *, p<0,05; ns, no significativo.

4.5.- Expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con VIP

Como se muestra en la Figura 47, en el envejecimiento no se alteran los niveles del ARNm de CXCL12 ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Tampoco el tratamiento con VIP produjo cambios significativos en los niveles del ARNm de CXCL12 en dichas áreas cerebrales.

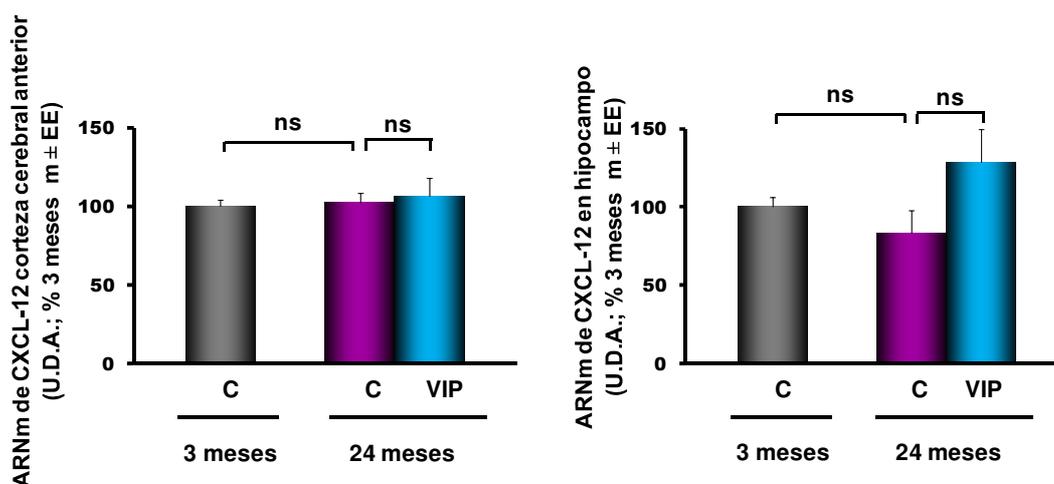


Figura 47. Expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro. Cuantificación de los niveles del ARNm de CXCL12 en la corteza cerebral anterior e hipocampo mediante PCR a tiempo real en ratas adultas jóvenes (3m) y viejas (24m) controles y tratadas con VIP s.c. (3 nmol/día/ días alternos/ 15 días). Los resultados se expresan como la media ± EE y en porcentaje respecto al grupo de 3 meses. ns, no significativo.

El tratamiento con VIP no produce ningún cambio en los niveles de CXCL12, lo que sugiere que CXCL12 no participa en la remielinización observada al tratar a las ratas viejas con VIP.

Discusión

La secreción de GH disminuye gradualmente durante el envejecimiento fisiológico debido fundamentalmente a alteraciones asociadas a la edad de los reguladores hipotalámicos de la GH. Como consecuencia, se produce un declinar paralelo en los niveles del IGF-I. Se puede considerar al envejecimiento como un modelo fisiológico de déficit parcial de GH.

Muchos de los cambios que acompañan al envejecimiento son similares a los existentes en el síndrome de deficiencia de GH. La falta de concentración, la baja energía, las alteraciones de la memoria, la irritabilidad y la falta de bienestar generalizado propios de los individuos con deficiencia de GH son rasgos característicos del envejecimiento.

Esta similitud en la sintomatología que presentan los individuos con deficiencia de GH y los ancianos, ha llevado a sugerir una relación causa-efecto entre los cambios del envejecimiento y la deficiencia de GH, especulándose que la administración de GH puede retardar el deterioro geriátrico.

Estudios realizados en ratas y en humanos han confirmado la reversibilidad de determinados síntomas relacionados con el envejecimiento tras la administración de GH o de sus secretagogos.

En este estudio hemos investigado si las alteraciones cerebrales que ocurren en el envejecimiento en la mielinización, la inflamación y la memoria pueden ser revertidas tras la activación del eje GH/IGF-I con GH y GHRP-6.

Entre los numerosos factores que actúan como mediadores de las acciones de la GH, hemos investigado el papel de BDNF y de VIP en los efectos de GH sobre la remielinización e inflamación en el cerebro de la rata vieja.

A.- SISTEMA GH/IGF-I EN EL ENVEJECIMIENTO

1.- ALTERACIONES HIPOFISARIAS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS

En el presente estudio se confirma que **en el envejecimiento se produce una disminución de la expresión del gen de GH en la hipófisis**, fenómeno ampliamente consensuado por numerosos autores (Crew et al., 1987; Martinoli et al., 1991) incluido nuestro grupo (López-Fernández et al., 1996; Velasco et al., 1998; Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007).

Esta disminución de la síntesis de GH es el resultado de una serie de alteraciones que ocurren en el envejecimiento y que puede reflejar una pérdida de funcionalidad de la propia célula somatotropa o alteraciones en los reguladores hipotalámicos de GH. Los estudios disponibles sugieren que los cambios que ocurren en los reguladores hipotalámicos son la principal causa de la disminución de la síntesis de GH en el envejecimiento. En este sentido, aunque se ha sugerido como un agente desencadenante un aumento del tono somatostatinérgico (Xu y Sonntag, 1996), la disminución de la expresión de GHRH y de sus receptores en hipófisis (degli Uberti et al., 1997; Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007) parecen ser la causa principal del declinar de GH con la edad.

La administración de GH a ratas viejas induce una disminución de los niveles del ARNm de GH en la hipófisis. Estos resultados confirman que la GH regula su propia síntesis y secreción hipofisaria (Yamashita y Melmed, 1986; Lanzi y Tannenbaum, 1992; López-Fernández et al., 1996) y corroboran estudios previos en los que se ha observado que la hipófisis de las ratas viejas mantiene su sensibilidad a la regulación por GH en el envejecimiento (López-Fernández et al., 1996; Velasco et al., 1998; Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007). Además, estos resultados confirman la efectividad del tratamiento con GH en las condiciones experimentales de este estudio.

El tratamiento con GHRP-6 no modifica la expresión del ARNm de GH en la hipófisis de ratas viejas. La acción de los GHS sobre la expresión del gen de GH en la hipófisis es controvertida. Se ha demostrado que la activación del R-GHS induce la expresión del gen de GH en células somatotropas (Locatelli et al., 1994) acción mediada por Pit-1. En ratas neonatales, se ha demostrado la inducción de este factor de transcripción por GHS y ghrelina tras la activación de las vías de la PKC y AMPc/PKA y la participación del elemento de respuesta CRE en el promotor de Pit-1 (García et al., 2001), no habiéndose podido reproducir este efecto en ratas adultas (Soto et al., 1995; Date et al., 2000). En ratas viejas, Frutos, Cacicedo, Fernández et al. (2007) demostraron que el tratamiento con GHRP-6 incrementaba el contenido de GH-IR y la expresión del ARNm de GH en hipófisis. Sin embargo, la administración crónica de hexarelina (Cattaneo et al., 1997) no reestableció el contenido del ARNm de GH en las hipófisis, a pesar de que estimuló la secreción de GH. En conjunto, los estudios disponibles no son concluyentes y sugieren que la síntesis y secreción de GH son fenómenos independientes que pueden ser regulados de diferente manera por los GHS.

Observamos un incremento de los niveles del ARNm del IGF-I hipofisario confirmando los cambios en su expresión con la edad demostrada en estudios previos de nuestro grupo (Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007). El IGF-I hipofisario, actuando por mecanismos auto/paracrinos, participa en la regulación de GH, como se ha sugerido en varios estudios (Fagin et al., 1987; Olchovsky et al., 1991; Honda et al., 1998) y se ha puesto en evidencia por nuestro grupo. En efecto, en estudios previos observamos que el bloqueo del IGF-I con anticuerpos incrementaba el contenido de GH en la hipófisis de ratas viejas en cultivo (Velasco et al., 1998), lo que sugiere que el incremento del IGF-I observado en las hipófisis de ratas viejas (Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007) podría ejercer un control negativo de la GH en el envejecimiento.

Mientras que **el tratamiento con GH no modificó la expresión del ARNm del IGF-I en la hipófisis, el GHRP-6 produjo un incremento significativo del ARNm del IGF-I en las ratas viejas**. Como se ha observado en estudios previos, este resultado confirma la sensibilidad de la hipófisis vieja a la estimulación por GHS (Chapman, Bach, et al., 1996; Chapman, Hartman, et al., 1996) y avala la efectividad del tratamiento con GHRP-6 en las condiciones experimentales de este estudio.

2.- CAMBIOS PERIFÉRICOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6 EN LOS NIVELES CIRCULANTES DEL IGF-I

Nuestros resultados confirman que la disminución de la secreción de GH en el envejecimiento se acompaña de una disminución de los niveles séricos del IGF-I, como ha sido ampliamente documentado (Florini y Roberts, 1980; D'Costa et al., 1993; Velasco et al., 2001; Frutos, Cacicedo, Fernández et al., 2007). La disminución de la amplitud de los pulsos de secreción de GH es el principal factor implicado en la disminución de la expresión del gen del IGF-I hepático y de los bajos niveles del IGF-I sérico que ocurren el envejecimiento (Breese et al., 1991; Sonntag et al., 1992).

Los niveles del IGF-I circulante no se modifican significativamente por el tratamiento con GH. Esta falta de respuesta a GH del IGF-I hepático, que no observamos en un estudio previo con ratas dos meses más jóvenes (Velasco et al., 2001), puede estar relacionada con una disminución de la sensibilidad hepática a GH. En este sentido, estudios previos han sugerido que las vías de señalización de GH están alteradas en el hígado de las ratas viejas (Xu et al., 1995). El envejecimiento va acompañado de una resistencia a GH (Lieberman et al., 1994). Esta resistencia periférica a GH podría contribuir a la disminución de la expresión del gen del IGF-I en el envejecimiento y a la falta de respuesta observada tras la administración de GH en las ratas viejas.

El tratamiento con GHRP-6 tampoco modifica los niveles del IGF-I circulante en las ratas viejas. El efecto de los GHS en los niveles del IGF-I periférico en el envejecimiento es contradictorio. Nuestros resultados confirman estudios previos en perros (Cella et al., 1996) y en ratas viejas (Settembrini et al., 1998; Cattaneo et al., 1997) en los que se ha demostrado

que a pesar de que los GHS inducen GH, la respuesta del IGF-I a la administración de GHS desaparece en el envejecimiento. Sin embargo, en estudios previos (Frutos, Cacicado, Fernández et al., 2007) donde utilizamos ratas viejas de 27 meses, en vez de 29 meses, observamos que el tratamiento con GHRP-6 revertía los niveles del IGF-I circulante a los niveles propios de las ratas adultas. En humanos, los datos también son contradictorios. En el estudio de Chapman et al. (1996) se observó que la administración del secretagogo MK-677 durante 4 semanas estimulaba la secreción pulsátil de GH aumentando significativamente los niveles plasmáticos de GH e IGF-I, restaurándose los niveles hasta los del adulto. De acuerdo con este estudio, el tratamiento de ancianos con el secretagogo oral capromorelina también produjo un aumento de los niveles del IGF-I plasmático (White et al., 2009). Otros estudios en humanos no han confirmado este efecto (Aloi et al., 1994; Rigamonti et al., 2002). Las discrepancias entre los distintos estudios pueden deberse, entre otras causas, a diferencias en el diseño experimental, tales como la edad, el GHS empleado, la dosis administrada y la duración del tratamiento.

Esta parte del estudio confirma que la actividad del eje GH/IGF-I declina con la edad. La disminución de los niveles séricos del IGF-I asociados a la edad refleja el declinar de la expresión del gen de GH en la hipófisis y de su secreción en el envejecimiento (Vermeulen, 1987; Rudman et al., 1990; Cuneo et al., 1992; Corpas et al., 1993). El hecho de que se mantenga el retrocontrol negativo por GH avala la permanencia de la sensibilidad a la GH exógena. El aumento del IGF-I hipofisario tras el tratamiento con GHRP-6 sugiere que la hipófisis vieja mantiene su capacidad de respuesta a los GHS.

3.- CAMBIOS DEL SISTEMA GH/IGF-I EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS

A diferencia de los cambios ampliamente consensuados en los niveles plasmáticos de GH e IGF-I en el envejecimiento, los estudios sobre las alteraciones del sistema GH/IGF-I en el cerebro son escasos y en muchos casos contradictorios.

3.1.- Expresión del ARNm del R-GH en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Nuestro trabajo demuestra que **los niveles de expresión del ARNm del R-GH no varían significativamente con la edad** ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Estos resultados contradicen los obtenidos mediante técnicas de unión a ligando, en los que se ha demostrado que en el envejecimiento se produce una disminución de los sitios de unión a GH en el cerebro (Lai et al., 1993; Zhai et al., 1994; Nyberg y Burman, 1996; Nyberg, 1997). Aunque no podemos descartar alteraciones a nivel de la traducción de la proteína o de la transducción de la señal, el hecho de que se mantenga la expresión del ARNm del R-GH en el cerebro de las ratas viejas sugiere que la GH puede ejercer sus acciones en el cerebro viejo. El tratamiento con GH o GHRP-6 no modifica los niveles de expresión del ARNm del R-GH lo que sugiere que las posibles acciones de estos compuestos en el cerebro no se deben a un aumento en el número de R-GH.

3.2.- Expresión del ARNm del IGF-I y del R-IGF-I en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

La expresión de los ARNms del IGF-I y del R-IGF-I no se altera en el envejecimiento ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. De acuerdo con estudios previos de nuestro grupo (López-Fernández et al., 1996), **el tratamiento con GH estimula la expresión del ARNm del IGF-I y del ARNm del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas sin observarse ningún efecto en el hipocampo.** Estudios previos sobre el efecto de GH en el IGF-I cerebral son contradictorios, habiéndose observado desde una falta de efecto (Sato y Frohman, 1993; Gosteli-Peter et al., 1994) hasta inducción de los niveles del ARNm del IGF-I (Hynes et al., 1987; Frago et al., 2002). Estas discrepancias pueden deberse a los diferentes modelos experimentales y abordajes utilizados en los estudios. En el primero de estos estudios (Sato y Frohman, 1993), el análisis estaba restringido al IGF-I hipotalámico de ratas *dwarf* deficientes de GH. En el estudio de Gosteli-Peter et al. (1994), se analizó el efecto de la infusión continua de GH en el cerebro entero de ratas jóvenes hipofisectomizadas. Este abordaje experimental incrementa los niveles del IGF-I sérico y la formación de grandes complejos con las IGFBP, mientras que en nuestras condiciones experimentales no se induce ninguna variación en el IGF-I sérico. En el estudio de Frago et al. (2002) el análisis del IGF-I se realizó en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo de ratas jóvenes.

El mantenimiento de la expresión del ARNm del R-GH junto con el aumento de la expresión del IGF-I tras el tratamiento con GH apoya la existencia de un sistema GH/IGF-I funcional en la corteza cerebral anterior de la rata vieja. Además, estos resultados sugieren un efecto área específico de la GH en el cerebro de la rata vieja.

La administración de GHRP-6 no modifica significativamente la expresión del ARNm del IGF-I ni del R-IGF-I en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas. Estudios previos sobre el efecto de los GHS en la expresión del IGF-I en el cerebro sugieren que los GHS estimulan la expresión del IGF-I en el hipotálamo, hipocampo (Frago et al., 2002) y en el cerebelo de ratas jóvenes (Frago et al., 2002) y viejas (Pañeda et al., 2003). Las diferencias encontradas con nuestro estudio pueden deberse a la edad de las ratas y a las pautas de tratamiento. En el estudio de Frago et al. (2002) se utilizaron ratas jóvenes y se administró GHRP-6 de forma continua en la vena yugular durante 7 días. El estudio de Pañeda et al. (2003) se llevó a cabo en el cerebelo de ratas viejas.

3.3.- Expresión de los ARNms de los R-GHS en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

La expresión de los receptores de los secretagogos, R-GHS-1a y R-GHS-1b, es indetectable en la corteza cerebral anterior de las ratas jóvenes y viejas. Sin embargo, ambos receptores son detectables en el hipocampo, lo que sugiere una mayor abundancia a este nivel así como su posible implicación en las funciones cognitivas mediadas por el hipocampo.

En el hipocampo de las ratas viejas no se observan cambios de expresión del ARNm del R-GHS-1a pero sí una clara disminución del ARNm del R-GHS-1b. La información sobre el efecto del envejecimiento en la expresión de la ghrelina y de sus receptores es escasa. Se ha descrito una disminución de la expresión del R-GHS-1a en el hipotálamo de ancianos (Muccioli

et al., 2002), en la hipófisis de ratones hembras (Yan et al., 2004) y de ratas viejas (Frutos, Cacicedo, Méndez et al., 2007). Por el contrario, en el cerebro de ratones viejos C5BL6/J la expresión del R-GHS-1a se mantiene constante (Sun et al., 2007).

Hoy en día está ampliamente aceptado que la ghrelina y los GHS ejercen sus acciones biológicas mediante la activación del R-GHS-1a (Kojima et al., 1999; Bednarek et al., 2000; Matsumoto et al., 2001; Muccioli et al., 2001). El R-GHS-1b es un receptor truncado que no se une ni responde a los GHS (Howard et al., 1996) y cuyo significado funcional es aún desconocido, por lo que la implicación funcional de su disminución en el hipocampo es actualmente impredecible.

La presencia del R-GHS-1a en determinadas áreas del cerebro de la rata vieja sugiere que tanto la ghrelina como los GHS podrían actuar como agentes terapéuticos a ese nivel en el envejecimiento.

B.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GH SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGÉNESIS

1.- EFECTO DE GH SOBRE LA OLIGODENDROGÉNESIS EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS

1.1.- Efecto de GH sobre el número de precursores de OD y de OD maduros

El efecto de GH sobre la mielinización del sistema nervioso es menos conocido y más controvertido que el del IGF-I. Con la intención de aportar más información en este campo, en el presente trabajo hemos abordado en primer lugar el estudio del efecto de GH sobre el proceso de oligodendrogénesis *in vitro*.

En nuestro modelo experimental de cultivo primario mixto, **el análisis inmunocitoquímico muestra por primera vez que la GH es capaz de aumentar el número de OD**. Este efecto fue evidente en OD inmaduros (O4+) y en OD maduros (MBP+) después de 11 y 12 días *in vitro* respectivamente (lo que corresponde a los días postnatales 7 y 8), siendo el efecto más marcado en los OD maduros.

La regulación de la oligodendrogénesis por distintos factores neurotróficos implica que la transición entre los distintos estadios madurativos que conlleva el proceso de diferenciación puede ser afectada positiva o negativamente por dichos factores. La progresión desde el estadio de O4 hacia el estadio de OD maduro es una de las etapas sometidas a regulación, de modo que la generación de OD maduros a partir de precursores O4 (+) es un fenómeno que no se produce por defecto sino que precisa la intervención de determinados factores neurotróficos (Dubois-Dalcq, 1987; McMorris y Dubois-Dalcq, 1988).

Los resultados del presente trabajo sugieren que la GH no solo estimula la proliferación de los precursores de OD sino que también promueve su diferenciación a OD maduros y que, por tanto, la transición de OD O4 (+) a OD maduros está mediada por GH.

De acuerdo con estos resultados, Almazán et al. (1985), evidenciaron un incremento en la expresión de MBP y en la actividad CNPasa en cultivos de agregados de células cerebrocorticales fetales tras tratamiento con GH bovina, sugiriendo una acción directa de GH sobre la diferenciación celular en el cerebro embrionario. Sin embargo, estudios previos de nuestro laboratorio mostraron, en un sistema de cultivo idéntico al empleado en este trabajo, que el efecto proliferativo y diferenciador de GH sobre las células neurales presentes en el cultivo está mediado por el IGF-I (Ajo et al., 2003), lo que apoya la existencia de un eje endógeno GH/IGF-I en el cerebro fetal y sugiere que el IGF-I podría mediar las acciones de la GH sobre oligodendrogénesis observadas en nuestro estudio.

1.2.- Participación de las vías PI3K y MAPK en los efectos de GH sobre la oligodendrogénesis *in vitro*

En la propagación intracelular de la señal desencadenada por la unión de GH a su receptor se hallan involucradas, entre otras, la vía de señalización de las MAPK y de la PI3K (Möller et al., 1992; Souza et al., 1994; Argetsinger et al., 1996; Carter-Su et al., 1996; Vanderkuur et al., 1997; Yamauchi et al., 1998).

En nuestro sistema de cultivo **hemos confirmado la capacidad de GH para activar tanto la vía MAPK como la vía PI3K**. No obstante, la cinética de activación es distinta para cada una de ellas. Así, en el caso de la vía de la MAPK la activación máxima ocurre a los 5-10 minutos y desciende progresivamente hasta alcanzar los niveles basales a los 30 minutos. Por el contrario, en el caso de la PI3K el pico de máxima activación es más tardío, 30 minutos, manteniéndose niveles elevados hasta los 60 minutos. Estos datos están de acuerdo con estudios previos que han demostrado que la GH es capaz de fosforilar y activar rápidamente la vía MAPK (ERK1/ERK2) (Campbell et al., 1992), además de promover la unión de la subunidad reguladora de 85 kDa de la PI3K al IRS-1 e IRS-2 (Argetsinger et al., 1995).

Con el objetivo de determinar qué vías de señalización activadas por GH participan en el proceso de oligodendrogénesis inducido por ésta, se empleó la estrategia del bloqueo de las rutas potencialmente implicadas mediante inhibidores específicos.

Nuestros resultados indican que **tanto la vía PI3K como la vía MAPK (ERK1/2) participan en la oligodendrogénesis inducida por GH**. El bloqueo de cada una de ellas conduce a una disminución en el número de OD inmaduros y maduros que se desarrollan en respuesta a GH y en consecuencia una disminución en la expresión de O4 y de MBP.

La inhibición simultánea de las vías PI3K y MAPK bloquea por completo el efecto de GH sobre la expresión de O4 y MBP, indicando que o bien el efecto de GH está mediado exclusivamente por estas dos vías o bien que, de existir otros mediadores, éstos precisarían, para manifestar su efecto, la activación de al menos de una de estas dos rutas de señalización.

Además, se observó una disminución de la expresión basal de O4 y MBP en los cultivos tratados solo con los inhibidores. Este efecto puede reflejar la necesidad de las vías de señalización de las MAPK y PI3K para la supervivencia de los OD, como demostraron previamente Vemuri y McMorris (1996), dado que no se ha evidenciado ningún efecto tóxico de los inhibidores LY294002 y PD098059 durante tiempos prolongados de incubación (Vlahos et al., 1994).

1.3.- Efecto de GH sobre la activación de CREB

La presencia de CREB se ha demostrado en los OD, donde su expresión está regulada por el desarrollo, de modo que los máximos niveles de expresión se detectan inmediatamente antes del pico de mielinización (Sato-Bigbee y Yu, 1993; Sato-Bigbee et al., 1994; Sato-Bigbee y DeVries, 1996). Su activación puede ser inducida en estas células por numerosos estímulos, entre los que se encuentran factores de crecimiento (Pende et al., 1997), agonistas β -adrenérgicos, histamina, glutamato, ATP o NT-3 (Sato-Bigbee et al., 1999; Johnson et al., 2000). Además, CREB es un mediador de la inducción de MBP ejercida por AMPc en las células oligodendrogiales (Sato-Bigbee y DeVries, 1996). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que CREB es activado por IGF-I en cultivo primario mixto de células cerebrocorticales y que dicha activación es necesaria para la inducción de MBP por IGF-I (Palacios et al., 2005).

En este trabajo hemos **demostrado que CREB es activado por GH en cultivo primario mixto de células cerebrocorticales**. Aunque otros estudios llevados a cabo en diferentes tipos celulares han demostrado el efecto de GH en la activación de CREB (Yarwood et al., 1998), nuestros resultados son los primeros en evidenciar que la GH activa al factor de transcripción CREB en células cerebrocorticales embrionarias. Dado que la fosforilación de CREB en los OD también es estimulada por el IGF-I y otros conocidos factores que influyen en el proceso de oligodendrogénesis como el AMPc o la NT3 (Raible y McMorris, 1989; Barres et al., 1994; Sato-Bigbee y DeVries, 1996), es posible que la activación de CREB inducida por GH medie en el desarrollo de los OD inducido por GH. CREB podría integrar las acciones de diferentes cascadas de señalización activadas por distintas señales para regular la diferenciación de los OD y la mielinización.

A pesar de los datos que avalan la implicación de CREB en el proceso de mielinización, los resultados obtenidos en varios laboratorios (Gandelman et al., 1989; Zhang y Miskimins, 1993) indican que el tiempo requerido para la estimulación de la expresión de MBP por AMPc (24-48h) es demasiado largo para asumir una regulación directa por CREB. Esta observación junto con la ausencia de un sitio de unión a CREB en la región promotora del gen de MBP requerida para la inducción de AMPc (Zhang y Miskimins, 1993) apoya la idea de que CREB puede regular la expresión de MBP de manera indirecta. Zhang y Miskimins (1993) observaron que la región necesaria para la inducción de MBP no contiene una secuencia CRE sino un sitio de unión para el factor nuclear I (NFI). El NFI es una proteína de unión al ADN que activa la transcripción de numerosos genes eucariotas (Jones et al., 1987) y su unión al promotor de MBP ha sido observada por varios investigadores (Tamura et al., 1988; Miura et al., 1989; Aoyama et al., 1990). Aunque el papel de CREB en la regulación de los niveles de factores de transcripción que afectan la expresión de MBP es desconocido, existe la posibilidad de que

CREB estimule la expresión de otras proteínas nucleares que pueden a su vez unirse directamente al gen de MBP y activarlo.

2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GH SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

2.1.- Efecto del tratamiento con GH i.c.v. sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

El presente estudio **demuestra la existencia de una disminución en el contenido de MBP cerebral asociada al envejecimiento en la rata.** Esta disminución está en consonancia con los hallazgos de otros autores en el cerebro humano (Lintl y Braak, 1983; Kemper, 1993) que han observado una disminución relacionada con la edad de la tinción específica para mielina en la corteza y en la sustancia blanca cerebral. En el mismo sentido, Peters y Sethares (2002) han evidenciado en diversas regiones cerebrales de primates viejos numerosas alteraciones estructurales de la mielina que reflejan una degeneración axonal.

Además de confirmar la disminución del contenido de mielina en cerebro envejecido, **hemos puesto de manifiesto por primera vez la capacidad del tratamiento con GH i.c.v. de revertir la hipomielinización del cerebro de rata vieja en todas las áreas cerebrales estudiadas.** Dado que tanto la GH como el IGF-I participan en el proceso de oligodendrogénesis, la disminución de los niveles de GH e IGF-I en el envejecimiento podría contribuir a las alteraciones de la vaina de mielina que ocurren con la edad. La reversibilidad de la hipomielinización tras el tratamiento con GH, observado en este estudio, apoya esta hipótesis.

Estudios previos han mostrado que el ritmo de remielinización tras una desmielinización experimental está disminuido en la rata vieja (Shields et al., 1999) y que este hecho se asocia con un retraso en la acumulación del ARNm del IGF-I en la lesión desmielinizante (Hinks y Franklin, 2000). Estos hallazgos sugieren que en la rata vieja existe, quizá como consecuencia de los bajos niveles de GH e IGF-I, una cierta incapacidad para reponer a un ritmo adecuado posibles pérdidas fisiológicas de mielina resultando finalmente en una disminución de su contenido. También se ha descrito una disminución selectiva en la actividad, tanto basal como inducida, de la vía de señalización MAPK en el cerebro de animales viejos (Zhen et al., 1999). Este mecanismo podría contribuir a la hipomielinización del cerebro envejecido, dada la importancia de esta vía de señalización en la iniciación del efecto de GH e IGF-I sobre el proceso de oligodendrogénesis, como hemos puesto de manifiesto en el presente trabajo y en estudios previos (Palacios et al., 2005).

2.2.- Efecto del tratamiento subcutáneo con GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

Una vez comprobado el efecto remielinizante de la administración i.c.v. de GH estudiamos la efectividad de la GH administrada periféricamente como un tratamiento alternativo más próximo a una posible aplicación terapéutica.

En este estudio, donde analizamos el contenido de mielina mediante Western immunoblot, **observamos una disminución evidente de la banda de 21 kDa asociada al envejecimiento**. En trabajos previos donde se ha determinado la mielina mediante Western immunoblot y en estudios de expresión de los ARNm de MBP se ha observado que cada isoforma presenta su propio patrón de expresión y acumulación durante el desarrollo (Carson et al., 1983). En general, los estudios disponibles indican que la isoforma de 21 kDa se expresa en mayor proporción durante el desarrollo temprano del cerebro, y se encuentra en concentraciones proporcionalmente más altas en mielina aislada de cerebros de roedores jóvenes. Con la edad la proporción de las isoformas de MBP de 21 y 17 kDa disminuye en relación con la de las isoformas de 18,5 y 14 kDa (Sugiyama et al., 2002)

El tratamiento con GH subcutánea no incrementó la expresión de la banda de 21kDa en el cerebro de las ratas viejas. Diversas razones pueden justificar este hallazgo. En primer lugar, es posible que el tiempo de tratamiento y la dosis de GH s.c. no hayan sido suficientes para conseguir una recuperación como la observada con la GH i.c.v.. Otro posible factor puede ser el hecho de que al ser los animales tratados con GH s.c. más viejos (29 meses) que los tratados con GH i.c.v. (28 meses), la capacidad de remielinización esté más deteriorada. Además, hay que tener en cuenta la distinta sensibilidad de los métodos analíticos utilizados para valorar el contenido de mielina. En el Western immunoblot se analizó la expresión de MBP en extractos de corteza cerebral anterior mientras que con la inmunohistoquímica analizamos áreas concretas, ricas en MBP, donde los cambios se evidencian con mayor precisión.

2.3.- Mediación de IGF-I en los efectos de GH sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

El hecho de que el tratamiento con GH s.c. no nos permitiera evidenciar cambios en la expresión de MBP nos llevó a realizar un estudio adicional donde se valoró la expresión de MBP por inmunohistoquímica. Además, nos propusimos clarificar si el efecto observado de GH en la remielinización del cerebro de rata vieja se debía a una acción directa de GH o estaba mediado por un factor inducido por GH. Los efectos de GH en la función cerebral *in vivo* pueden resultar de la acción directa de la hormona en sus receptores cerebrales o ser debidos a la inducción por GH de mediadores locales o periféricos que acceden al SNC. En este sentido, estudios previos realizados en nuestro laboratorio en cultivos de células cerebrocorticales han demostrado que la estimulación de la proliferación y diferenciación de precursores neurales por GH está mediada por la inducción local del IGF-I (Ajo et al., 2003).

Son numerosos los trabajos que han puesto de manifiesto la participación del IGF-I en el desarrollo y supervivencia de los OD y de sus progenitores, así como en la mielinización (Baker et al., 1993; Carson et al., 1993; Ye et al., 1995; Liu et al., 2002; Aberg et al., 2007). El hecho de que estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraran la capacidad del IGF-I para inducir el desarrollo de los OD *in vitro* (Palacios et al., 2005) junto con la observación, confirmada en este trabajo, de que la administración de GH estimula la expresión del IGF-I en los hemisferios cerebrales de la rata vieja (López-Fernández et al., 1996) nos llevó a estudiar la posible implicación del IGF-I en los efectos observados de GH en la remielinización del cerebro de las ratas viejas.

Con este objetivo se empleó la estrategia del bloqueo de la acción del IGF-I mediante un inhibidor específico del R-IGF-I, JB-1. Aunque el tratamiento con GH no produjo un aumento significativo de la expresión de MBP en la comisura blanca anterior, el bloqueo del R-IGF-I disminuyó la expresión de MBP en respuesta a GH sugiriendo la implicación del IGF-I en la remielinización inducida por GH.

A pesar de que se ha demostrado la capacidad del IGF-I de atravesar la BHE (Reinhardt y Bondy, 1994), el hecho de que en nuestras condiciones experimentales el tratamiento con GH no produzca cambios significativos en los niveles del IGF-I circulante, pero si en ciertas áreas cerebrales como en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas, sugiere que el IGF-I de origen local sea el mediador de las acciones de GH en la remielinización del cerebro de rata vieja.

2.4.- Efecto de GH sobre la activación de CREB en el cerebro de ratas viejas

En este estudio **se confirma que en el envejecimiento se produce una disminución de la activación de CREB en la corteza cerebral anterior y en el hipocampo de las ratas viejas**, como se había observado en varios estudios previos (Asanuma et al., 1996; Hattiangady et al., 2005; Williams et al., 2008). Se ha sugerido que la disminución de la expresión de CREB en el envejecimiento posiblemente contribuye a la alteración de la regulación de la expresión de genes mediada por AMPc según avanza la edad y a las deficiencias cognitivas que acompañan al envejecimiento fisiológico. Por otro lado, como hemos mencionado anteriormente, se ha demostrado que CREB participa, al menos de manera indirecta, en la inducción de MBP, por lo que la disminución de la expresión de este factor de transcripción en el envejecimiento podría estar implicada también en la hipomielinización del cerebro de la rata vieja.

A diferencia de lo observado en los estudios *in vitro*, **la GH no activa la fosforilación de CREB en el cerebro de la rata vieja**. La falta de activación de CREB tras la administración de GH puede estar relacionada con una alteración de la capacidad intrínseca de activación de CREB en el envejecimiento. En este sentido, algunos estudios realizados en ratas y en ratones viejos han demostrado que en el envejecimiento no solo se produce una disminución de los niveles basales de activación de CREB, sino también una desregulación de la activación de CREB ante distintos estímulos, como el aprendizaje (Asanuma et al., 1996; Foster et al., 2001; Brightwell et al., 2004; Hattiangady et al., 2005; Monti et al., 2005).

Se ha sugerido que el envejecimiento podría afectar a la amplitud y al perfil temporal de la fosforilación de CREB. Así, el estudio de Tomobe et al. (2007) demostró en ratones con envejecimiento acelerado (SAMP8) una alteración del patrón de activación de CREB en comparación con ratones controles. Los ratones SAMP8 manifestaron un único pico de fosforilación de CREB, 9 horas después de la estimulación. Por motivos técnicos, nuestras ratas fueron sacrificadas en un intervalo de tiempo entre 30 minutos y 2 horas después de la administración de la última dosis de GH. Esto plantea la posibilidad de que la activación de CREB en las ratas viejas podría ser observada a tiempos más largos que a los que se sacrificaron nuestros animales.

Diferentes vías de señalización promueven la fosforilación de CREB, y se han demostrado numerosas proteínas quinasas implicadas en su activación. En neuronas, las quinasas PKA, MAPK y CaMKIV juegan un papel relevante en la fosforilación de CREB tras la estimulación neuronal (Barco et al., 2003; Carlezon et al., 2005). Por lo tanto, es posible que la falta de activación de CREB tras el tratamiento con GH pueda estar relacionada con alteraciones de las vías de señalización intracelulares implicadas en su fosforilación. En esta línea, se ha sugerido que cambios en la homeostasis del Ca^{2+} durante el envejecimiento son el principal factor que altera el balance entre las actividades de las proteínas quinasas y de las fosfatasas y, por tanto, desencadenante de la pérdida de fosforilación de CREB y de la expresión de genes mediada por CRE (Foster et al., 2001).

Por último, debemos considerar la duración del tratamiento con GH. En el estudio de Xu et al. (2010) el tratamiento de ratas viejas con procianidinas consiguió elevar significativamente los niveles de CREB fosforilado en el hipocampo de ratas con deficiencias cognitivas. En este estudio, las ratas fueron tratadas durante 7 semanas, mientras que las nuestras fueron tratadas durante 1 semana. Quizás, sea necesario un tratamiento con GH de mayor duración para observar cambios significativos en la activación del factor de transcripción CREB.

C.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GHRP-6 SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENESIS

1.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE OD EN CÉLULAS CEREBROCORTICALES EMBRIONARIAS

Además de su papel en la regulación de la secreción de GH, los GHS y la ghrelina tienen importantes acciones tróficas en diversos órganos y tejidos periféricos. Existe escasa información sobre las acciones de la ghrelina en el SNC. En ratas se ha observado una acción proliferativa de la ghrelina en neuronas del nervio vago (Zhang et al., 2004) y en el hipocampo (Johansson et al., 2008; Barlind et al., 2010). No existen estudios sobre el papel de la ghrelina y los GHS en el desarrollo del sistema nervioso, ni en los procesos de oligodendrogénesis y mielinización del cerebro durante el desarrollo.

En este estudio hemos observado que el tratamiento con GHRP-6 de células cerebrocorticales embrionarias induce la expresión de MBP en todas las concentraciones estudiadas, observándose un efecto dosis-respuesta con un pico máximo a la concentración de 10^{-8} M y un menor efecto a concentraciones superiores o inferiores. Estos resultados sugieren la existencia de receptores funcionales de ghrelina en nuestro cultivo de células neurales embrionarias y confirman que el GHRP-6 es capaz de inducir el proceso de diferenciación de los OD a OD maduros que expresan MBP. Además, evidencian por primera vez que el GHRP-6 es capaz de promover la oligodendrogénesis en el cerebro durante el desarrollo embrionario sugiriendo que la ghrelina juegue un papel en el proceso de mielinización del cerebro durante esta etapa.

2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

2.1.- Efecto del tratamiento con GHRP-6 subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

La activación por GH de la remielinización del cerebro de ratas viejas junto con el estímulo por GHRP-6 del proceso de oligodendrogénesis *in vitro* nos llevó a estudiar el efecto del tratamiento con GHRP-6 *in vivo* sobre la hipomielinización del cerebro de ratas viejas.

El presente estudio, confirma, una vez más, la existencia de una disminución en el contenido de MBP cerebral asociada al envejecimiento, y **pone de manifiesto por primera vez, su reversibilidad parcial tras el tratamiento con GHRP-6.**

Tanto en ratas de 24 como de 29 meses, el tratamiento con GHRP-6 durante 15 días produjo un aumento de la expresión de MBP, analizado tanto por inmunohistoquímica como por Western inmunoblot. En las ratas de 29 meses de edad el efecto solo se observó en la corteza cerebral anterior y no en el hipocampo, sugiriendo un efecto área-específico. Este efecto remielinizante, está en línea con estudios previos que han demostrado acciones neuroprotectoras de la ghrelina en los oligodendrocitos (Lee et al., 2011) y la implicación de los GHS en el proceso de mielinización en un modelo de lesión medular (Lee, Chung, et al., 2010).

2.2- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por GHRP-6 en el cerebro de ratas viejas

Al igual que con la GH, los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo* no nos permiten afirmar si el efecto observado de GHRP-6 en la oligodendrogénesis y en la remielinización del cerebro de rata vieja se debe a una acción directa o está mediado por un factor inducido por GHRP-6.

Estudios previos han sugerido que las acciones neuroprotectores de ghrelina podrían implicar al eje GH/IGF-I. Dado que el IGF-I es un importante activador de la mielinización y que ghrelina induce la expresión del IGF-I en ciertas condiciones experimentales (Frago et al., 2002, 2005), el IGF-I podría mediar las acciones de GHRP-6 sobre la hipomielinización del cerebro de las ratas viejas. Con el objetivo de dilucidar el papel del IGF-I en el efecto remielinizante del GHRP-6 se empleó la misma estrategia utilizada con GH. Esto nos permitió demostrar que **el IGF-I participa en la remielinización inducida por GHRP-6 en el cerebro de las ratas viejas**, ya que el bloqueo del R-IGF-I produce una disminución de la expresión de MBP en respuesta a GHRP-6. La participación del IGF-I en los efectos neuroprotectores de la ghrelina en la sustancia blanca ha sido sugerida anteriormente por Lee, Chung, et al. (2010) en un modelo de lesión medular donde observaron que las acciones de la ghrelina sobre la mielina iban acompañadas de un aumento de la expresión del IGF-I en el tejido lesionado.

Aunque el tratamiento con GHRP-6 no incrementa los niveles del IGF-I circulante ni del ARNm del IGF-I en ninguna de las áreas cerebrales estudiadas, la disminución del efecto de

GHRP-6 sobre la remielinización del cerebro viejo al bloquear el receptor del IGF-I sugiere que el GHRP-6 requiere la presencia del IGF-I en sus acciones mielinizantes.

3.- EFECTO DE GHRP-6 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS

La información actual sobre el papel de CREB en la estimulación de la transcripción por GHS es escasa. Se ha demostrado *in vitro* que GHRP-6 induce la fosforilación de CREB en células GH3 (Tian et al., 2010) y en cultivos de células hipocampales (Cuellar e Isokawa, 2011). *In vivo*, en un modelo de ratas diabéticas, la ghrelina aumenta la fosforilación de CREB en el hipocampo (Ma et al., 2011) y en el hipotálamo de ratas adultas tras su administración i.c.v. (Lage et al., 2010).

En nuestro estudio **GHRP-6 no promueve la fosforilación de CREB en el cerebro de la rata vieja**. Esta falta de efecto puede deberse a causas similares a los mencionados en el caso de GH, como una pérdida de la capacidad intrínseca de activación de CREB en el envejecimiento, un patrón tiempo-respuesta alterado, una alteración de las vías de señalización implicadas en la fosforilación de CREB, un tiempo de sacrificio de los animales no adecuado para ver el pico de activación de CREB o una duración del tratamiento demasiado corta para producir los cambios celulares necesarios para recuperar la capacidad de activación de CREB en el envejecimiento.

D.- ALTERACIONES DE BDNF RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO

1.- Expresión del ARNm de BDNF en el cerebro de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

Numerosos estudio *in vitro* e *in vivo*, han puesto de manifiesto la relevancia de BDNF en los procesos de oligodendrogénesis y mielinización en el SNC y SNP. Alteraciones de la expresión o función de BDNF con la edad podrían jugar un papel causal en la hipomielinización característica del envejecimiento.

Nuestros resultados muestran una disminución en la expresión del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior y en el hipocampo de la rata vieja. En ratas, el efecto del envejecimiento en la expresión de BDNF es controvertido. Así, en función de la cepa de rata, el área cerebral estudiada y la técnica de cuantificación utilizada se han descrito aumentos (Kato-Semba et al., 1998), disminuciones (Narisawa-Saito y Nawa, 1996; Hayashi et al., 1997; Croll et al., 1998; Murer et al., 2001; Hattiangady et al., 2005; Silhol et al., 2005), o no alteraciones (Croll et al., 1998; Kato-Semba et al., 1998; Webster et al., 2002; Bimonte et al., 2003).

En ratas Wistar, la cepa utilizada en el presente estudio, se ha observado mediante PCR que en el hipocampo los niveles del ARNm de BDNF no variaban con la edad mientras que los de la proteína, valorados mediante ELISA, aumentaban (Silhol et al, 2007). Las discrepancias con nuestros resultados pueden deberse a diferencias en la técnica de PCR utilizada y a la diferencia de edad de las ratas en ambos estudios, ya que nuestras ratas eran de 29 meses mientras que las del estudio de Silhol et al. (2007) eran de 24 meses.

El tratamiento con GH aumenta la expresión del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior de la rata vieja pero no en el hipocampo, sugiriendo una acción de GH área-específica. Como hemos mencionado anteriormente, el tratamiento con GH induce la expresión del ARNm de IGF-I en la corteza cerebral anterior, pero no en el hipocampo. Este aumento de la expresión del IGF-I podría ser, a su vez, el responsable del aumento de la expresión de BDNF en la corteza cerebral anterior tras el tratamiento con GH. A favor de esta hipótesis, existen estudios previos que han demostrado que el IGF-I incrementa los niveles de BDNF en áreas cerebrales lesionadas (Kazanis et al., 2004).

El efecto de GHRP-6 sobre la expresión del ARNm de BDNF en el cerebro de rata vieja difiere del ejercido por GH. El GHRP-6 disminuye la expresión del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior sin modificarla en el hipocampo, sugiriendo, de igual manera que con GH, una acción de los GHS sobre la expresión de BDNF área-específica.

2.- Expresión del ARNm de BDNF en la hipófisis de ratas viejas: efecto del tratamiento con GH o GHRP-6

En este estudio se confirma que en el envejecimiento se produce un aumento de la expresión del gen de BDNF en la hipófisis. Este fenómeno fue descrito anteriormente por Rage et al. (2007), quienes además demostraron que el aumento de la expresión del ARNm de BDNF en el envejecimiento no se acompaña de un aumento paralelo de la proteína. En otros estudios se ha observado que los niveles del ARNm de BDNF en la hipófisis no varían en el envejecimiento (Kononen et al., 1994, 1995).

El tratamiento con GH o GHRP-6 tiene un efecto diferente en la expresión del ARNm de BDNF. Mientras que **la GH disminuye significativamente la expresión del ARNm de BDNF en la hipófisis, el GHRP-6 no modifica su expresión.** Estos datos sugieren que los cambios de GH en el envejecimiento influyen la expresión de este factor neurotrófico cuya función en la hipófisis está por definir. **Tanto estos resultados como los obtenidos en la corteza cerebral ponen de manifiesto por primera vez la acción reguladora de la GH sobre la expresión de BDNF en el envejecimiento.**

E.- ALTERACIONES INFLAMATORIAS EN EL CEREBRO RELACIONADAS CON EL ENVEJECIMIENTO

1.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6

Durante los últimos años ha ido ganando consistencia el concepto de que el envejecimiento está asociado a fenómenos inflamatorios tanto a nivel periférico como a nivel cerebral.

Numerosas evidencias sugieren que la inflamación está implicada en la etiopatogenia de diversas enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple o el síndrome Guillain-Barré. En este sentido, diversos estudios han relacionado la inflamación con las alteraciones de la vaina de mielina observadas en el envejecimiento (Sloane et al., 1999; Sandell y Peters, 2002; Hinman et al., 2004).

Se ha observado que en el cerebro viejo se produce un aumento de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el hipocampo y la corteza cerebral (Murray et al., 1997; Ye y Johnson, 1999; Terao et al., 2002; Katafuchi et al., 2003; Xie et al., 2003; Maher et al., 2004; Nolan et al., 2005; Sierra et al., 2007; Tripathy et al., 2010). De acuerdo con hallazgos previos, **en este estudio se confirma un aumento de la expresión de la IL-1 β en el hipocampo de las ratas viejas**, sin observarse cambios en la corteza cerebral anterior. La expresión del TNF- α en el cerebro de las ratas viejas no se altera en las áreas cerebrales estudiadas.

Aunque se ha demostrado que la GH estimula la secreción de citoquinas, su papel como hormona pro o antiinflamatoria no está establecido. Los resultados obtenidos en este trabajo donde se demuestra que **la GH estimula la expresión de la IL-1 β en todas las áreas cerebrales estudiadas y la del TNF- α en la corteza cerebral anterior** apoyan que la GH ejerce acciones fundamentalmente proinflamatorias en el cerebro de la rata vieja. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados *in vitro* e *in vivo* que evidencian que la GH estimula la secreción de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Tseng et al., 1997; Bozzola et al., 1998, 2003; Uronen-Hansson et al., 2003; Pagani et al., 2005).

El efecto del tratamiento con GHRP-6 en la expresión de las citoquinas proinflamatorias es opuesto al observado con GH. **El GHRP-6 disminuye la expresión del ARNm de la IL-1 β en el hipocampo de las ratas viejas sin afectar su expresión en la corteza cerebral anterior**. El GHRP-6 no produce cambios significativos en la expresión del TNF- α , aunque se observa una tendencia inhibitoria. Estos resultados apoyan el papel antiinflamatorio de los GHS demostrado previamente en la gran mayoría de estudios tanto *in vitro* (Dixit et al., 2004; Taub, 2008) como *in vivo* (Chang et al., 2003, 2004; Granado et al., 2005; Gonzalez-Rey, Chorny, et al., 2006; Wu et al., 2007; Chorny et al., 2008) con ghrelina y diversos GHS.

Además, nuestros resultados confirman el potencial terapéutico de los GHS como inhibidores de la inflamación en el envejecimiento demostrado en diversos estudios (Taub y

Longo, 2005; Taub et al., 2010) y como factores neuroprotectores mediante la disminución de citoquinas proinflamatorias (Erşahin et al., 2010; Cheyuo et al., 2011).

El hecho de que la acción antiinflamatoria de la ghrelina haya sido relacionada con efectos neuroprotectores sobre las lesiones desmielinizantes en un modelo animal de esclerosis múltiple (Theil et al., 2009) sugiere que la acción remielinizante de GHRP-6 en el cerebro de rata vieja puede estar vinculada a su efecto antiinflamatorio.

Según nuestros resultados la GH ejercería acciones neuroprotectoras estimulando la expresión de citoquinas proinflamatorias mientras que el GHRP-6 lo haría inhibiendo dichas citoquinas. En este punto debemos considerar que el papel que juegan los mecanismos inflamatorios en la protección del cerebro es cuestionable. Mientras que algunos trabajos relacionan las citoquinas proinflamatorias IL-1 β (Merrill, 1991; Brogi et al., 1997) y TNF- α (Probert et al., 1995; Akassoglou et al., 1997) con alteraciones de la mielinización, otros sustentan sus acciones neuroprotectoras. De especial relevancia son los trabajos que han evidenciado las acciones neuroprotectoras de la IL-1 β sobre los oligodendrocitos y la sustancia blanca (Araujo y Cotman, 1992; Silberstein et al., 1996; Glazebrook et al., 1998; Mason et al., 2001). El paralelismo observado en este estudio entre la acción remielinizante de la GH y la inducción de citoquinas proinflamatorias haría suponer que las acciones proinflamatorias de la GH inducen neuroprotección.

En cuanto a las citoquinas antiinflamatorias, **nuestros resultados sugieren que la expresión de la IL-10 no se modifica significativamente en el envejecimiento**, al menos en las áreas cerebrales estudiadas. **El tratamiento con GH o GHRP-6 no alteró la expresión de la IL-10**. Los estudios previos relativos a la IL-10 no son concluyentes habiéndose observado tanto aumentos (González-Scarano y Baltuch, 1999) como disminuciones (Ye y Johnson, 2001; Maher et al., 2005; Frank et al., 2006) e incluso no cambios (Peterson et al., 1994).

Existen algunos estudios en los que se afirma que CXCL12 participa en la proliferación neuronal, migración celular, crecimiento axonal y mielinización durante el desarrollo del SNC (Zou et al., 1998; Lu et al., 2002; Stumm et al., 2003; Pujol et al., 2005). Sin embargo, no existen datos sobre el efecto del envejecimiento en esta quimioquina ni su implicación en la hipomielinización que acompaña al envejecimiento. **Nuestros resultados sugieren que el envejecimiento no afecta a la expresión del ARNm de CXCL12 en el cerebro.**

Estudios previos realizados *in vivo* han observado que la señalización mediada por CXCL12 y su receptor CXCR4, regula la migración, proliferación y diferenciación de precursores neurales en el SNC tras lesiones desmielinizantes (Carbajal et al., 2010; Patel et al., 2010). Sin embargo, **el tratamiento con GH o GHRP-6 no produce ningún cambio en los niveles de CXCL12, lo que sugiere que el CXCL12 no participa en la remielinización observada con GH y GHRP-6 en el cerebro de la rata vieja.**

2.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS EN LA HIPÓFISIS DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6

Las citoquinas juegan un importante papel en el funcionamiento y en la regulación hipofisaria donde mediante mecanismos autocrinos y/o paracrinos influyen en la secreción hormonal. En la actualidad no existen datos sobre el efecto del envejecimiento en su expresión hipofisaria ni sobre su participación en las alteraciones endocrinas hipofisarias propias del envejecimiento.

Los resultados mostrados en el presente estudio sugieren **que la expresión hipofisaria de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α no se altera con el envejecimiento**. Por el contrario, **la expresión de CXCL12 en la hipófisis aumenta con la edad**, sugiriendo su implicación en las alteraciones funcionales y morfológicas que ocurren en la hipófisis durante el envejecimiento. **El tratamiento con GH estimula la expresión de la IL-1 β y del TNF- α en la hipófisis de las ratas viejas. El GHRP-6 estimula la expresión de la IL-1 β sin afectar la del TNF- α** . Ninguno de los dos tratamientos estimula la expresión de CXCL12. Estos resultados ponen de manifiesto una gran sensibilidad del patrón inflamatorio hipofisario a la GH y GHRP-6 durante el envejecimiento, aunque su significado fisiológico es desconocido.

F.- ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE LA MEMORIA EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH O GHRP-6

En la mayoría de las especies animales estudiadas se ha observado que el envejecimiento se acompaña de alteraciones cognitivas, incluso en ausencia de alteraciones patológicas como la enfermedad de Alzheimer. Un gran número de estudios han demostrado una marcada disminución de la capacidad de aprendizaje y de memoria durante el envejecimiento fisiológico (Grady y Craik, 2000; Wyss et al., 2000; Erickson y Barnes, 2003).

Dado que tanto los humanos (Deijen et al., 1996; Sartorio et al., 1996; Rollero et al., 1998) como las ratas (Noguchi, Sugisaki, Tsukada, 1982; Bouchon y Will, 1983) con DGH presentan importantes alteraciones cognitivas, se ha sugerido que la disminución de los niveles de GH e IGF-I podría ser una de las causas implicadas en las alteraciones cognitivas en el envejecimiento fisiológico (Rollero et al., 1998; Aleman et al., 1999) e incluso en patologías como el Alzheimer (Connor et al., 1997; Connor y Dragunow, 1998).

El comportamiento de alternancia espontánea define la tendencia que tienen las ratas de alternar su elección de entrada en los brazos de un laberinto en Y en sucesivas oportunidades. Desde que este comportamiento fue descrito (Tolman, 1925), este fenómeno ha sido asociado con una gran variedad de mecanismos incluidos la curiosidad (Dember y Earl, 1957), la adaptación a la novedad (Carlton, 1969) y la memoria espacial de trabajo o la memoria a corto plazo (Sarter et al., 1988).

Mediante la utilización del test del laberinto en Y nos propusimos valorar el comportamiento de alternancia espontánea para estudiar las alteraciones cognitivas de las ratas viejas y su posible reversibilidad tras el tratamiento con GH o GHRP-6.

El presente estudio confirma que **en las ratas viejas se produce una alteración del comportamiento de alternancia espontánea**. Además, se observa una **disminución en el número de entradas en los brazos del laberinto con la edad**, indicativa de una disminución en la actividad exploratoria, pero que también puede reflejar alteraciones de la locomoción. Por lo tanto, es difícil establecer si esta variación en el comportamiento de alternancia espontánea es consecuencia de algún tipo de alteración cognitiva y/o otros fenómenos, como una menor actividad locomotora de las ratas viejas que llevaría a una menor exploración por motivos físicos más que por motivos cognitivos.

En el segundo test, en las ratas viejas no tratadas se observa un empeoramiento de estos parámetros en los animales controles, con una disminución significativa en el comportamiento de alternancia espontánea y en el número de entradas. Sin embargo, en las ratas viejas tratadas con GH o GHRP-6 no se aprecia el empeoramiento de estos parámetros, lo que **sugiere que tanto la GH como el GHRP-6 pueden mejorar estos comportamientos, relacionados con alteraciones cognitivas, en las ratas viejas**.

G.- VIP Y ENVEJECIMIENTO CEREBRAL

1.- ALTERACIONES DE LAS CÉLULAS VIPÉRGICAS CEREBRALES EN EL ENVEJECIMIENTO: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GH

En el SNC se han observado variaciones en la expresión de ciertos neuropéptidos asociadas al envejecimiento. Entre los neuropéptidos afectados por el envejecimiento se encuentra VIP (Chee et al., 1988; Gozes et al., 1988; Andreose et al., 1994; Cha et al., 1997; Krajnak et al., 1998; Duncan et al., 2001; Kalló et al., 2004) neuropéptido ampliamente expresado en el SNC de mamíferos donde ejerce importantes funciones neurotróficas y neuroprotectoras.

Los resultados expuestos en este trabajo confirman que **en el envejecimiento se produce un marcado descenso del número de neuronas vipérgicas en el cerebro de las ratas viejas que se acompaña de cambios morfológicos** con una disminución del número y longitud de las dendritas además de una desorganización de la distribución celular como se ha descrito anteriormente (Cha et al., 1995).

El presente estudio pone de manifiesto por primera vez que **la administración de GH i.c.v. revierte la disminución en el número de células vipérgicas así como sus alteraciones morfológicas observadas en el cerebro de las ratas viejas**. Este efecto de GH sobre las neuronas vipérgicas puede deberse a una acción directa o indirecta de la GH. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el IGF-I induce la expresión de VIP en cultivos de células de la hipófisis anterior (Lara et al., 1994). Dado que los

resultados mostrados en este trabajo demuestran que la GH aumenta la expresión del gen del IGF-I en la corteza cerebral anterior, los cambios observados en las neuronas vipérgicas tras la administración de GH podrían estar mediados por el aumento de la expresión del IGF-I.

2.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE VIP SOBRE EL PROCESO DE MIELINOGENÉISIS

2.1.- ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE VIP SOBRE EL PROCESO DE OLIGODENDROGENÉISIS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

2.1.1.- Efecto de VIP sobre el número de precursores de OD y de OD maduros

VIP es un importante factor regulador del crecimiento embrionario (Gressens et al., 1993, 1994, 1998; Hill et al., 1994, 1996, 1999; Glazner et al., 1999; Spong et al., 1999; Servoss et al., 2001). En cultivos de embriones enteros de ratón del día E9.5 el tratamiento con VIP produce un crecimiento dosis-dependiente (Gressens et al., 1993; Glazner et al., 1999; Hill et al., 1999) junto con un aumento de la división celular (Gressens et al., 1998). El tratamiento con VIP aumenta el número de cuerpos celulares y el contenido de ADN y proteína (Gressens et al., 1993; Glazner et al., 1999; Hill et al., 1999), manteniendo constantes las proporciones morfológicas de los embriones. El bloqueo de la acción de VIP mediante el tratamiento de ratones preñados con un agonista de VIP (Gozes et al., 1989, 1991) entre los días E9-E11 resulta en una inhibición significativa del crecimiento embrionario (Gressens et al., 1994), al igual que ocurre al tratar los cultivos de embriones enteros del día E9.5 con un anticuerpo anti VIP (Glazner et al., 1999), demostrando que VIP es necesario para mantener la tasa de crecimiento normal. A pesar de todas las evidencias sobre las acciones tróficas de VIP en el desarrollo embrionario, son escasos los estudios sobre el papel de VIP en la mielinización del cerebro en desarrollo.

En nuestro modelo experimental de cultivo primario mixto, el análisis inmunocitoquímico muestra que VIP es capaz de aumentar el número de OD. Este efecto fue evidente en OD inmaduros (O4+) y en OD maduros (MBP+) siendo más marcado en los OD maduros. Como sucede con otras acciones de VIP el efecto fue más evidente con las dosis más bajas ensayadas (Lorenzo et al., 1989).

Estos resultados son la primera evidencia de que VIP estimula la proliferación de los precursores de OD y promueve su diferenciación a OD maduros y que, por tanto, VIP actúa como un factor mediador de la transición de OD O4 (+) a OD maduros. Además sugieren la implicación de VIP en el proceso de mielinización y consecuentemente en la maduración cerebral durante el desarrollo embrionario.

2.1.2.- Efecto de los inhibidores LY, PD y H89 en la inducción de MBP y/o O4 por VIP

Demostrada la capacidad de VIP de activar las vías de señalización de PKA, MAPK y PI3K en células cerebrocorticales (datos no mostrados) estudiamos, mediante la estrategia del bloqueo con inhibidores específicos, la participación de estas vías en el proceso de oligodendrogénesis y en el efecto de VIP sobre el mismo.

Nuestros resultados indican que **las vía PI3K, MAPK y PKA, participan en la oligodendrogénesis inducida por VIP**. El bloqueo de cada una de ellas conduce a una disminución en el número de OD maduros que se desarrollan en respuesta a VIP y en consecuencia a una disminución en la expresión de MBP inducida por VIP cuando se analiza por inmunocitoquímica. Además, la vía de la PKA participa en la proliferación de OD inmaduros inducida por VIP, como sugiere el hecho de su bloqueo conduce a una disminución en la expresión de O4 inducida por VIP.

Al igual que en experimentos previos observamos una disminución de la expresión basal de MBP en los cultivos tratados solo con los inhibidores LY294002, PD098059 y H89, sugiriendo, como hemos comentado anteriormente, la participación de las vías PI3K, de MAPK y PKA en la diferenciación de los OD.

2.1.3.- Efecto de VIP sobre la activación de CREB

Estudios previos realizados en diversos tipos celulares (Hokari et al., 2005; Persson et al., 2005; Guan et al., 2009), incluidas células hipofisarias en cultivo en nuestro laboratorio (Fernández et al., 2005), han demostrado que VIP es un factor estimulador de la fosforilación de CREB. **Nuestros resultados confirman en un cultivo de células cerebrocorticales que VIP induce la activación de CREB.**

Estudios previos han evidenciado que las vías de señalización PKA (Fernández et al., 2005; Persson et al., 2005; Guan et al., 2009) y MAPK (Fernández et al., 2005; Guan et al., 2009) están implicadas en la activación de CREB por VIP. En este trabajo hemos demostrado que ambas vías de señalización participan en las acciones de VIP en el proceso de oligodendrogénesis por lo que es posible que estas vías estén involucradas en la fosforilación de CREB en respuesta a VIP.

2.2.- ESTUDIO DEL EFECTO DE VIP SOBRE LA REMIELINIZACIÓN DEL CEREBRO EN EL ENVEJECIMIENTO

2.2.1.- Efecto del tratamiento con VIP subcutáneo sobre la remielinización del cerebro de ratas viejas

Durante la última década varios estudios han sugerido que VIP pueda estar implicado en la etiopatogenia de enfermedades que cursan con alteraciones de la mielina como la esclerosis múltiple (Fernandez-Martin et al., 2006; Sun et al., 2006) o la encefalitis experimental

autoinmune en ratones (Gonzalez-Rey, Fernandez-Martin, et al., 2006). Estos antecedentes junto con el estímulo por VIP del proceso de oligodendrogénesis *in vitro* que habíamos observado nos llevó a estudiar el efecto del tratamiento con VIP *in vivo* sobre la hipomielinización del cerebro de ratas viejas.

Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que VIP estimula la remielinización del cerebro de la rata vieja. Este efecto se evidencia en la corteza cerebral anterior pero no en el hipocampo sugiriendo una acción área-específica. Estos hallazgos confirman las acciones neuroprotectoras de VIP sobre la sustancia blanca que han sido descritas previamente en modelos de seccionamiento del nervio ciático (Rayan et al., 1991, 1995; Zhang et al., 2002), en modelos de leucomalacia periventricular en ratón (Gressens et al., 1997, 1998, 1999) y en un modelo de lesión excitotóxica neonatal (Husson et al., 2005). Como hemos demostrado, la GH induce la expresión de VIP en el cerebro de las ratas viejas, lo que sugiere que VIP actúe como uno de los mediadores de GH en su acción remielinizante.

2.2.2.- Papel de BDNF en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas

Una vez demostrada la capacidad de VIP de estimular la remielinización *in vivo* en el cerebro de las ratas viejas, nos planteamos dilucidar los mecanismos implicados en las acciones de VIP sobre la mielina.

Además de sus acciones directas, se ha demostrado que VIP ejerce acciones indirectas mediadas por la liberación por las células gliales de factores como el ADNF y el ADNP (Gozes et al., 2003), la IL-1 α (Brenneman et al., 2003) y la proteasa nexina 1 (Festoff et al., 1996) o potenciando la acción de neurotransmisores (Magistretti, 1986). Uno de los factores a considerar como mediador de las acciones de VIP es el BDNF cuya expresión es inducida por VIP (Pellegri et al., 1998). Este hecho junto con las conocidas acciones de BDNF en la mielinización, nos llevó a plantear si BDNF podría ser un mediador de las acciones remielinizantes de VIP. **Los resultados evidencian que el bloqueo de ambos receptores de BDNF resulta en una disminución de la expresión de MBP en respuesta al tratamiento con VIP.** Nuestros datos demuestran la implicación de BDNF en la acción remielinizante del VIP en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas confirmando estudios previos que demuestran que BDNF media las acciones neuroprotectoras de VIP sobre la sustancia blanca (Husson et al., 2005). Al analizar si el efecto de VIP sobre la remielinización podría deberse a un incremento de BDNF tras la administración de VIP, observamos que VIP no modificaba la disminuida expresión de BDNF en corteza cerebral anterior ni en el hipocampo. Estas evidencias sugieren que BDNF facilita, por mecanismos aún no conocidos, la acción remielinizante de VIP.

El hecho de que el efecto inhibitorio de las acciones de VIP se pone de manifiesto al bloquear tanto el receptor TrkB como el P75^{NTR}, indica la participación de ambos receptores en el efecto mielinizante de BDNF, como se había observado en estudios previos (Taniuchi et al., 1988; Gai et al., 1996; Du, Fischer, et al., 2006; Du, Lercher, et al., 2006; Van't Veer et al., 2009).

2.2.3.- Papel del IGF-I en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de ratas viejas

Estudios previos han demostrado que el IGF-I es un mediador de las acciones de VIP en el crecimiento embrionario y que VIP funciona como un regulador de la expresión génica del IGF-I en el embrión (Servoss et al., 2001). Dada la importancia del IGF-I en la mielinogénesis demostrada en estudios previos (Yao et al., 1995; Mason et al., 2000) y en este estudio, investigamos si el IGF-I tenía algún papel en la acción remielinizante de VIP en el cerebro de la rata vieja.

El bloqueo del R-IGF-I nos permitió demostrar que el IGF-I participa en la remielinización inducida por VIP en el cerebro de las ratas viejas, ya que al bloquear el R-IGF-I se abole la inducción de MBP en respuesta al VIP.

La implicación del IGF-I en la acción remielinización de VIP nos llevó a estudiar el efecto de VIP sobre la expresión del IGF-I y del R-IGF-I en el cerebro de la rata vieja. Los resultados obtenidos indican que VIP no afecta a los niveles de expresión del ARNm del IGF-I ni del R-IGF-I. El hecho de que el bloqueo del R-IGF-I disminuya el efecto de VIP sobre la remielinización del cerebro de rata vieja sin que se produzca una estimulación de la expresión de los genes del IGF-I y del R-IGF-I tras el tratamiento con VIP sugiere una posible interacción entre las vías de señalización del IGF-I y VIP como observamos en estudios previos en hipófisis de rata (Fernández et al., 2003).

3.- ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE VIP

En este estudio realizado en ratas de 24 meses de edad, a diferencia de lo que ocurre en ratas de 29 meses, **no se observa una disminución significativa de la activación de CREB en las áreas cerebrales analizadas**, sugiriendo que el efecto del envejecimiento en la fosforilación de CREB ocurre fundamentalmente en ratas de edad muy avanzada.

Tras la administración de VIP se observa un aumento de la fosforilación de CREB. Sin embargo, la alta variabilidad muestral de nuestro estudio no nos permite establecer una conclusión sobre el efecto de VIP en la activación de CREB en el cerebro de ratas viejas.

4.- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS EN EL CEREBRO DE RATAS VIEJAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON VIP

De acuerdo con los resultados obtenidos en las ratas de 29 meses, en esta parte del estudio **se confirma que en el cerebro de la rata vieja existe una alteración en los perfiles de expresión de las citoquinas caracterizada fundamentalmente por un aumento de la expresión de la IL-1 β en la corteza cerebral anterior y de la IL-6 y de TGF- β en todas las áreas cerebrales estudiadas**. La expresión de TNF- α en el cerebro de las ratas viejas no se

altera. Estos resultados confirman estudios previos que sugieren que en el envejecimiento fisiológico el cerebro presenta un cierto nivel de inflamación crónica, caracterizado por un aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias fundamentalmente en el hipocampo pero también en regiones corticales (Murray et al., 1997; Ye y Johnson, 1999; Terao et al., 2002; Katafuchi et al., 2003; Xie et al., 2003; Maher et al., 2004; Nolan et al., 2005; Sierra et al., 2007; Tripathy et al., 2010).

A pesar de la amplia literatura existente sobre las acciones antiinflamatorias de VIP, nuestros resultados ponen en evidencia acciones de VIP en el cerebro de las ratas viejas fundamentalmente proinflamatorias, como demuestra el hecho de que **VIP estimula en el cerebro de las ratas viejas los niveles del ARNm de la IL-6, del TNF- α y de la IL-1 β** (esta última sin llegar a ser significativa), sin afectar a los niveles de la citoquina antiinflamatoria TGF- β .

El hecho de que la acción remielinizante de VIP sobre el cerebro de rata vieja vaya acompañada fundamentalmente de un efecto estimulador de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α abre de nuevo la problemática sobre el papel beneficioso de la neuroinflamación en el SNC (Schwartz et al., 1999; Yong, 2004). Además, estos resultados avalan, como se ha sugerido, que el concepto de citoquinas proinflamatorias es muy cuestionable dada la alta versatilidad de las citoquinas, las cuales pueden ejercer acciones proinflamatorias o antiinflamatorias dependiendo del estímulo y de los cambios en el microambiente celular que induce su secreción.

En esta línea, está la IL-6, una citoquina pleitrópica, que inicialmente fue considerada como una citoquina proinflamatoria debido a que a menudo es secretada junto con la IL-1 α y el TNF- α (Dinarello et al., 1986). Se ha sugerido que la IL-6 tiene importantes propiedades neurotróficas, dado que promueve el crecimiento y diferenciación de una gran variedad de células, incluidas células madre hematopoyéticas y neurales (Frei et al., 1989; Hirano et al., 1990; Selmaj et al., 1990; Spangelo et al., 1990) y que puede jugar un papel neuroprotector en el cerebro (Yamada y Hatanaka, 1994; Matsuda et al., 1996; Loddick et al., 1998). Además, se considera que la IL-6 podría actuar como un sensor del daño celular y controlar la liberación de citoquinas más tóxicas y promover el comienzo de los procesos reparadores (Maimone et al., 1993).

En cuanto al TNF- α también se han descrito acciones tanto neurotóxicas como neuroprotectoras en el cerebro. La secreción de TNF- α puede iniciar diversos efectos a través de la activación de receptores de membrana. El receptor de TNF- α p55 contiene un dominio inactivo y normalmente su activación produce la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, en ciertas circunstancias, la activación de este receptor también puede conducir a la activación de NF- κ B y contribuir a la supervivencia celular. Estas acciones contradictorias se han asociado con la localización del receptor. Así la internalización del receptor conlleva la muerte celular, mientras que la localización del receptor en la membrana conduce a la supervivencia celular. Un segundo receptor de TNF- α , el receptor P75^{NTR}, está normalmente asociado con el crecimiento y supervivencia celular, sin embargo, éste puede cooperar con el receptor p55 y contribuir a la muerte celular. Por lo tanto, aunque una activación del TNF- α en el cerebro es a menudo considerado como un indicador de la activación de la microglia y de neuroinflamación, un gran número de factores participan en el resultado final.

Dado que tanto el BDNF como el IGF-I participan en la acción remielinizante de VIP en la corteza cerebral anterior de las ratas viejas, estudiamos la participación de estos factores en la estimulación de las citoquinas por VIP. Para ello bloqueamos mediante inhibidores específicos los receptores del BDNF e IGF-I, lo que abolió el efecto de VIP sobre la expresión de citoquinas, apoyando una vez más un papel modulador de BDNF e IGF-I en las acciones de VIP.

Conclusiones

- 1.- Las alteraciones hipofisarias y periféricas descritas confirman el declinar del eje GH-IGF-I en las ratas viejas utilizadas en este estudio y avalan que constituyen un modelo apropiado para el estudio de los efectos del tratamiento con GH y GHRP-6 en las alteraciones cerebrales que acompañan al envejecimiento.
- 2.- Los niveles de expresión de los ARNm del R-GH, IGF-I y R-IGF-I no se modifican ni en la corteza cerebral anterior ni en el hipocampo de las ratas viejas. El tratamiento con GH induce la expresión del ARNm de IGF-I y del R-IGF-I en la corteza cerebral anterior pero no en el hipocampo de las ratas viejas.
- 3.- Se evidencia por primera vez la disminución de la expresión del ARNm del R-GHS-1b en el hipocampo de la rata vieja, sugiriendo un papel de ghrelina en las funciones cognitivas mediadas por el hipocampo.
- 4.- La GH estimula la diferenciación de los oligodendrocitos en células cerebrocorticales embrionarias, lo que sugiere la participación de la GH en el proceso de mielinización durante el desarrollo embrionario. La GH induce la fosforilación de CREB y activa las vías de señalización MAPK y PI3K, las cuales median la inducción de la oligodendrogénesis por GH.
- 5.- Se confirma la existencia de una disminución en el contenido de mielina cerebral asociada al envejecimiento en la rata y se demuestra por primera vez que la administración de GH i.c.v. es capaz de revertir la hipomielinización observada en el cerebro de ratas viejas, efecto que está mediado por IGF-I.
- 6.- Se observa una disminución de la activación de CREB en cerebro que no se modifica por la administración de GH.
- 7.- Se demuestra por primera vez que GHRP-6 es capaz de promover la oligodendrogénesis en células cerebrocorticales embrionarias, lo que sugiere que la ghrelina pueda jugar un papel relevante en el proceso de mielinización durante el desarrollo embrionario.
- 8.- Se demuestra por primera vez que GHRP-6 promueve la remielinización en el cerebro de ratas viejas. Este efecto está mediado por IGF-I.
- 9.- El envejecimiento induce cambios en la expresión del ARNm de BDNF que son específicos de tejido, aumentando en la hipófisis y disminuyendo en las áreas cerebrales estudiadas. El tratamiento con GH, pero no con GHRP-6, revierte los cambios en la expresión del ARNm de BDNF en la corteza cerebral anterior e hipófisis, lo que sugiere que la expresión de BDNF en el envejecimiento está regulada por GH.
- 10.- El patrón de expresión de citoquinas en el cerebro es compatible con alteraciones inflamatorias relacionadas con el envejecimiento cerebral. Se sugiere un efecto estimulador de la GH y atenuador del GHRP-6 de los cambios inflamatorios cerebrales asociados con la edad.
- 11.- Se demuestra una alteración en el comportamiento de alternancia espontánea en ratas viejas, que se modifica parcialmente por GH y GHRP-6.

12.- Se confirma que en el envejecimiento se produce una disminución del número de neuronas vipérgicas además de una alteración de su morfología. La administración de GH i.c.v. revierte estos cambios, demostrándose por primera vez que en el envejecimiento el VIP cerebral está regulado por GH.

13.- VIP promueve la diferenciación de los oligodendrocitos confirmándose su implicación en el proceso de mielinización durante el desarrollo embrionario. Las vías de señalización PI3K, MAPK y PKA están implicadas en la activación del proceso de oligodendrogénesis inducido por VIP. Se demuestra que VIP induce la activación de CREB lo que sugiere que CREB participa en el proceso de oligodendrogénesis inducido por VIP.

14.- Se demuestra por primera vez que VIP estimula la remielinización en el cerebro de la rata vieja. Este efecto está mediado por BDNF e IGF-I.

15.- El estudio del efecto de VIP sobre la expresión de las citoquinas sugiere una acción proinflamatoria de VIP en el cerebro de la rata vieja. Este efecto está mediado por BDNF e IGF-I.

Bibliografía

- Abad, C., Tan, Y.-V., Lopez, R., Nobuta, H., Dong, H., Phan, P., Feng, J.-M., Campagnoni, A.T., Waschek, J.A., 2010.** Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19555–60.
- Abad, C., Waschek, J.A., 2011.** Immunomodulatory roles of VIP and PACAP in models of multiple sclerosis. *Current pharmaceutical design* 17, 1025–35.
- Aberg, D., 2010.** Role of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis in neurogenesis. *Endocrine development* 17, 63–76.
- Aberg, N.D., Brywe, K.G., Isgaard, J., 2006.** Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *The Scientific World Journal* 6, 53–80.
- Aberg, N.D., Johansson, I., Aberg, M.A.I., Lind, J., Johansson, U.E., Cooper-Kuhn, C.M., Kuhn, H.G., Isgaard, J., 2009.** Peripheral administration of GH induces cell proliferation in the brain of adult hypophysectomized rats. *The Journal of endocrinology* 201, 141–50.
- Aberg, N.D., Johansson, U.E., Aberg, M.A.I., Hellström, N.A.K., Lind, J., Bull, C., Isgaard, J., Anderson, M.F., Oscarsson, J., Eriksson, P.S., 2007.** Peripheral infusion of insulin-like growth factor-I increases the number of newborn oligodendrocytes in the cerebral cortex of adult hypophysectomized rats. *Endocrinology* 148, 3765–72.
- Abney, E.R., Williams, B.P., Raff, M.C., 1983.** Tracing the development of oligodendrocytes from precursor cells using monoclonal antibodies, fluorescence-activated cell sorting, and cell culture. *Developmental biology* 100, 166–71.
- Abraham, J., Johnson, R.W., 2009.** Central inhibition of interleukin-1beta ameliorates sickness behavior in aged mice. *Brain, behavior, and immunity* 23, 396–401.
- Adamopoulos, S., Parissis, J.T., Georgiadis, M., Karatzas, D., Paraskevaïdis, J., Kroupis, C., Karavolias, G., Koniavitou, K., Kremastinos, D.T., 2002.** Growth hormone administration reduces circulating proinflammatory cytokines and soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *American heart journal* 144, 359–64.
- Adamopoulos, S., Parissis, J.T., Paraskevaïdis, I., Karatzas, D., Livanis, E., Georgiadis, M., Karavolias, G., Mitropoulos, D., Degiannis, D., Kremastinos, D.T., 2003.** Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *European heart journal* 24, 2186–96.
- Adams, E.F., Lei, T., Buchfelder, M., Bowers, C.Y., Fahlbusch, R., 1996.** Protein kinase C-dependent growth hormone releasing peptides stimulate cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production by human pituitary somatotropinomas expressing gsp oncogenes: evidence for crosstalk between transduction pathways. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 10, 432–8.
- Ajo, R., Cacicedo, L., Navarro, C., Sánchez-Franco, F., 2003.** Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* 144, 1086–97.

- Akassoglou, K., Bauer, J., Kassiotis, G., Lassmann, H., Kollias, G., Probert, L., 1999.** Transgenic models of TNF induced demyelination. *Advances in experimental medicine and biology* 468, 245–59.
- Akassoglou, K., Probert, L., Kontogeorgos, G., Kollias, G., 1997.** Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 158, 438–45.
- Albert, M., 1993.** Neuropsychological and neurophysiological changes in healthy adult humans across the age range. *Neurobiology of aging* 14, 623–5.
- Aleman, A., Verhaar, H.J., De Haan, E.H., De Vries, W.R., Samson, M.M., Drent, M.L., Van der Veen, E.A., Koppeschaar, H.P., 1999.** Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 471–5.
- Aleman, A., de Vries, W.R., de Haan, E.H., Verhaar, H.J., Samson, M.M., Koppeschaar, H.P., 2000.** Age-sensitive cognitive function, growth hormone and insulin-like growth factor 1 plasma levels in healthy older men. *Neuropsychobiology* 41, 73–8.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Cudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A., Bownes, M., 1997.** 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Current biology: CB* 7, 776–89.
- Almazan, G., Honegger, P., Matthieu, J.M., Guentert-Lauber, B., 1985.** Epidermal growth factor and bovine growth hormone stimulate differentiation and myelination of brain cell aggregates in culture. *Brain research* 353, 257–64.
- Almazán, G., Vela, J.M., Molina-Holgado, E., Guaza, C., 2001.** Re-evaluation of nestin as a marker of oligodendrocyte lineage cells. *Microscopy research and technique* 52, 753–65.
- Aloi, J.A., Gertz, B.J., Hartman, M.L., Huhn, W.C., Pezzoli, S.S., Wittreich, J.M., Krupa, D.A., Thorner, M.O., 1994.** Neuroendocrine responses to a novel growth hormone secretagogue, L-692,429, in healthy older subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 79, 943–9.
- Alonso, M., Vianna, M.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H., 2002.** Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cellular and molecular neurobiology* 22, 663–74.
- Alvarez, X.A., Cacabelos, R., 1990.** Effects of GRF (1-29) NH₂ on short-term memory: neuroendocrine and neuropsychological assessment in healthy young subjects. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 12, 493–9.
- Andersen, O., Fahrenkrug, J., Wikkelsø, C., Johansson, B.B., 1984.** VIP in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Peptides* 5, 435–7.
- Andersson, K., Fuxe, K., Eneroth, P., Isaksson, O., Nyberg, F., Roos, P., 1983.** Rat growth hormone and hypothalamic catecholamine nerve terminal systems. Evidence for rapid and discrete reductions in dopamine and noradrenaline levels and turnover in the median eminence of the hypophysectomized male rat. *European journal of pharmacology* 95, 271–5.
- Andreose, J.S., Fumagalli, G., Clementi, F., 1994.** On the effect of ageing on the distribution of vasoactive intestinal polypeptide and calcitonin gene-related peptide in the rat brain. *Neuroscience letters* 171, 167–71.

- Andrews, Z.B., 2011.** The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends in neurosciences* 34, 31–40.
- Andrews, Z.B., Erion, D., Beiler, R., Liu, Z.-W., Abizaid, A., Zigman, J., Elsworth, J.D., Savitt, J.M., DiMarchi, R., Tschoep, M., Roth, R.H., Gao, X.-B., Horvath, T.L., 2009.** Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 14057–65.
- Ansari, K.A., Loch, J., 1975.** Decreased myelin basic protein content of the aged human brain. *Neurology* 25, 1045–50.
- Antel, J.P., Williams, K., Blain, M., McRea, E., McLaurin, J., 1994.** Oligodendrocyte lysis by CD4+ T cells independent of tumor necrosis factor. *Annals of neurology* 35, 341–8.
- Aoyama, A., Tamura, T.A., Mikoshiba, K., 1990.** Regulation of brain-specific transcription of the mouse myelin basic protein gene: function of the NFI-binding site in the distal promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 167, 648–53.
- Arai, Y., Hirose, N., Yamamura, K., Shimizu, K., Takayama, M., Ebihara, Y., Osono, Y., 2001.** Serum insulin-like growth factor-1 in centenarians: implications of IGF-1 as a rapid turnover protein. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 56, M79–82.
- Araujo, D.M., Cotman, C.W., 1992.** Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 1668–78.
- Arenander A.T., De Vellis J., 1994.** Development of the nervous system, in: Siegel (Ed.), *Basic Neurochemistry*. Raven Press, New York, pp. 573–606.
- Argetsinger, L.S., Campbell, G.S., Yang, X., Witthuhn, B.A., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., Carter-Su, C., 1993.** Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. *Cell* 74, 237–44.
- Argetsinger, L.S., Carter-Su, C., 1996.** Growth hormone signalling mechanisms: involvement of the tyrosine kinase JAK2. *Hormone research* 45 Suppl 1, 22–4.
- Argetsinger, L.S., Hsu, G.W., Myers, M.G., Billestrup, N., White, M.F., Carter-Su, C., 1995.** Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *The Journal of biological chemistry* 270, 14685–92.
- Argetsinger, L.S., Norstedt, G., Billestrup, N., White, M.F., Carter-Su, C., 1996.** Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. *The Journal of biological chemistry* 271, 29415–21.
- Arnsten, A.F., Goldman-Rakic, P.S., 1985.** Alpha 2-adrenergic mechanisms in prefrontal cortex associated with cognitive decline in aged nonhuman primates. *Science (New York, N.Y.)* 230, 1273–6.
- Arosio, M., Ronchi, C.L., Gebbia, C., Cappiello, V., Beck-Peccoz, P., Peracchi, M., 2003.** Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 701–4.

- Artico, M., Bronzetti, E., Felici, L.M., Alicino, V., Ionta, B., Bronzetti, B., Magliulo, G., Grande, C., Zamai, L., Pasquantonio, G., De Vincentiis, M., 2008.** Neurotrophins and their receptors in human lingual tonsil: an immunohistochemical analysis. *Oncology reports* 20, 1201–6.
- Arvat, E., Di Vito, L., Broglio, F., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F.F., Deghenghi, R., Camanni, F., Ghigo, E., 2000.** Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of endocrinological investigation* 23, 493–5.
- Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F.F., Deghenghi, R., Camanni, F., Ghigo, E., 2001.** Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 1169–74.
- Arvat, E., Ramunni, J., Bellone, J., Di Vito, L., Baffoni, C., Broglio, F., Deghenghi, R., Bartolotta, E., Ghigo, E., 1997.** The GH, prolactin, ACTH and cortisol responses to Hexarelin, a synthetic hexapeptide, undergo different age-related variations. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 137, 635–42.
- Arwert, L.I., Veltman, D.J., Deijen, J.B., Lammertsma, A.A., Jonker, C., Drent, M.L., 2005.** Memory performance and the growth hormone/insulin-like growth factor axis in elderly: a positron emission tomography study. *Neuroendocrinology* 81, 31–40.
- Arwert, L.I., Veltman, D.J., Deijen, J.B., van Dam, P.S., Drent, M.L., 2006.** Effects of growth hormone substitution therapy on cognitive functioning in growth hormone deficient patients: a functional MRI study. *Neuroendocrinology* 83, 12–9.
- Arzt, E., Pereda, M.P., Castro, C.P., Pagotto, U., Renner, U., Stalla, G.K., 1999.** Pathophysiological role of the cytokine network in the anterior pituitary gland. *Frontiers in neuroendocrinology* 20, 71–95.
- Asanuma, M., Nishibayashi, S., Iwata, E., Kondo, Y., Nakanishi, T., Vargas, M.G., Ogawa, N., 1996.** Alterations of cAMP response element-binding activity in the aged rat brain in response to administration of rolipram, a cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor. *Brain research. Molecular brain research* 41, 210–5.
- Ashcroft, G.S., Horan, M.A., Ferguson, M.W., 1995.** The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals. *Journal of anatomy* 187, Pt 1, 1–26.
- Aston-Jones, G., Rogers, J., Shaver, R.D., Dinan, T.G., Moss, D.E., 1985.** Age-impaired impulse flow from nucleus basalis to cortex. *Nature* 318, 462–4.
- Atcha, Z., Chen, W.-S., Ong, A.B., Wong, F.-K., Neo, A., Browne, E.R., Witherington, J., Pemberton, D.J., 2009.** Cognitive enhancing effects of ghrelin receptor agonists. *Psychopharmacology* 206, 415–27.
- Azcoitia, I., Perez-Martin, M., Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Garcia-Segura, L.M., Tresguerres, J.A.F., 2005.** Growth hormone prevents neuronal loss in the aged rat hippocampus. *Neurobiology of aging* 26, 697–703.
- Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J., Efstratiadis, A., 1993.** Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75, 73–82.

- Baker, L.D., Barsness, S.M., Borson, S., Merriam, G.R., Friedman, S.D., Craft, S., Vitiello, M.V., 2012.** Effects of Growth Hormone-Releasing Hormone on Cognitive Function in Adults With Mild Cognitive Impairment and Healthy Older Adults: Results of a Controlled Trial. *Archives of neurology* 1–10.
- Baldanzi, G., Filigheddu, N., Cutrupi, S., Catapano, F., Bonisconi, S., Fubini, A., Malan, D., Baj, G., Granata, R., Broglio, F., Papotti, M., Surico, N., Bussolino, F., Isgaard, J., Deghenghi, R., Sinigaglia, F., Prat, M., Muccioli, G., Ghigo, E., Graziani, A., 2002.** Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *The Journal of cell biology* 159, 1029–37.
- Balschun, D., Wetzel, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., Besedovsky, H.O., 2004.** Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 1788–90.
- Bansal, V., Ryu, S.Y., Blow, C., Costantini, T., Loomis, W., Eliceiri, B., Baird, A., Wolf, P., Coimbra, R., 2010.** The hormone ghrelin prevents traumatic brain injury induced intestinal dysfunction. *Journal of neurotrauma* 27, 2255–60.
- Barbarese, E., Braun, P.E., Carson, J.H., 1977.** Identification of prelarge and presmall basic proteins in mouse myelin and their structural relationship to large and small basic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 3360–4.
- Barbieri, F., Bajetto, A., Porcile, C., Pattarozzi, A., Schettini, G., Florio, T., 2007.** Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. *Journal of molecular endocrinology* 38, 383–9.
- Barco, A., Pittenger, C., Kandel, E.R., 2003.** CREB, memory enhancement and the treatment of memory disorders: promises, pitfalls and prospects. *Expert opinion on therapeutic targets* 7, 101–14.
- Barde, Y.A., 1989.** Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2, 1525–34.
- Barde, Y.A., Edgar, D., Thoenen, H., 1982.** Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* 1, 549–53.
- Barlind, A., Karlsson, N., Åberg, N.D., Björk-Eriksson, T., Blomgren, K., Isgaard, J., 2010.** The growth hormone secretagogue hexarelin increases cell proliferation in neurogenic regions of the mouse hippocampus. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 20, 49–54.
- Barnard, R., Quirk, P., Waters, M.J., 1989.** Characterization of the growth hormone-binding protein of human serum using a panel of monoclonal antibodies. *The Journal of endocrinology* 123, 327–32.
- Barnes, C.A., 1979.** Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology* 93, 74–104.
- Barnes, C.A., Nadel, L., Honig, W.K., 1980.** Spatial memory deficit in senescent rats. *Canadian journal of psychology* 34, 29–39.
- Barreca, A., Ketelslegers, J.M., Arvigo, M., Minuto, F., Thissen, J.P., 1998.** Decreased acid-labile subunit (ALS) levels by endotoxin in vivo and by interleukin-1beta in vitro. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 8, 217–23.

- Barres, B.A., Raff, M.C., 1999.** Axonal control of oligodendrocyte development. *The Journal of cell biology* 147, 1123–8.
- Barres, B.A., Raff, M.C., Gaese, F., Bartke, I., Dechant, G., Barde, Y.A., 1994.** A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development. *Nature* 367, 371–5.
- Barres, B.A., Schmid, R., Sendtner, M., Raff, M.C., 1993.** Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival. *Development (Cambridge, England)* 118, 283–95.
- Barrett, G.L., 2000.** The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Progress in neurobiology* 61, 205–29.
- Barrientos, R.M., Higgins, E.A., Biedenkapp, J.C., Sprunger, D.B., Wright-Hardesty, K.J., Watkins, L.R., Rudy, J.W., Maier, S.F., 2006.** Peripheral infection and aging interact to impair hippocampal memory consolidation. *Neurobiology of aging* 27, 723–32.
- Bartke, A., Chandrashekar, V., Turyn, D., Steger, R.W., Debeljuk, L., Winters, T.A., Mattison, J.A., Danilovich, N.A., Croson, W., Wernsing, D.R., Kopchick, J.J., 1999.** Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 222, 113–23.
- Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K.A., Serodio, P., Kandel, E.R., 1998.** CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 95, 211–23.
- Bartzokis, G., Cummings, J.L., Sultzer, D., Henderson, V.W., Nuechterlein, K.H., Mintz, J., 2003.** White matter structural integrity in healthy aging adults and patients with Alzheimer disease: a magnetic resonance imaging study. *Archives of neurology* 60, 393–8.
- Basille, M., Cartier, D., Vaudry, D., Lihmann, I., Fournier, A., Freger, P., Gallo-Payet, N., Vaudry, H., Gonzalez, B., 2006.** Localization and characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors in the human cerebellum during development. *The Journal of comparative neurology* 496, 468–78.
- Baumann, G., 1991.** Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocrine reviews* 12, 424–49.
- Baumann, G., Shaw, M.A., 1990a.** A second, lower affinity growth hormone-binding protein in human plasma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 70, 680–6.
- Baumann, G., Shaw, M.A., 1990b.** Plasma transport of the 20,000-dalton variant of human growth hormone (20K): evidence for a 20K-specific binding site. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 71, 1339–43.
- Baumann, G., Shaw, M.A., Amburn, K., 1989.** Regulation of plasma growth hormone-binding proteins in health and disease. *Metabolism: clinical and experimental* 38, 683–9.
- Baumann, G., Stolar, M.W., Amburn, K., 1985.** Molecular forms of circulating growth hormone during spontaneous secretory episodes and in the basal state. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 60, 1216–20.

- Baumann, G., Stolar, M.W., Amburn, K., Barsano, C.P., DeVries, B.C., 1986.** A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 62, 134–41.
- Bałkowiec-Iskra, E., Vermehren-Schmaedick, A., Balkowiec, A., 2011.** Tumor necrosis factor- α increases brain-derived neurotrophic factor expression in trigeminal ganglion neurons in an activity-dependent manner. *Neuroscience* 180, 322–33.
- Bechtold, D.A., Brown, T.M., Luckman, S.M., Piggins, H.D., 2008.** Metabolic rhythm abnormalities in mice lacking VIP-VPAC2 signaling. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 294, R344–51.
- Bednarek, M.A., Feighner, S.D., Pong, S.S., McKee, K.K., Hreniuk, D.L., Silva, M.V., Warren, V.A., Howard, A.D., Van Der Ploeg, L.H., Heck, J.V., 2000.** Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *Journal of medicinal chemistry* 43, 4370–6.
- Beharka, A.A., Meydani, M., Wu, D., Leka, L.S., Meydani, A., Meydani, S.N., 2001.** Interleukin-6 production does not increase with age. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 56, B81–8.
- Beilharz, E.J., Russo, V.C., Butler, G., Baker, N.L., Connor, B., Sirimanne, E.S., Dragunow, M., Werther, G.A., Gluckman, P.D., Williams, C.E., Scheepens, A., 1998.** Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain research. Molecular brain research* 59, 119–34.
- Benagiano, V., Virgintino, D., Maiorano, E., Rizzi, A., Palombo, S., Roncali, L., Ambrosi, G., 1996.** VIP-like immunoreactivity within neurons and perivascular neuronal processes of the human cerebral cortex. *European journal of histochemistry : EJH* 40, 53–6.
- Bengtsson, B.A., Edén, S., Lönn, L., Kvist, H., Stokland, A., Lindstedt, G., Bosaeus, I., Tölli, J., Sjöström, L., Isaksson, O.G., 1993.** Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76, 309–17.
- Berelowitz, M., Firestone, S.L., Frohman, L.A., 1981.** Effects of growth hormone excess and deficiency on hypothalamic somatostatin content and release and on tissue somatostatin distribution. *Endocrinology* 109, 714–9.
- Berelowitz, M., Szabo, M., Frohman, L.A., Firestone, S., Chu, L., Hintz, R.L., 1981.** Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science (New York, N.Y.)* 212, 1279–81.
- Berlet, H.H., Volk, B., 1980.** Studies of human myelin proteins during old age. *Mechanisms of ageing and development* 14, 211–22.
- Bernardis, L.L., Davis, P.J., 1996.** Aging and the hypothalamus: research perspectives. *Physiology & behavior* 59, 523–36.
- Bernton, E.W., Beach, J.E., Holaday, J.W., Smallridge, R.C., Fein, H.G., 1987.** Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science (New York, N.Y.)* 238, 519–21.
- Bevan, J.A., Brayden, J.E., Buga, G.M., Moskowitz, M.A., Said, S.I., 1984.** Vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine are responsible for neurovasodilation in the head of the

cat. Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension 2, S427–9.

Bibel, M., Hoppe, E., Barde, Y.A., 1999. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO journal* 18, 616–22.

Bimonte, H.A., Nelson, M.E., Granholm, A.-C.E., 2003. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. *Neurobiology of aging* 24, 37–48.

Binder, D.K., Scharfman, H.E., 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22, 123–31.

Bishop, N.A., Lu, T., Yankner, B.A., 2010. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* 464, 529–35.

Björk, S., Jönsson, B., Westphal, O., Levin, J.E., 1989. Quality of life of adults with growth hormone deficiency: a controlled study. *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement* 356, 55–9; discussion 60, 73–4.

Blalock, E.M., Chen, K.-C., Sharrow, K., Herman, J.P., Porter, N.M., Foster, T.C., Landfield, P.W., 2003. Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 3807–19.

Blum, R., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2002. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* 419, 687–93.

Bodles, A.M., Barger, S.W., 2004. Cytokines and the aging brain - what we don't know might help us. *Trends in neurosciences* 27, 621–6.

Boguszewski, C.L., Svensson, P.A., Jansson, T., Clark, R., Carlsson, L.M., Carlsson, B., 1998. Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 2878–85.

Bondy, C., Werner, H., Roberts, C.T., LeRoith, D., 1992. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46, 909–23.

Bondy, C.A., Werner, H., Roberts, C.T., LeRoith, D., 1990. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 4, 1386–98.

Borasio, G.D., John, J., Wittinghofer, A., Barde, Y.A., Sendtner, M., Heumann, R., 1989. ras p21 protein promotes survival and fiber outgrowth of cultured embryonic neurons. *Neuron* 2, 1087–96.

Borghi, C., Nicosia, S., Giachetti, A., Said, S.I., 1979. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulates adenylate cyclase in selected areas of rat brain. *Life sciences* 24, 65–70.

Bothwell, M., 1996. p75NTR: a receptor after all. *Science (New York, N.Y.)* 272, 506–7.

Bouchon, R., Will, B., 1983. Effects of post-weaning environment and apparatus dimension on spontaneous alternation as a function of phenotype in "dwarf" mice. *Physiology & behavior* 30, 213–9.

- Boulanger, L.M., 2009.** Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64, 93–109.
- Bovolenta, R., Zucchini, S., Paradiso, B., Rodi, D., Merigo, F., Navarro Mora, G., Osculati, F., Berto, E., Marconi, P., Marzola, A., Fabene, P.F., Simonato, M., 2010.** Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures. *Journal of neuroinflammation* 7, 81.
- Bowers, C.Y., 2001.** Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 1464–9.
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G.A., Chang, D., Hong, A., Chang, K., 1980.** Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 106, 663–7.
- Bowers, C.Y., Sartor, A.O., Reynolds, G.A., Badger, T.M., 1991.** On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology* 128, 2027–35.
- Bowles, N.L., Poon, L.W., 1985.** Aging and retrieval of words in semantic memory. *Journal of gerontology* 40, 71–7.
- Bozzola, M., De Amici, M., Zecca, M., Schimpff, R.M., Rapaport, R., 1998.** Modulating effect of human growth hormone on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 138, 640–3.
- Bozzola, M., De Benedetti, F., De Amici, M., Jouret, B., Travaglino, P., Pagani, S., Conte, F., Tauber, M., 2003.** Stimulating effect of growth hormone on cytokine release in children. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 149, 397–401.
- Braun, P.E., 1984.** Molecular organization of myelin., in: Morell P. (Ed.), *Myelin*. Plenum , New York, pp. 97–116.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., 1973.** Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science (New York, N.Y.)* 179, 77–9.
- Breese, C.R., Ingram, R.L., Sonntag, W.E., 1991.** Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. *Journal of gerontology* 46, B180–7.
- Brenneman, D.E., 1986.** Role of electrical activity and trophic factors during cholinergic development in dissociated cultures. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 64, 356–62.
- Brenneman, D.E., Neale, E.A., Foster, G.A., d' Autremont, S.W., Westbrook, G.L., 1987.** Nonneuronal cells mediate neurotrophic action of vasoactive intestinal peptide. *The Journal of cell biology* 104, 1603–10.
- Brenneman, D.E., Nicol, T., Warren, D., Bowers, L.M., 1990.** Vasoactive intestinal peptide: a neurotrophic releasing agent and an astroglial mitogen. *Journal of neuroscience research* 25, 386–94.
- Brenneman, D.E., Phillips, T.M., Festoff, B.W., Gozes, I., 1997.** Identity of neurotrophic molecules released from astroglia by vasoactive intestinal peptide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 814, 167–73.

- Brenneman, D.E., Phillips, T.M., Hauser, J., Hill, J.M., Spong, C.Y., Gozes, I., 2003.** Complex array of cytokines released by vasoactive intestinal peptide. *Neuropeptides* 37, 111–9.
- Bresson-Béopoldin, L., Dufy-Barbe, L., 1994.** GHRP-6 induces a biphasic calcium response in rat pituitary somatotrophs. *Cell calcium* 15, 247–58.
- Brightwell, J.J., Gallagher, M., Colombo, P.J., 2004.** Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. *Neurobiology of learning and memory* 81, 19–26.
- Brogi, A., Strazza, M., Melli, M., Costantino-Ceccarini, E., 1997.** Induction of intracellular ceramide by interleukin-1 beta in oligodendrocytes. *Journal of cellular biochemistry* 66, 532–41.
- Broglio, F., Benso, A., Castiglioni, C., Gottero, C., Prodam, F., Destefanis, S., Gauna, C., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., Bo, M., Arvat, E., Ghigo, E., 2003.** The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 1537–42.
- Brywe, K.G., Leverin, A.-L., Gustavsson, M., Mallard, C., Granata, R., Destefanis, S., Volante, M., Hagberg, H., Ghigo, E., Isgaard, J., 2005.** Growth hormone-releasing peptide hexarelin reduces neonatal brain injury and alters Akt/glycogen synthase kinase-3beta phosphorylation. *Endocrinology* 146, 4665–72.
- Brywe, K.G., Mallard, C., Gustavsson, M., Hedtjärn, M., Leverin, A.-L., Wang, X., Blomgren, K., Isgaard, J., Hagberg, H., 2005.** IGF-I neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta? *The European journal of neuroscience* 21, 1489–502.
- Bulgarelli, I., Tamiazzo, L., Bresciani, E., Rapetti, D., Caporali, S., Lattuada, D., Locatelli, V., Torsello, A., 2009.** Desacyl-ghrelin and synthetic GH-secretagogues modulate the production of inflammatory cytokines in mouse microglia cells stimulated by beta-amyloid fibrils. *Journal of neuroscience research* 87, 2718–27.
- Burgess, N., Maguire, E.A., O'Keefe, J., 2002.** The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35, 625–41.
- Burke, D.M., Light, L.L., 1981.** Memory and aging: the role of retrieval processes. *Psychological bulletin* 90, 513–4.
- Burke, S.N., Barnes, C.A., 2006.** Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 30–40.
- Burman, P., Broman, J.E., Hetta, J., Wiklund, I., Erfurth, E.M., Hagg, E., Karlsson, F.A., 1995.** Quality of life in adults with growth hormone (GH) deficiency: response to treatment with recombinant human GH in a placebo-controlled 21-month trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80, 3585–90.
- Burne, J.F., Staple, J.K., Raff, M.C., 1996.** Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 2064–73.
- Burton, K.A., Kabigting, E.B., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1992.** Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid distribution in the adult male rat brain and its colocalization in hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 131, 958–63.

- Butterfield, G.E., Thompson, J., Rennie, M.J., Marcus, R., Hintz, R.L., Hoffman, A.R., 1997.** Effect of rhGH and rhIGF-I treatment on protein utilization in elderly women. *The American journal of physiology* 272, E94–9.
- Caminos, J.E., Nogueiras, R., Blanco, M., Seoane, L.M., Bravo, S., Alvarez, C.V., García-Caballero, T., Casanueva, F.F., Diéguez, C., 2003.** Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 144, 5089–97.
- Campbell, G.S., Christian, L.J., Carter-Su, C., 1993.** Evidence for involvement of the growth hormone receptor-associated tyrosine kinase in actions of growth hormone. *The Journal of biological chemistry* 268, 7427–34.
- Campbell, G.S., Meyer, D.J., Raz, R., Levy, D.E., Schwartz, J., Carter-Su, C., 1995.** Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone. *The Journal of biological chemistry* 270, 3974–9.
- Campbell, G.S., Pang, L., Miyasaka, T., Saltiel, A.R., Carter-Su, C., 1992.** Stimulation by growth hormone of MAP kinase activity in 3T3-F442A fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 267, 6074–80.
- Campuzano, O., Castillo-Ruiz, M.M., Acarin, L., Castellano, B., Gonzalez, B., 2009.** Increased levels of proinflammatory cytokines in the aged rat brain attenuate injury-induced cytokine response after excitotoxic damage. *Journal of neuroscience research* 87, 2484–97.
- Carbajal, K.S., Schaumburg, C., Strieter, R., Kane, J., Lane, T.E., 2010.** Migration of engrafted neural stem cells is mediated by CXCL12 signaling through CXCR4 in a viral model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11068–73.
- Carlezon, W.A., Duman, R.S., Nestler, E.J., 2005.** The many faces of CREB. *Trends in neurosciences* 28, 436–45.
- Carlini, V.P., Gherzi, M., Schiöth, H.B., de Barioglio, S.R., 2010.** Ghrelin and memory: differential effects on acquisition and retrieval. *Peptides* 31, 1190–3.
- Carlini, V.P., Martini, A.C., Schiöth, H.B., Ruiz, R.D., Fiol de Cuneo, M., de Barioglio, S.R., 2008.** Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. *Neuroscience* 153, 929–34.
- Carlini, V.P., Monzón, M.E., Varas, M.M., Cragolini, A.B., Schiöth, H.B., Scimonelli, T.N., de Barioglio, S.R., 2002.** Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 299, 739–43.
- Carlini, V.P., Perez, M.F., Salde, E., Schiöth, H.B., Ramirez, O.A., de Barioglio, S.R., 2010.** Ghrelin induced memory facilitation implicates nitric oxide synthase activation and decrease in the threshold to promote LTP in hippocampal dentate gyrus. *Physiology & behavior* 101, 117–23.
- Carlini, V.P., Varas, M.M., Cragolini, A.B., Schiöth, H.B., Scimonelli, T.N., de Barioglio, S.R., 2004.** Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochemical and biophysical research communications* 313, 635–41.
- Carlson, H.E., Gillin, J.C., Gorden, P., Snyder, F., 1972.** Absence of sleep-related growth hormone peaks in aged normal subjects and in acromegaly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 34, 1102–5.

- Carlson, N.G., Wieggl, W.A., Chen, J., Bacchi, A., Rogers, S.W., Gahring, L.C., 1999.** Inflammatory cytokines IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha impart neuroprotection to an excitotoxin through distinct pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 163, 3963–8.
- Carlton, P., 1969.** Brain-acetylcholine and inhibition., in: Tapp, J. (Ed.), *Reinforcement and Behavior*. Academic Press, New York, pp. 286–327.
- Carnegie, P.R., Dowse, C.A., 1984.** Partial characterization of 21.5K myelin basic protein from sheep brain. *Science (New York, N.Y.)* 223, 936–8.
- Carpentier, P.A., Palmer, T.D., 2009.** Immune influence on adult neural stem cell regulation and function. *Neuron* 64, 79–92.
- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2000.** Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 2926–33.
- 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. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 5678–84.
- Carro, E., Trejo, J.L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., Torres-Aleman, I., 2002.** Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nature medicine* 8, 1390–7.
- Carroll, W.M., Jennings, A.R., 1994.** Early recruitment of oligodendrocyte precursors in CNS demyelination. *Brain: a journal of neurology* 117, Pt 3, 563–78.
- Carson, J.H., Nielson, M.L., Barbarese, E., 1983.** Developmental regulation of myelin basic protein expression in mouse brain. *Developmental biology* 96, 485–92.
- 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* 10, 729–40.
- Carter-Su, C., King, A.P., Argetsinger, L.S., Smit, L.S., Vanderkuur, J., Campbell, G.S., 1996.** Signalling pathway of GH. *Endocrine journal* 43 Suppl, S65–70.
- Carter-Su, C., Smit, L.S., 1998.** Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. *Recent progress in hormone research* 53, 61–82; discussion 82–3.
- Carvajal, P., Carlini, V.P., Schiöth, H.B., de Barioglio, S.R., Salvatierra, N.A., 2009.** Central ghrelin increases anxiety in the Open Field test and impairs retention memory in a passive avoidance task in neonatal chicks. *Neurobiology of learning and memory* 91, 402–7.
- Cassoni, P., Papotti, M., Ghè, C., Catapano, F., Sapino, A., Graziani, A., Deghenghi, R., Reissmann, T., Ghigo, E., Muccioli, G., 2001.** Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 1738–45.
- Castaño, J.P., Torronteras, R., Ramirez, J.L., Gribouval, A., Sanchez-Hormigo, A., Ruiz-Navarro, A., Gracia-Navarro, F., 1996.** Somatostatin increases growth hormone (GH) secretion in a subpopulation of porcine somatotropes: evidence for functional and morphological heterogeneity among porcine GH-producing cells. *Endocrinology* 137, 129–36.

- Castle, S.C., 2000.** Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31, 578–85.
- Castren, E., Thoenen, H., Lindholm, D., 1995.** Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience* 64, 71–80.
- Castro, J.R., Costoya, J.A., Gallego, R., Prieto, A., Arce, V.M., Señarís, R., 2000.** Expression of growth hormone receptor in the human brain. *Neuroscience letters* 281, 147–50.
- Castrén, E., Rantamäki, T., 2008.** Neurotrophins in depression and antidepressant effects. *Novartis Foundation symposium* 289, 43–52; discussion 53–9, 87–93.
- Cattaneo, L., Luoni, M., Settembrini, B., Müller, E.E., Cocchi, D., 1997.** Effect of long-term administration of Hexarelin on the somatotrophic axis in aged rats. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 36, 49–54.
- Cella, S.G., Cerri, C.G., Daniel, S., Sibilia, V., Rigamonti, A., Cattaneo, L., Deghenghi, R., Müller, E.E., 1996.** Sixteen weeks of hexarelin therapy in aged dogs: effects on the somatotrophic axis, muscle morphology, and bone metabolism. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 51, B439–47.
- Cellerino, A., Arango-González, B., Pinzón-Duarte, G., Kohler, K., 2003.** Brain-derived neurotrophic factor regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide in retinal amacrine cells. *The Journal of comparative neurology* 467, 97–104.
- Cellerino, A., Carroll, P., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1997.** Reduced size of retinal ganglion cell axons and hypomyelination in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Molecular and cellular neurosciences* 9, 397–408.
- Cha, C.I., Lee, E.Y., Lee, Y.I., Baik, S.H., 1995.** Age related change in the vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. *Neuroscience letters* 197, 45–8.
- Cha, C.I., Lee, Y.I., Lee, E.Y., Park, K.H., Baik, S.H., 1997.** Age-related changes of VIP, NPY and somatostatin-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of aged rats. *Brain research* 753, 235–44.
- Chan, J.R., Cosgaya, J.M., Wu, Y.J., Shooter, E.M., 2001.** Neurotrophins are key mediators of the myelination program in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 14661–8.
- Chang, L., Du, J.-B., Gao, L.-R., Pang, Y.-Z., Tang, C.-S., 2003.** Effect of ghrelin on septic shock in rats. *Acta pharmacologica Sinica* 24, 45–9.
- Chang, L., Karin, M., 2001.** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.
- Chang, L., Ren, Y., Liu, X., Li, W.G., Yang, J., Geng, B., Weintraub, N.L., Tang, C., 2004.** Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *Journal of cardiovascular pharmacology* 43, 165–70.
- Chao, M.V., Bothwell, M., 2002.** Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33, 9–12.
- Chapman, I.M., Bach, M.A., Van Cauter, E., Farmer, M., Krupa, D., Taylor, A.M., Schilling, L.M., Cole, K.Y., Skiles, E.H., Pezzoli, S.S., Hartman, M.L., Veldhuis, J.D., Gormley, G.J.,**

- Thorner, M.O., 1996.** Stimulation of the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis by daily oral administration of a GH secretagogue (MK-677) in healthy elderly subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 4249–57.
- Chapman, I.M., Hartman, M.L., Pezzoli, S.S., Thorner, M.O., 1996.** Enhancement of pulsatile growth hormone secretion by continuous infusion of a growth hormone-releasing peptide mimetic, L-692,429, in older adults--a clinical research center study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 2874–80.
- Chaudhury, D., Loh, D.H., Dragich, J.M., Hagopian, A., Colwell, C.S., 2008.** Select cognitive deficits in vasoactive intestinal peptide deficient mice. *BMC neuroscience* 9, 63.
- Chee, C.A., Roozendaal, B., Swaab, D.F., Goudsmit, E., Mirmiran, M., 1988.** Vasoactive intestinal polypeptide neuron changes in the senile rat suprachiasmatic nucleus. *Neurobiology of aging* 9, 307–12.
- Chen, C., 2000.** Growth hormone secretagogue actions on the pituitary gland: multiple receptors for multiple ligands? *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27, 323–9.
- Chen, J., Buchanan, J.B., Sparkman, N.L., Godbout, J.P., Freund, G.G., Johnson, R.W., 2008.** Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain, behavior, and immunity* 22, 301–11.
- Chen, L., Lund, P.K., Burgess, S.B., Rudisch, B.E., McIlwain, D.L., 1997.** Growth hormone, insulin-like growth factor I, and motoneuron size. *Journal of neurobiology* 32, 202–12.
- Chen, R.H., Abate, C., Blenis, J., 1993.** Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10952–6.
- Chen, R.H., Juo, P.C., Curran, T., Blenis, J., 1996.** Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12, 1493–502.
- Chen, R.H., Sarnecki, C., Blenis, J., 1992.** Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and cellular biology* 12, 915–27.
- Chen, Z.-Y., Jing, D., Bath, K.G., Ieraci, A., Khan, T., Siao, C.-J., Herrera, D.G., Toth, M., Yang, C., McEwen, B.S., Hempstead, B.L., Lee, F.S., 2006.** Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science (New York, N.Y.)* 314, 140–3.
- Cheng, K., Chan, W.W., Barreto, A., Convey, E.M., Smith, R.G., 1989.** The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂ on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture. *Endocrinology* 124, 2791–8.
- Cheng, K., Chan, W.W., Butler, B., Barreto, A., Smith, R.G., 1991.** Evidence for a role of protein kinase-C in His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂-induced growth hormone release from rat primary pituitary cells. *Endocrinology* 129, 3337–42.
- Cheyuo, C., Wu, R., Zhou, M., Jacob, A., Coppa, G., Wang, P., 2011.** Ghrelin suppresses inflammation and neuronal nitric oxide synthase in focal cerebral ischemia via the vagus nerve. *Shock (Augusta, Ga.)* 35, 258–65.
- Cho, H.J., Kim, J.K., Zhou, X.F., Rush, R.A., 1997.** Increased brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Brain research* 764, 269–72.

- Cho, H.J., Kim, S.Y., Park, M.J., Kim, D.S., Kim, J.K., Chu, M.Y., 1997.** Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain research* 749, 358–62.
- Chorny, A., Anderson, P., Gonzalez-Rey, E., Delgado, M., 2008.** Ghrelin protects against experimental sepsis by inhibiting high-mobility group box 1 release and by killing bacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, 8369–77.
- Christmas, C., O'Connor, K.G., Harman, S.M., Tobin, J.D., Münzer, T., Bellantoni, M.F., Clair, C.S., Pabst, K.M., Sorkin, J.D., Blackman, M.R., 2002.** Growth hormone and sex steroid effects on bone metabolism and bone mineral density in healthy aged women and men. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 57, M12–8.
- Christophidis, L.J., Gorba, T., Gustavsson, M., Williams, C.E., Werther, G.A., Russo, V.C., Scheepens, A., 2009.** Growth hormone receptor immunoreactivity is increased in the subventricular zone of juvenile rat brain after focal ischemia: a potential role for growth hormone in injury-induced neurogenesis. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 19, 497–506.
- Chung, H., Kim, E., Lee, D.H., Seo, S., Ju, S., Lee, D., Kim, H., Park, S., 2007.** Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. *Endocrinology* 148, 148–59.
- Chung, H., Seo, S., Moon, M., Park, S., 2008.** Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 beta and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells. *The Journal of endocrinology* 198, 511–21.
- Chung, Y.H., Shin, C.M., Joo, K.M., Kim, M.J., Cha, C.I., 2002.** Region-specific alterations in insulin-like growth factor receptor type I in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats. *Brain research* 946, 307–13.
- Clemmons, D.R., 2006.** Clinical utility of measurements of insulin-like growth factor 1. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism* 2, 436–46.
- Clemmons, D.R., Van Wyk, J.J., 1984.** Factors controlling blood concentration of somatomedin C. *Clinics in endocrinology and metabolism* 13, 113–43.
- Coculescu, M., 1999.** Blood-brain barrier for human growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 12, 113–24.
- Cohen, R.I., Marmur, R., Norton, W.T., Mehler, M.F., Kessler, J.A., 1996.** Nerve growth factor and neurotrophin-3 differentially regulate the proliferation and survival of developing rat brain oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 6433–42.
- Cohen, S., Greenberg, M.E., 2008.** Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 24, 183–209.
- Conner, J.M., Yan, Q., Varon, S., 1996.** Distribution of brain-derived neurotrophic factor in the rat pituitary gland. *Neuroreport* 7, 1937–40.
- Connor, B., Beilharz, E.J., Williams, C., Synek, B., Gluckman, P.D., Faull, R.L., Dragunow, M., 1997.** Insulin-like growth factor-I (IGF-I) immunoreactivity in the Alzheimer's disease temporal cortex and hippocampus. *Brain research. Molecular brain research* 49, 283–90.

- Connor, B., Dragunow, M., 1998.** The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain research. Brain research reviews* 27, 1–39.
- Conti, G., Scarpini, E., Baron, P., Livraghi, S., Tiriticco, M., Bianchi, R., Vedeler, C., Scarlato, G., 2002.** Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-1beta and p75NTR. *Journal of the neurological sciences* 195, 35–40.
- Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., McWade, F.J., Florini, J.R., 1997.** The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 272, 6653–62.
- Copinschi, G., Van Onderbergen, A., L’Hermite-Balériaux, M., Mendel, C.M., Caufriez, A., Leproult, R., Bolognese, J.A., De Smet, M., Thorner, M.O., Van Cauter, E., 1996.** Effects of a 7-day treatment with a novel, orally active, growth hormone (GH) secretagogue, MK-677, on 24-hour GH profiles, insulin-like growth factor I, and adrenocortical function in normal young men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 2776–82.
- Corpas, E., Harman, S.M., Blackman, M.R., 1993.** Human growth hormone and human aging. *Endocrine reviews* 14, 20–39.
- Corpas, E., Harman, S.M., Piñeyro, M.A., Roberson, R., Blackman, M.R., 1992.** Growth hormone (GH)-releasing hormone-(1-29) twice daily reverses the decreased GH and insulin-like growth factor-I levels in old men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 75, 530–5.
- Cosgaya, J.M., Chan, J.R., Shooter, E.M., 2002.** The neurotrophin receptor p75NTR as a positive modulator of myelination. *Science (New York, N.Y.)* 298, 1245–8.
- Costoya, J.A., Finidori, J., Moutoussamy, S., Seáris, R., Devesa, J., Arce, V.M., 1999.** Activation of growth hormone receptor delivers an antiapoptotic signal: evidence for a role of Akt in this pathway. *Endocrinology* 140, 5937–43.
- Cottrell, G.A., Veldhuis, H.D., Rostene, W.H., de Kloet, E.R., 1984.** Behavioral actions of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Neuropeptides* 4, 331–41.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., Horvath, T.L., 2003.** The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649–61.
- Crew, M.D., Spindler, S.R., Walford, R.L., Koizumi, A., 1987.** Age-related decrease of growth hormone and prolactin gene expression in the mouse pituitary. *Endocrinology* 121, 1251–5.
- Crews, C.M., Erikson, R.L., 1993.** Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. *Cell* 74, 215–7.
- Croll, S.D., Chesnutt, C.R., Greene, N.A., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1999.** Peptide immunoreactivity in aged rat cortex and hippocampus as a function of memory and BDNF infusion. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 64, 625–35.
- Croll, S.D., Ip, N.Y., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1998.** Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain research* 812, 200–8.

- Cuellar, J.N., Isokawa, M., 2011.** Ghrelin-induced activation of cAMP signal transduction and its negative regulation by endocannabinoids in the hippocampus. *Neuropharmacology* 60, 842–51.
- Cui, T.X., Kwok, R., Schwartz, J., 2008.** Cooperative regulation of endogenous cAMP-response element binding protein and CCAAT/enhancer-binding protein beta in GH-stimulated c-fos expression. *The Journal of endocrinology* 196, 89–100.
- Cummings, D.E., Merriam, G.R., 1999.** Age-related changes in growth hormone secretion: should the somatopause be treated? *Seminars in reproductive endocrinology* 17, 311–25.
- Cummings, D.E., Merriam, G.R., 2003.** Growth hormone therapy in adults. *Annual review of medicine* 54, 513–33.
- Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Ma, M.K., Dellinger, E.P., Purnell, J.Q., 2002.** Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *The New England journal of medicine* 346, 1623–30.
- Cuneo, R.C., Salomon, F., McGauley, G.A., Sönksen, P.H., 1992.** The growth hormone deficiency syndrome in adults. *Clinical endocrinology* 37, 387–97.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M., 2000.** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 4255–61.
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999.** Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & development* 13, 2905–27.
- Daughaday, W.H., 1989.** A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. *Perspectives in biology and medicine* 32, 194–211.
- Daughaday, W.H., Rotwein, P., 1989.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine reviews* 10, 68–91.
- Davis, A.A., Temple, S., 1994.** A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* 372, 263–6.
- de Castro, F., Bribián, A., 2005.** The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain research. Brain research reviews* 49, 227–41.
- de Mello-Coelho, V., Gagnerault, M.C., Souberbielle, J.C., Strasburger, C.J., Savino, W., Dardenne, M., Postel-Vinay, M.C., 1998.** Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* 139, 3837–42.
- de Vos, A.M., Ultsch, M., Kossiakoff, A.A., 1992.** Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science (New York, N.Y.)* 255, 306–12.
- de Zegher, F., Devlieger, H., Veldhuis, J.D., 1993.** Properties of growth hormone and prolactin hypersecretion by the human infant on the day of birth. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76, 1177–81.
- degli Uberti, E.C., Ambrosio, M.R., Cella, S.G., Margutti, A.R., Trasforini, G., Rigamonti, A.E., Petrone, E., Müller, E.E., 1997.** Defective hypothalamic growth hormone (GH)-releasing

hormone activity may contribute to declining GH secretion with age in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 2885–8.

De Benedetti, F., Alonzi, T., Moretta, A., Lazzaro, D., Costa, P., Poli, V., Martini, A., Ciliberto, G., Fattori, E., 1997. Interleukin 6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. A model for stunted growth in children with chronic inflammation. *The Journal of clinical investigation* 99, 643–50.

De Keyser, J., Wilczak, N., Goossens, A., 1994. Insulin-like growth factor-I receptor densities in human frontal cortex and white matter during aging, in Alzheimer's disease, and in Huntington's disease. *Neuroscience letters* 172, 93–6.

DeGennaro Colonna, V., Zoli, M., Cocchi, D., Maggi, A., Marrama, P., Agnati, L.F., Müller, E.E., 1989. Reduced growth hormone releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10, 705–8.

Deijen, J.B., de Boer, H., Blok, G.J., van der Veen, E.A., 1996. Cognitive impairments and mood disturbances in growth hormone deficient men. *Psychoneuroendocrinology* 21, 313–22.

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.

Dejda, A., Sokołowska, P., Nowak, J.Z., 2005. Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI. *Pharmacological reports : PR* 57, 307–20.

Delgado, M., Ganea, D., 2001a. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167, 966–75.

Delgado, M., Ganea, D., 2001b. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Archives of physiology and biochemistry* 109, 377–82.

Delgado, M., Ganea, D., 2003. Vasoactive intestinal peptide prevents activated microglia-induced neurodegeneration under inflammatory conditions: potential therapeutic role in brain trauma. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 1922–4.

Delgado, M., Jonakait, G.M., Ganea, D., 2002. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 39, 148–61.

Delgado, M., Leceta, J., Ganea, D., 2003. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. *Journal of leukocyte biology* 73, 155–64.

Delgado, M., Martinez, C., Pozo, D., Calvo, J.R., Leceta, J., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1999. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162, 1200–5.

Delgado, M., Pozo, D., Ganea, D., 2004. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacological reviews* 56, 249–90.

Delgado-Rubín, A., Chowen, J.A., Argente, J., Frago, L.M., 2009. Growth hormone-releasing peptide 6 protection of hypothalamic neurons from glutamate excitotoxicity is caspase

independent and not mediated by insulin-like growth factor I. *The European journal of neuroscience* 29, 2115–24.

Delgado-Rubín de Célix, A., Chowen, J.A., Argente, J., Frago, L.M., 2006. Growth hormone releasing peptide-6 acts as a survival factor in glutamate-induced excitotoxicity. *Journal of neurochemistry* 99, 839–49.

Dember, W.N., Earl, R.W., 1957. Analysis of exploratory, manipulatory, and curiosity behaviors. *Psychological review* 64, 91–6.

Deslauriers, N., Gaudreau, P., Abribat, T., Renier, G., Petitclerc, D., Brazeau, P., 1991. Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53, 439–46.

Deverman, B.E., Patterson, P.H., 2009. Cytokines and CNS development. *Neuron* 64, 61–78.

Devesa, P., Reimunde, P., Gallego, R., Devesa, J., Arce, V.M., 2011. Growth hormone (GH) treatment may cooperate with locally-produced GH in increasing the proliferative response of hippocampal progenitors to kainate-induced injury. *Brain injury : [BI]* 25, 503–10.

Di Bello, I.C., Dawson, M.R., Levine, J.M., Reynolds, R., 1999. Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation. *Journal of neurocytology* 28, 365–81.

Diamond, M.C., 1968. The effects of early hypophysectomy and hormone therapy on brain development. *Brain research* 7, 407–18.

Diano, S., Farr, S.A., Benoit, S.C., McNay, E.C., da Silva, I., Horvath, B., Gaskin, F.S., Nonaka, N., Jaeger, L.B., Banks, W.A., Morley, J.E., Pinto, S., Sherwin, R.S., Xu, L., Yamada, K.A., Sleeman, M.W., Tschöp, M.H., Horvath, T.L., 2006. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nature neuroscience* 9, 381–8.

Dickerman E., Dickerman S., Meites J., 1972. Influences of age, sex and estrous cycle on pituitary and plasma GH levels in rats., in: Pecile A., M.E. (Ed.), *Growth and Growth Hormone*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 252–260.

Dickson, L., Finlayson, K., 2009. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacology & therapeutics* 121, 294–316.

Diem, R., Hobom, M., Grötsch, P., Kramer, B., Bähr, M., 2003. Interleukin-1 beta protects neurons via the interleukin-1 (IL-1) receptor-mediated Akt pathway and by IL-1 receptor-independent decrease of transmembrane currents in vivo. *Molecular and cellular neurosciences* 22, 487–500.

Dik, M.G., Pluijm, S.M.F., Jonker, C., Deeg, D.J.H., Lomecky, M.Z., Lips, P., 2003. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and cognitive decline in older persons. *Neurobiology of aging* 24, 573–81.

Dinarello, C.A., Cannon, J.G., Wolff, S.M., Bernheim, H.A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I.S., Palladino, M.A., O'Connor, J.V., 1986. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* 163, 1433–50.

Dixit, V.D., Schaffer, E.M., Pyle, R.S., Collins, G.D., Sakthivel, S.K., Palaniappan, R., Lillard, J.W., Taub, D.D., 2004. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory

cytokine expression by human monocytes and T cells. *The Journal of clinical investigation* 114, 57–66.

Dixit, V.D., Yang, H., Cooper-Jenkins, A., Giri, B.B., Patel, K., Taub, D.D., 2009. Reduction of T cell-derived ghrelin enhances proinflammatory cytokine expression: implications for age-associated increases in inflammation. *Blood* 113, 5202–5.

Djalali, S., Höltje, M., Grosse, G., Rothe, T., Stroh, T., Grosse, J., Deng, D.R., Hellweg, R., Grantyn, R., Hörtnagl, H., Ahnert-Hilger, G., 2005. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *Journal of neurochemistry* 92, 616–27.

Donahue, C.P., Kosik, K.S., Shors, T.J., 2006. Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6031–6.

Drake, C.T., Milner, T.A., Patterson, S.L., 1999. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 8009–26.

Dresler, M., Kluge, M., Genzel, L., Schüssler, P., Steiger, A., 2010. Nocturnal administration of ghrelin does not promote memory consolidation. *Pharmacopsychiatry* 43, 277–8.

Du, Y., Fischer, T.Z., Clinton-Luke, P., Lercher, L.D., Dreyfus, C.F., 2006. Distinct effects of p75 in mediating actions of neurotrophins on basal forebrain oligodendrocytes. *Molecular and cellular neurosciences* 31, 366–75.

Du, Y., Fischer, T.Z., Lee, L.N., Lercher, L.D., Dreyfus, C.F., 2003. Regionally specific effects of BDNF on oligodendrocytes. *Developmental neuroscience* 25, 116–26.

Du, Y., Lercher, L.D., Zhou, R., Dreyfus, C.F., 2006. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates effects of brain-derived neurotrophic factor on differentiation of basal forebrain oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research* 84, 1692–702.

Dubois-Dalcq, M., 1987. Characterization of a slowly proliferative cell along the oligodendrocyte differentiation pathway. *The EMBO journal* 6, 2587–95.

Dugich-Djordjevic, M.M., Peterson, C., Isono, F., Ohsawa, F., Widmer, H.R., Denton, T.L., Bennett, G.L., Hefti, F., 1995. Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *The European journal of neuroscience* 7, 1831–9.

Duncan, M.J., Herron, J.M., Hill, S.A., 2001. Aging selectively suppresses vasoactive intestinal peptide messenger RNA expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain research. Molecular brain research* 87, 196–203.

Dustman, R.E., Emmerson, R.Y., Shearer, D.E., 1996. Life span changes in electrophysiological measures of inhibition. *Brain and cognition* 30, 109–26.

Dziembowska, M., Tham, T.N., Lau, P., Vitry, S., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., 2005. A role for CXCR4 signaling in survival and migration of neural and oligodendrocyte precursors. *Glia* 50, 258–69.

D'Costa, A.P., Lenham, J.E., Ingram, R.L., Sonntag, W.E., 1993. Moderate caloric restriction increases type 1 IGF receptors and protein synthesis in aging rats. *Mechanisms of ageing and development* 71, 59–71.

- D'Ercole, A.J., Hill, D.J., Strain, A.J., Underwood, L.E., 1986.** Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentrations in the human fetus during the first half of gestation. *Pediatric research* 20, 253–5.
- D'Ercole, A.J., Stiles, A.D., Underwood, L.E., 1984.** Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 935–9.
- Ebadi, M., Bashir, R.M., Heidrick, M.L., Hamada, F.M., Refaey, H.E., Hamed, A., Helal, G., Baxi, M.D., Cerutis, D.R., Lassi, N.K., 1997.** Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochemistry international* 30, 347–74.
- Edvinsson, L., Minthon, L., Ekman, R., Gustafson, L., 1993.** Neuropeptides in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and dementia with frontotemporal lobe degeneration. *Dementia (Basel, Switzerland)* 4, 167–71.
- Edén, S., 1979.** Age- and sex-related differences in episodic growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 105, 555–60.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R., 2003.** The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257–69.
- Egan, M.F., Weinberger, D.R., Lu, B., 2003.** Schizophrenia, III: brain-derived neurotrophic factor and genetic risk. *The American journal of psychiatry* 160, 1242.
- Eisenbarth, G.S., Walsh, F.S., Nirenberg, M., 1979.** Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4913–7.
- Elsasser, T.H., Caperna, T.J., Fayer, R., 1991.** Tumor necrosis factor-alpha affects growth hormone secretion by a direct pituitary interaction. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 198, 547–54.
- Englander, E.W., Gomez, G.A., Greeley, G.H., 2004.** Alterations in stomach ghrelin production and in ghrelin-induced growth hormone secretion in the aged rat. *Mechanisms of ageing and development* 125, 871–5.
- Erickson, C.A., Barnes, C.A., 2003.** The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental gerontology* 38, 61–9.
- Ershler, W.B., Keller, E.T., 2000.** Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual review of medicine* 51, 245–70.
- Ershler, W.B., Sun, W.H., Binkley, N., Gravenstein, S., Volk, M.J., Kamoske, G., Klopp, R.G., Roecker, E.B., Daynes, R.A., Weindruch, R., 1993.** Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine and cytokine research* 12, 225–30.
- Erşahin, M., Toklu, H.Z., Erzik, C., Cetinel, S., Akakin, D., Veliöğlu-Oğünç, A., Tetik, S., Ozdemir, Z.N., Sener, G., Yeğen, B.C., 2010.** The anti-inflammatory and neuroprotective effects of ghrelin in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Journal of neurotrauma* 27, 1143–55.

- Erşahin, M., Toklu, H.Z., Erzik, C., Akakin, D., Tetik, S., Sener, G., Yeğen, B.C., 2011.** Ghrelin alleviates spinal cord injury in rats via its anti-inflammatory effects. *Turkish neurosurgery* 21, 599–605.
- Fagin, J.A., Pixley, S., Slanina, S., Ong, J., Melmed, S., 1987.** Insulin-like growth factor I gene expression in GH3 rat pituitary cells: messenger ribonucleic acid content, immunocytochemistry, and secretion. *Endocrinology* 120, 2037–43.
- Falluel-Morel, A., Aubert, N., Vaudry, D., Desfeux, A., Allais, A., Burel, D., Basille, M., Vaudry, H., Laudénbach, V., Gonzalez, B.J., 2008.** Interactions of PACAP and ceramides in the control of granule cell apoptosis during cerebellar development. *Journal of molecular neuroscience* : MN 36, 8–15.
- Fan, J., Char, D., Bagby, G.J., Gelato, M.C., Lang, C.H., 1995.** Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor necrosis factor. *The American journal of physiology* 269, R1204–12.
- Fan, J., Wojnar, M.M., Theodorakis, M., Lang, C.H., 1996.** Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA and peptide and IGF-binding proteins by interleukin-1. *The American journal of physiology* 270, R621–9.
- Feldman, M.L., Peters, A., 1998.** Ballooning of myelin sheaths in normally aged macaques. *Journal of neurocytology* 27, 605–14.
- Felts, P.A., Baker, T.A., Smith, K.J., 1997.** Conduction in segmentally demyelinated mammalian central axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 7267–77.
- Fernandez, A.M., Gonzalez de la Vega, A.G., Planas, B., Torres-Aleman, I., 1999.** Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivo-cerebellar pathway. *The European journal of neuroscience* 11, 2019–30.
- Fernandez, A.M., de la Vega, A.G., Torres-Aleman, I., 1998.** Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 1253–8.
- Fernandez-Martin, A., Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Martin, J., Pozo, D., Ganea, D., Delgado, M., 2006.** VIP prevents experimental multiple sclerosis by downregulating both inflammatory and autoimmune components of the disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1070, 276–81.
- Fernholm, R., Bramnert, M., Hägg, E., Hilding, A., Baylink, D.J., Mohan, S., Thorén, M., 2000.** Growth hormone replacement therapy improves body composition and increases bone metabolism in elderly patients with pituitary disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 4104–12.
- Fernández, M., Sánchez-Franco, F., Palacios, N., Sánchez, I., Cacicedo, L., 2005.** IGF-I and vasoactive intestinal peptide (VIP) regulate cAMP-response element-binding protein (CREB)-dependent transcription via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in pituitary cells: requirement of Rap1. *Journal of molecular endocrinology* 34, 699–712.
- Fernández, M., Sánchez-Franco, F., Palacios, N., Sánchez, I., Villuendas, G., Cacicedo, L., 2003.** Involvement of vasoactive intestinal peptide on insulin-like growth factor I-induced proliferation of rat pituitary lactotropes in primary culture: evidence for an autocrine and/or paracrine regulatory system. *Neuroendocrinology* 77, 341–52.

- Festoff, B.W., Nelson, P.G., Brenneman, D.E., 1996.** Prevention of activity-dependent neuronal death: vasoactive intestinal polypeptide stimulates astrocytes to secrete the thrombin-inhibiting neurotrophic serpin, protease nexin I. *Journal of neurobiology* 30, 255–66.
- Finch, C.E., 2002.** Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossijskaja akademija nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo* 10, 35–9.
- Finkelstein, J.W., Roffwarg, H.P., Boyar, R.M., Kream, J., Hellman, L., 1972.** Age-related change in the twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 35, 665–70.
- Flood, J.F., Garland, J.S., Morley, J.E., 1990.** Vasoactive intestinal peptide (VIP): an amnesic neuropeptide. *Peptides* 11, 933–8.
- Florini, J.R., Harned, J.A., Richman, R.A., Weiss, J.P., 1981.** Effect of rat age on serum levels of growth hormone and somatomedins. *Mechanisms of ageing and development* 15, 165–76.
- Florini, J.R., Roberts, S.B., 1980.** Effect of rat age on blood levels of somatomedin-like growth factors. *Journal of gerontology* 35, 23–30.
- Florio, T., Casagrande, S., Diana, F., Bajetto, A., Porcile, C., Zona, G., Thellung, S., Arena, S., Pattarozzi, A., Corsaro, A., Spaziante, R., Robello, M., Schettini, G., 2006.** Chemokine stromal cell-derived factor 1alpha induces proliferation and growth hormone release in GH4C1 rat pituitary adenoma cell line through multiple intracellular signals. *Molecular pharmacology* 69, 539–46.
- Forman, L.J., Sonntag, W.E., Hylka, V.W., Meites, J., 1985.** Pituitary growth hormone and hypothalamic somatostatin in young female rats versus old constant estrous female rats. *Experientia* 41, 653–4.
- Foster, E., Robertson, B., Fried, K., 1994.** trkB-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia following sciatic nerve injury. *Brain research* 659, 267–71.
- Foster, T.C., 1999.** Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain research. Brain research reviews* 30, 236–49.
- Foster, T.C., Sharrow, K.M., Masse, J.R., Norris, C.M., Kumar, A., 2001.** Calcineurin links Ca²⁺ dysregulation with brain aging. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 4066–73.
- Frago, L.M., Pañeda, C., Argente, J., Chowen, J.A., 2005.** Growth hormone-releasing peptide-6 increases insulin-like growth factor-I mRNA levels and activates Akt in RCA-6 cells as a model of neuropeptide Y neurones. *Journal of neuroendocrinology* 17, 701–10.
- Frago, L.M., Pañeda, 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, 4113–22.
- Frank, M.G., Barrientos, R.M., Biedenkapp, J.C., Rudy, J.W., Watkins, L.R., Maier, S.F., 2006.** mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiology of aging* 27, 717–22.

- Franklin, R.J., Gilson, J.M., Blakemore, W.F., 1997.** Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system. *Journal of neuroscience research* 50, 337–44.
- Franklin, R.J., Hinks, G.L., 1999.** Understanding CNS remyelination: clues from developmental and regeneration biology. *Journal of neuroscience research* 58, 207–13.
- Fraser, R.A., Attardo, D., Harvey, S., 1990.** Growth hormone receptors in hypothalamic and extra-hypothalamic tissues. *Journal of molecular endocrinology* 5, 231–8.
- Freedman, M.S., D'Souza, S., Antel, J.P., 1997.** gamma delta T-cell-human glial cell interactions. I. In vitro induction of gammadelta T-cell expansion by human glial cells. *Journal of neuroimmunology* 74, 135–42.
- Frei, K., Malipiero, U.V., Leist, T.P., Zinkernagel, R.M., Schwab, M.E., Fontana, A., 1989.** On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *European journal of immunology* 19, 689–94.
- Friedlander, A.L., Butterfield, G.E., Moynihan, S., Grillo, J., Pollack, M., Holloway, L., Friedman, L., Yesavage, J., Matthias, D., Lee, S., Marcus, R., Hoffman, A.R., 2001.** One year of insulin-like growth factor I treatment does not affect bone density, body composition, or psychological measures in postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 1496–503.
- Frohman, L.A., Downs, T.R., Chomczynski, P., 1992.** Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in neuroendocrinology* 13, 344–405.
- Frutos, M.G.-S., Cacicedo, L., Fernández, C., Vicent, D., Velasco, B., Zapatero, H., Sánchez-Franco, F., 2007.** Insights into a role of GH secretagogues in reversing the age-related decline in the GH/IGF-I axis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293, E1140–52.
- Frutos, M.G.S., Cacicedo, L., Méndez, C.F., Vicent, D., González, M., Sánchez-Franco, F., 2007.** Pituitary alterations involved in the decline of growth hormone gene expression in the pituitary of aging rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 62, 585–97.
- Fryer, R.H., Kaplan, D.R., Feinstein, S.C., Radeke, M.J., Grayson, D.R., Kromer, L.F., 1996.** Developmental and mature expression of full-length and truncated TrkB receptors in the rat forebrain. *The Journal of comparative neurology* 374, 21–40.
- Fujikawa, T., Soya, H., Fukuoka, H., Alam, K.S., Yoshizato, H., McEwen, B.S., Nakashima, K., 2000.** A biphasic regulation of receptor mRNA expressions for growth hormone, glucocorticoid and mineralocorticoid in the rat dentate gyrus during acute stress. *Brain research* 874, 186–93.
- Fulop, T., Larbi, A., Douziech, N., Levesque, I., Varin, A., Herbein, G., 2006.** Cytokine receptor signalling and aging. *Mechanisms of ageing and development* 127, 526–37.
- Funakoshi, H., Frisén, J., Barbany, G., Timmusk, T., Zachrisson, O., Verge, V.M., Persson, H., 1993.** Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *The Journal of cell biology* 123, 455–65.
- Gage, F.H., 2000.** Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 287, 1433–8.

- Gai, W.P., Zhou, X.F., Rush, R.A., 1996.** Analysis of low affinity neurotrophin receptor (p75) expression in glia of the CNS-PNS transition zone following dorsal root transection. *Neuropathology and applied neurobiology* 22, 434–9.
- 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. *Experimental gerontology* 38, 71–7.
- Gandelman, K.Y., Pfeiffer, S.E., Carson, J.H., 1989.** Cyclic AMP regulation of P0 glycoprotein and myelin basic protein gene expression in semi-differentiated peripheral neurinoma cell line D6P2T. *Development (Cambridge, England)* 106, 389–98.
- Ganea, D., Delgado, M., 2002.** Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 13, 229–37.
- Gao, Y., Deng, K., Hou, J., Bryson, J.B., Barco, A., Nikulina, E., Spencer, T., Mellado, W., Kandel, E.R., Filbin, M.T., 2004.** Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration in vivo. *Neuron* 44, 609–21.
- Garcia-Segura, L.M., Cardona-Gómez, G.P., Chowen, J.A., Azcoitia, I., 1991.** Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *Journal of neurocytology* 29, 425–37.
- García, A., Alvarez, C.V., Smith, R.G., Diéguez, C., 2001.** Regulation of Pit-1 expression by ghrelin and GHRP-6 through the GH secretagogue receptor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15, 1484–95.
- García-Aragón, J., Lobie, P.E., Muscat, G.E., Gobius, K.S., Norstedt, G., Waters, M.J., 1992.** Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development? *Development (Cambridge, England)* 114, 869–76.
- Garofalo, R.S., Rosen, O.M., 1989.** Insulin and insulinlike growth factor 1 (IGF-1) receptors during central nervous system development: expression of two immunologically distinct IGF-1 receptor beta subunits. *Molecular and cellular biology* 9, 2806–17.
- Gatford, K.L., Egan, A.R., Clarke, I.J., Owens, P.C., 1998.** Sexual dimorphism of the somatotrophic axis. *The Journal of endocrinology* 157, 373–89.
- Gaytan, F., Barreiro, M.L., Chopin, L.K., Herington, A.C., Morales, C., Pinilla, L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Diéguez, C., Tena-Sempere, M., 2003.** Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 879–87.
- Ge, F., Tsagarakis, S., Rees, L.H., Besser, G.M., Grossman, A., 1989.** Relationship between growth hormone-releasing hormone and somatostatin in the rat: effects of age and sex on content and in-vitro release from hypothalamic explants. *The Journal of endocrinology* 123, 53–8.
- Geffner, M.E., Bersch, N., Lippe, B.M., Rosenfeld, R.G., Hintz, R.L., Golde, D.W., 1990.** Growth hormone mediates the growth of T-lymphoblast cell lines via locally generated insulin-like growth factor-I. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 71, 464–9.
- Geinisman, Y., de Toledo-Morrell, L., Morrell, F., 1986.** Loss of perforated synapses in the dentate gyrus: morphological substrate of memory deficit in aged rats. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 83, 3027–31.

Geinisman, Y., deToledo-Morrell, L., Morrell, F., Persina, I.S., Rossi, M., 1992. Age-related loss of axospinous synapses formed by two afferent systems in the rat dentate gyrus as revealed by the unbiased stereological dissector technique. *Hippocampus* 2, 437–44.

Gelato, M.C., Merriam, G.R., 1986. Growth hormone releasing hormone. *Annual review of physiology* 48, 569–91.

Gemma, C., Fister, M., Hudson, C., Bickford, P.C., 2005. Improvement of memory for context by inhibition of caspase-1 in aged rats. *The European journal of neuroscience* 22, 1751–6.

Gensert, J.M., Goldman, J.E., 1997. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19, 197–203.

Gerhold, L.M., Rosewell, K.L., Wise, P.M., 2005. Suppression of vasoactive intestinal polypeptide in the suprachiasmatic nucleus leads to aging-like alterations in cAMP rhythms and activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 62–7.

Ghigo, E., Arvat, E., Gianotti, L., Grottoli, S., Rizzi, G., Ceda, G.P., Boghen, M.F., Deghenghi, R., Camanni, F., 1996. Short-term administration of intranasal or oral Hexarelin, a synthetic hexapeptide, does not desensitize the growth hormone responsiveness in human aging. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 135, 407–12.

Gibbins, I.L., Brayden, J.E., Bevan, J.A., 1984. Perivascular nerves with immunoreactivity to vasoactive intestinal polypeptide in cephalic arteries of the cat: distribution, possible origins and functional implications. *Neuroscience* 13, 1327–46.

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. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 2596–602.

Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., Shaw, P.E., 1995. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO journal* 14, 951–62.

Gilson, J., Blakemore, W.F., 1993. Failure of remyelination in areas of demyelination produced in the spinal cord of old rats. *Neuropathology and applied neurobiology* 19, 173–81.

Giustina, A., Veldhuis, J.D., 1998. Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocrine reviews* 19, 717–97.

Givalois, L., Marmigère, F., Rage, F., Ixart, G., Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., 2001. Immobilization stress rapidly and differentially modulates BDNF and TrkB mRNA expression in the pituitary gland of adult male rats. *Neuroendocrinology* 74, 148–59.

Glazebrook, H., Hatch, T., Brindle, N.P., 1998. Regulation of insulin-like growth factor-1 expression in vascular endothelial cells by the inflammatory cytokine interleukin-1. *Journal of vascular research* 35, 143–9.

Glazner, G.W., Gressens, P., Lee, S.J., Gibney, G., Gozes, I., Gozes, Y., Brenneman, D.E., Hill, J.M., 1999. Activity-dependent neurotrophic factor: a potent regulator of embryonic growth and development. *Anatomy and embryology* 200, 65–71.

- Gluckman, P., Klempt, N., Guan, J., Mallard, C., Sirimanne, E., Dragunow, M., Klempt, M., Singh, K., Williams, C., Nikolics, K., 1992.** A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochemical and biophysical research communications* 182, 593–9.
- Gluckman, P.D., Mueller, P.L., Kaplan, S.L., Rudolph, A.M., Grumbach, M.M., 1979.** Hormone ontogeny in the ovine fetus. I. Circulating growth hormone in mid and late gestation. *Endocrinology* 104, 162–8.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B., Korbonits, M., 2002.** The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 2988.
- Godbout, J.P., Chen, J., Abraham, J., Richwine, A.F., Berg, B.M., Kelley, K.W., Johnson, R.W., 2005.** Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1329–31.
- Godbout, J.P., Johnson, R.W., 2004.** Interleukin-6 in the aging brain. *Journal of neuroimmunology* 147, 141–4.
- Godfraind, C., Friedrich, V.L., Holmes, K.V., Dubois-Dalcq, M., 1989.** In vivo analysis of glial cell phenotypes during a viral demyelinating disease in mice. *The Journal of cell biology* 109, 2405–16.
- Gomariz, R.P., Martinez, C., Abad, C., Leceta, J., Delgado, M., 2001.** Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Current pharmaceutical design* 7, 89–111.
- Gong, F.-Y., Deng, J.-Y., Shi, Y.-F., 2005.** Stimulatory effect of interleukin-1beta on growth hormone gene expression and growth hormone release from rat GH3 cells. *Neuroendocrinology* 81, 217–28.
- Gonzalez, G.A., Montminy, M.R., 1989.** Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675–80.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Delgado, M., 2006.** Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology* 130, 1707–20.
- Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A., Martin, J., Pozo, D., Ganea, D., Delgado, M., 2006.** Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses. *The American journal of pathology* 168, 1179–88.
- González-Scarano, F., Baltuch, G., 1999.** Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience* 22, 219–40.
- Gooney, M., Messaoudi, E., Maher, F.O., Bramham, C.R., Lynch, M.A., 2004.** BDNF-induced LTP in dentate gyrus is impaired with age: analysis of changes in cell signaling events. *Neurobiology of aging* 25, 1323–31.
- Gorden, P., Hendricks, C.M., Roth, J., 1973.** Evidence for “big” and “little” components of human plasma and pituitary growth hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 36, 178–84.

- Gossard, F., Dihl, F., Pelletier, G., Dubois, P.M., Morel, G., 1987.** In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA. *Neuroscience letters* 79, 251–6.
- Gosteli-Peter, M.A., Winterhalter, K.H., Schmid, C., Froesch, E.R., Zapf, J., 1994.** Expression and regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein messenger ribonucleic acid levels in tissues of hypophysectomized rats infused with IGF-I and growth hormone. *Endocrinology* 135, 2558–67.
- Guilleux, F., Pallard, C., Dusanter-Fourt, I., Wakao, H., Haldosen, L.A., Norstedt, G., Levy, D., Groner, B., 1995.** Prolactin, growth hormone, erythropoietin and granulocyte-macrophage colony stimulating factor induce MGF-Stat5 DNA binding activity. *The EMBO journal* 14, 2005–13.
- Gould, R.M., Freund, C.M., Barbarese, E., 1999.** Myelin-associated oligodendrocytic basic protein mRNAs reside at different subcellular locations. *Journal of neurochemistry* 73, 1913–24.
- Gozes, I., 2008.** VIP, from gene to behavior and back: summarizing my 25 years of research. *Journal of molecular neuroscience* : MN 36, 115–24.
- Gozes, I., Brenneman, D.E., 1996.** Activity-dependent neurotrophic factor (ADNF). An extracellular neuroprotective chaperonin? *Journal of molecular neuroscience* : MN 7, 235–44.
- Gozes, I., Divinsky, I., Pilzer, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., Spier, A.D., 2003.** From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP: a view of neuroprotection and cell division. *Journal of molecular neuroscience* : MN 20, 315–22.
- Gozes, I., McCune, S.K., Jacobson, L., Warren, D., Moody, T.W., Fridkin, M., Brenneman, D.E., 1991.** An antagonist to vasoactive intestinal peptide affects cellular functions in the central nervous system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 257, 959–66.
- Gozes, I., Meltzer, E., Rubinrout, S., Brenneman, D.E., Fridkin, M., 1989.** Vasoactive intestinal peptide potentiates sexual behavior: inhibition by novel antagonist. *Endocrinology* 125, 2945–9.
- Gozes, I., Schächter, P., Shani, Y., Giladi, E., 1988.** Vasoactive intestinal peptide gene expression from embryos to aging rats. *Neuroendocrinology* 47, 27–31.
- Gozes, I., Shani, Y., Rostène, W.H., 1987.** Developmental expression of the VIP-gene in brain and intestine. *Brain research* 388, 137–48.
- Gozes, I., Zamostiano, R., Pinhasov, A., Bassan, M., Giladi, E., Steingart, R.A., Brenneman, D.E., 2000.** A novel VIP responsive gene. Activity dependent neuroprotective protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 921, 115–8.
- Grady, C.L., Craik, F.I., 2000.** Changes in memory processing with age. *Current opinion in neurobiology* 10, 224–31.
- Granado, M., Priego, T., Martín, A.I., Villanúa, M.A., López-Calderón, A., 2005.** Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288, E486–92.
- Green, V.L., Atkin, S.L., Speirs, V., Jeffreys, R.V., Landolt, A.M., Mathew, B., Hipkin, L., White, M.C., 1996.** Cytokine expression in human anterior pituitary adenomas. *Clinical endocrinology* 45, 179–85.

- Gressens, P., Besse, L., Robberecht, P., Gozes, I., Fridkin, M., Evrard, P., 1999.** Neuroprotection of the developing brain by systemic administration of vasoactive intestinal peptide derivatives. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 288, 1207–13.
- Gressens, P., Hill, J.M., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., 1993.** Growth factor function of vasoactive intestinal peptide in whole cultured mouse embryos. *Nature* 362, 155–8.
- Gressens, P., Hill, J.M., Paindaveine, B., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., 1994.** Severe microcephaly induced by blockade of vasoactive intestinal peptide function in the primitive neuroepithelium of the mouse. *The Journal of clinical investigation* 94, 2020–7.
- Gressens, P., Marret, S., Martin, J.L., Laquerrière, A., Lombet, A., Evrard, P., 1998.** Regulation of neuroprotective action of vasoactive intestinal peptide in the murine developing brain by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase cascades: in vivo and in vitro studies. *Journal of neurochemistry* 70, 2574–84.
- Gressens, P., Paindaveine, B., Hill, J.M., Brenneman, D.E., Evrard, P., 1997.** Growth factor properties of VIP during early brain development. Whole embryo culture and in vivo studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 814, 152–60.
- Griffin, J.L., Rae, C., Dixon, R.M., Radda, G.K., Matthews, P.M., 1998.** Excitatory amino acid synthesis in hypoxic brain slices: does alanine act as a substrate for glutamate production in hypoxia? *Journal of neurochemistry* 71, 2477–86.
- Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., Nave, K.A., 1998.** Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science (New York, N.Y.)* 280, 1610–3.
- Gronowski, A.M., Rotwein, P., 1994.** Rapid changes in nuclear protein tyrosine phosphorylation after growth hormone treatment in vivo. Identification of phosphorylated mitogen-activated protein kinase and STAT91. *The Journal of biological chemistry* 269, 7874–8.
- Gronowski, A.M., Zhong, Z., Wen, Z., Thomas, M.J., Darnell, J.E., Rotwein, P., 1995.** In vivo growth hormone treatment rapidly stimulates the tyrosine phosphorylation and activation of Stat3. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 9, 171–7.
- Gualillo, O., Caminos, J., Blanco, M., Garcia-Caballero, T., Kojima, M., Kangawa, K., Dieguez, C., Casanueva, F., 2001.** Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142, 788–94.
- Gualillo, O., Caminos, J.E., Kojima, M., Kangawa, K., Arvat, E., Ghigo, E., Casanueva, F.F., Dieguez, C., 2001.** Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 144, 687–90.
- Guan, C.-X., Cui, Y.-R., Sun, G.-Y., Yu, F., Tang, C.-Y., Li, Y.-C., Liu, H.-J., Fang, X., 2009.** Role of CREB in vasoactive intestinal peptide-mediated wound healing in human bronchial epithelial cells. *Regulatory peptides* 153, 64–9.
- Guan, J., Bennet, L., Gluckman, P.D., Gunn, A.J., 2003.** Insulin-like growth factor-1 and post-ischemic brain injury. *Progress in neurobiology* 70, 443–62.
- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., 1997.** Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain research. Molecular brain research* 48, 23–9.

- Guillaume, V., Magnan, E., Cataldi, M., Dutour, A., Sauze, N., Renard, M., Razafindraibe, H., Conte-Devolx, B., Deghenghi, R., Lenaerts, V., 1994.** Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep. *Endocrinology* 135, 1073–6.
- Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N., Wehrenberg, W.B., 1982.** Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science (New York, N.Y.)* 218, 585–7.
- Guneli, E., Onal, A., Ates, M., Bagriyanik, H.A., Resmi, H., Orhan, C.E., Kolatan, H.E., Gumustekin, M., 2010.** Effects of repeated administered ghrelin on chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Neuroscience letters* 479, 226–30.
- Gustafson, K., Hagberg, H., Bengtsson, B.A., Brantsing, C., Isgaard, J., 1999.** Possible protective role of growth hormone in hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatric research* 45, 318–23.
- Guttentag, R.E., Madden, D.J., 1987.** Adult age differences in the attentional capacity demands of letter matching. *Experimental aging research* 13, 93–9.
- Guzowski, J.F., McGaugh, J.L., 1997.** Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2693–8.
- Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J., 2000.** Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature neuroscience* 3, 533–5.
- Hanada, T., Toshinai, K., Kajimura, N., Nara-Ashizawa, N., Tsukada, T., Hayashi, Y., Osuye, K., Kangawa, K., Matsukura, S., Nakazato, M., 2003.** Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 301, 275–9.
- Harel, G., Shamoun, D.S., Kane, J.P., Magner, J.A., Szabo, M., 1995.** Prolonged effects of tumor necrosis factor-alpha on anterior pituitary hormone release. *Peptides* 16, 641–5.
- Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S.R., Robberecht, P., Said, S.I., Sreedharan, S.P., Wank, S.A., Waschek, J.A., 1998.** International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacological reviews* 50, 265–70.
- Hartman, B.K., Agrawal, H.C., Kalmbach, S., Shearer, W.T., 1979.** A comparative study of the immunohistochemical localization of basic protein to myelin and oligodendrocytes in rat and chicken brain. *The Journal of comparative neurology* 188, 273–90.
- Hartman, M.L., Clayton, P.E., Johnson, M.L., Celniker, A., Perlman, A.J., Alberti, K.G., Thorner, M.O., 1993.** A low dose euglycemic infusion of recombinant human insulin-like growth factor I rapidly suppresses fasting-enhanced pulsatile growth hormone secretion in humans. *The Journal of clinical investigation* 91, 2453–62.
- Hataya, Y., Akamizu, T., Takaya, K., Kanamoto, N., Ariyasu, H., Saijo, M., Moriyama, K., Shimatsu, A., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K., 2001.** A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 4552.

- Hattiangady, B., Rao, M.S., Shetty, G.A., Shetty, A.K., 2005.** Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Experimental neurology* 195, 353–71.
- Hattori, N., 2009.** Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 19, 187–97.
- Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., Jiang, B.H., Kitagawa, K., Inagaki, C., 2001.** GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 4284–91.
- Hayashi, M., Shimohira, M., Saisho, S., Shimosawa, K., Iwakawa, Y., 1992.** Sleep disturbance in children with growth hormone deficiency. *Brain & development* 14, 170–4.
- Hayashi, M., Yamashita, A., Shimizu, K., 1997.** Somatostatin and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in the primate brain: decreased levels of mRNAs during aging. *Brain research* 749, 283–9.
- Hempstead, B.L., 2002.** The many faces of p75NTR. *Current opinion in neurobiology* 12, 260–7.
- Hempstead, B.L., Salzer, J.L., 2002.** Neurobiology. A glial spin on neurotrophins. *Science (New York, N.Y.)* 298, 1184–6.
- Herrington, J., Carter-Su, C., 2001.** Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12, 252–7.
- Herx, L.M., Rivest, S., Yong, V.W., 2000.** Central nervous system-initiated inflammation and neurotrophism in trauma: IL-1 beta is required for the production of ciliary neurotrophic factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165, 2232–9.
- Heyen, J.R., Ye, S., Finck, B.N., Johnson, R.W., 2000.** Interleukin (IL)-10 inhibits IL-6 production in microglia by preventing activation of NF-kappaB. *Brain research. Molecular brain research* 77, 138–47.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M., 1993.** Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development* 7, 2135–48.
- Hildebrand, C., Remahl, S., Persson, H., Bjartmar, C., 1993.** Myelinated nerve fibres in the CNS. *Progress in neurobiology* 40, 319–84.
- Hill, J.M., 2007.** Vasoactive intestinal peptide in neurodevelopmental disorders: therapeutic potential. *Current pharmaceutical design* 13, 1079–89.
- Hill, J.M., Glazner, G.W., Lee, S.J., Gozes, I., Gressens, P., Brenneman, D.E., 1999.** Vasoactive intestinal peptide regulates embryonic growth through the action of activity-dependent neurotrophic factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 897, 92–100.
- Hill, J.M., Gozes, I., Hill, J.L., Fridkin, M., Brenneman, D.E., 1991.** Vasoactive intestinal peptide antagonist retards the development of neonatal behaviors in the rat. *Peptides* 12, 187–92.

- Hill, J.M., McCune, S.K., Alvero, R.J., Glazner, G.W., Brenneman, D.E., 1996.** VIP regulation of embryonic growth. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805, 259–68; discussion 268–9.
- Hill, J.M., Mervis, R.F., Politi, J., McCune, S.K., Gozes, I., Fridkin, M., Brenneman, D.E., 1994.** Blockade of VIP during neonatal development induces neuronal damage and increases VIP and VIP receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 739, 211–25.
- Hinks, G.L., Franklin, R.J., 2000.** Delayed changes in growth factor gene expression during slow remyelination in the CNS of aged rats. *Molecular and cellular neurosciences* 16, 542–56.
- Hinman, J.D., Abraham, C.R., 2007.** What's behind the decline? The role of white matter in brain aging. *Neurochemical research* 32, 2023–31.
- Hinman, J.D., Duce, J.A., Siman, R.A., Hollander, W., Abraham, C.R., 2004.** Activation of calpain-1 in myelin and microglia in the white matter of the aged rhesus monkey. *Journal of neurochemistry* 89, 430–41.
- Hinman, J.D., Peters, A., Cabral, H., Rosene, D.L., Hollander, W., Rasband, M.N., Abraham, C.R., 2006.** Age-related molecular reorganization at the node of Ranvier. *The Journal of comparative neurology* 495, 351–62.
- Hirano, T., Akira, S., Taga, T., Kishimoto, T., 1990.** Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology today* 11, 443–9.
- Ho, K.Y., Evans, W.S., Blizzard, R.M., Veldhuis, J.D., Merriam, G.R., Samojlik, E., Furlanetto, R., Rogol, A.D., Kaiser, D.L., Thorner, M.O., 1987.** Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 64, 51–8.
- Hoddes, E.S., 1979.** Effect of growth hormone on memory in mice. *Sleep* 1, 287–97.
- Hof, P.R., Morrison, J.H., 2004.** The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in neurosciences* 27, 607–13.
- Hofer, M.M., Barde, Y.A., 1988.** Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo. *Nature* 331, 261–2.
- Hoffman, A.R., Lieberman, S.A., Ceda, G.P., 1992.** Growth hormone therapy in the elderly: implications for the aging brain. *Psychoneuroendocrinology* 17, 327–33.
- Hofman, M.A., Zhou, J.N., Swaab, D.F., 1996.** No evidence for a diurnal vasoactive intestinal polypeptide (VIP) rhythm in the human suprachiasmatic nucleus. *Brain research* 722, 78–82.
- Hojvat, S., Baker, G., Kirsteins, L., Lawrence, A.M., 1982.** Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: distribution, characterization and presence posthypophysectomy. *Brain research* 239, 543–57.
- Hojvat, S., Emanuele, N., Baker, G., Connick, E., Kirsteins, L., Lawrence, A.M., 1982.** Growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH)-like peptides in the rodent brain: non-parallel ontogenetic development with pituitary counterparts. *Brain research* 256, 427–34.
- Hojvat, S., Emanuele, N.V., Kirsteins, L., Lawrence, A.M., 1986.** Impact of endocrine manipulations on brain-based rat growth hormone. *Neuroendocrinology* 44, 355–60.

- Hokari, R., Lee, H., Crawley, S.C., Yang, S.C., Gum, J.R., Miura, S., Kim, Y.S., 2005.** Vasoactive intestinal peptide upregulates MUC2 intestinal mucin via CREB/ATF1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 289, G949–59.
- Holloway, L., Butterfield, G., Hintz, R.L., Gesundheit, N., Marcus, R., 1994.** Effects of recombinant human growth hormone on metabolic indices, body composition, and bone turnover in healthy elderly women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 79, 470–9.
- Holloway, L., Kohlmeier, L., Kent, K., Marcus, R., 1997.** Skeletal effects of cyclic recombinant human growth hormone and salmon calcitonin in osteopenic postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 1111–7.
- Holly, J.M., Wass, J.A., 1989.** Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *The Journal of endocrinology* 122, 611–8.
- Honda, J., Takeuchi, S., Fukamachi, H., Takahashi, S., 1998.** Insulin-like growth factor-I and its receptor in mouse pituitary glands. *Zoological science* 15, 573–9.
- Horiguchi, K., Ilmiawati, C., Fujiwara, K., Tsukada, T., Kikuchi, M., Yashiro, T., 2012.** Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in folliculostellate (FS) cells of the rat anterior pituitary gland: the CXCL12/CXCR4 axis induces interconnection of FS cells. *Endocrinology* 153, 1717–24.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.S., Chung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., DeMartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., 1996.** A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science (New York, N.Y.)* 273, 974–7.
- Huang, E.J., Reichardt, L.F., 2001.** Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annual review of neuroscience* 24, 677–736.
- Huang, L., Tang, Y., Qin, J., Peng, Y., Yuan, Q., Zhang, F., Tao, L., 2012.** Vasoactive intestinal peptide enhances TNF- α -induced IL-6 and IL-8 synthesis in human proximal renal tubular epithelial cells by NF- κ B-dependent mechanism. *Inflammation* 35, 1154–60.
- Huang, Y., Henry, C.J., Dantzer, R., Johnson, R.W., Godbout, J.P., 2008.** Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. *Neurobiology of aging* 29, 1744–53.
- Huh, Y., Kim, C., Cho, J., Lee, W., Kim, J., Ahn, H., 1997.** Differential effects of aging on NADPH-diaphorase and VIP neurons in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 8, 2991–4.
- Hull, K.L., Harvey, S., 1998.** Autoregulation of growth hormone receptor and growth hormone binding protein transcripts in brain and peripheral tissues of the rat. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 8, 167–73.
- Hultsch, D.F., Hertzog, C., Dixon, R.A., 1990.** Ability correlates of memory performance in adulthood and aging. *Psychology and aging* 5, 356–68.

- Hung, K.-S., Tsai, S.-H., Lee, T.-C., Lin, J.-W., Chang, C.-K., Chiu, W.-T., 2007.** Gene transfer of insulin-like growth factor-I providing neuroprotection after spinal cord injury in rats. *Journal of neurosurgery. Spine* 6, 35–46.
- Husain, J., Juurlink, B.H., 1995.** Oligodendroglial precursor cell susceptibility to hypoxia is related to poor ability to cope with reactive oxygen species. *Brain research* 698, 86–94.
- Husson, I., Rangon, C.-M., Lelièvre, V., Bemelmans, A.-P., Sachs, P., Mallet, J., Kosofsky, B.E., Gressens, P., 2005.** BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 15, 250–61.
- Hwang, S., Moon, M., Kim, S., Hwang, L., Ahn, K.J., Park, S., 2009.** Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *Endocrine journal* 56, 609–17.
- Hynes, M.A., Van Wyk, J.J., Brooks, P.J., D'Ercole, A.J., Jansen, M., Lund, P.K., 1987.** Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acids. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 1, 233–42.
- Höpker, V.H., Amoureux, M.C., Varon, S., 1997.** NGF and BDNF in the anterior pituitary lobe of adult rats. *Journal of neuroscience research* 49, 355–63.
- Ihle, J.N., 1996.** Janus kinases in cytokine signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 351, 159–66.
- Inoue, T., Saito, H., Fukushima, R., Inaba, T., Lin, M.T., Fukatsu, K., Muto, T., 1995.** Growth hormone and insulinlike growth factor I enhance host defense in a murine sepsis model. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* 130, 1115–22.
- Iranmanesh, A., Lizarralde, G., Veldhuis, J.D., 1991.** Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 73, 1081–8.
- Isaksson, O.G., Lindahl, A., Nilsson, A., Isgaard, J., 1987.** Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine reviews* 8, 426–38.
- Isaksson, O.G., Lindahl, A., Nilsson, A., Isgaard, J., 1988.** Action of growth hormone: current views. *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement* 343, 12–8.
- Itoh, S., Takashima, A., Morimoto, T., 1994.** Impaired spatial learning by vasoactive intestinal peptide in Morris water maze task in the rat. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 72, 25–9.
- Iwasaki, Y., Ikeda, K., Ichikawa, Y., Igarashi, O., 2001.** Vasoactive intestinal peptide influences neurite outgrowth in cultured rat spinal cord neurons. *Neurological research* 23, 851–4.
- Işeri, S.O., Sener, G., Yüksel, M., Contuk, G., Cetinel, S., Gedik, N., Yegen, B.C., 2005.** Ghrelin against alendronate-induced gastric damage in rats. *The Journal of endocrinology* 187, 399–406.
- Jacobson, M., 1991.** *Developmental Neurobiology*. Plenum Press, New York.

- Janssen, J.A., Lamberts, S.W., 1999.** Is the measurement of free IGF-I more indicative than that of total IGF-I in the evaluation of the biological activity of the GH/IGF-I axis? *Journal of endocrinological investigation* 22, 313–5.
- Jansson, J.O., Edén, S., Isaksson, O., 1985.** Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine reviews* 6, 128–50.
- Jasnow, A.M., Shi, C., Israel, J.E., Davis, M., Huhman, K.L., 2005.** Memory of social defeat is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *Behavioral neuroscience* 119, 1125–30.
- Jeay, S., Sonenshein, G.E., Kelly, P.A., Postel-Vinay, M.C., Baixeras, E., 2001.** Growth hormone exerts antiapoptotic and proliferative effects through two different pathways involving nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase. *Endocrinology* 142, 147–56.
- Jiang, H., Li, L.-J., Wang, J., Xie, J.-X., 2008.** Ghrelin antagonizes MPTP-induced neurotoxicity to the dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Experimental neurology* 212, 532–7.
- Jiang, Y., Wei, N., Zhu, J., Lu, T., Chen, Z., Xu, G., Liu, X., 2010.** Effects of brain-derived neurotrophic factor on local inflammation in experimental stroke of rat. *Mediators of inflammation* 2010, 372423.
- Jirikowski, G., Reisert, I., Pilgrim, C., 1982.** Nerve cells immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in dissociation cultures of rat hypothalamus and midbrain. *Neuroscience letters* 31, 75–9.
- Johanson, A.J., Blizzard, R.M., 1981.** Low somatomedin-C levels in older men rise in response to growth hormone administration. *The Johns Hopkins medical journal* 149, 115–7.
- Johansson, I., Destefanis, S., Aberg, N.D., Aberg, M.A.I., Blomgren, K., Zhu, C., Ghè, C., Granata, R., Ghigo, E., Muccioli, G., Eriksson, P.S., Isgaard, J., 2008.** Proliferative and protective effects of growth hormone secretagogues on adult rat hippocampal progenitor cells. *Endocrinology* 149, 2191–9.
- Johansson, J.O., Fowelin, J., Landin, K., Lager, I., Bengtsson, B.A., 1995.** Growth hormone-deficient adults are insulin-resistant. *Metabolism: clinical and experimental* 44, 1126–9.
- Johansson, J.O., Larson, G., Andersson, M., Elmgren, A., Hynsjö, L., Lindahl, A., Lundberg, P.A., Isaksson, O.G., Lindstedt, S., Bengtsson, B.A., 1995.** Treatment of growth hormone-deficient adults with recombinant human growth hormone increases the concentration of growth hormone in the cerebrospinal fluid and affects neurotransmitters. *Neuroendocrinology* 61, 57–66.
- Johnson, J.R., Chu, A.K., Sato-Bigbee, C., 2000.** Possible role of CREB in the stimulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation by neurotrophin-3. *Journal of neurochemistry* 74, 1409–17.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J., Tjian, R., 1987.** A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 48, 79–89.
- Josselyn, S.A., Shi, C., Carlezon, W.A., Neve, R.L., Nestler, E.J., Davis, M., 2001.** Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 2404–12.

- Juurink, B.H., Thorburne, S.K., Hertz, L., 1998.** Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia* 22, 371–8.
- Jégou, S., Javoy-Agid, F., Delbende, C., Tranchand-Bunel, D., Coy, D.H., Agid, Y., Vaudry, H., 1988.** Regional distribution of vasoactive intestinal peptide in brains from normal and parkinsonian subjects. *Peptides* 9, 787–93.
- Jørgensen, J.O., Pedersen, S.A., Thuesen, L., Jørgensen, J., Ingemann-Hansen, T., Skakkebaek, N.E., Christiansen, J.S., 1989.** Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults. *Lancet* 1, 1221–5.
- Kadi, L., Selvaraju, R., de Lys, P., Proudfoot, A.E.I., Wells, T.N.C., Boschert, U., 2006.** Differential effects of chemokines on oligodendrocyte precursor proliferation and myelin formation in vitro. *Journal of neuroimmunology* 174, 133–46.
- Kaler, L.W., Gliessman, P., Craven, J., Hill, J., Critchlow, V., 1986.** Loss of enhanced nocturnal growth hormone secretion in aging rhesus males. *Endocrinology* 119, 1281–4.
- Kalló, I., Kalamatianos, T., Piggins, H.D., Coen, C.W., 2004.** Ageing and the diurnal expression of mRNAs for vasoactive intestinal peptide and for the VPAC2 and PAC1 receptors in the suprachiasmatic nucleus of male rats. *Journal of neuroendocrinology* 16, 758–66.
- Kalmijn, S., Janssen, J.A., Pols, H.A., Lamberts, S.W., Breteler, M.M., 2000.** A prospective study on circulating insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding proteins, and cognitive function in the elderly. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 4551–5.
- Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2000.** Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 10, 381–91.
- Kappeler, L., Zizzari, P., Alliot, J., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.-T., 2004.** Delayed age-associated decrease in growth hormone pulsatile secretion and increased orexigenic peptide expression in the Lou C/JaLL rat. *Neuroendocrinology* 80, 273–83.
- Karacay, B., O'Dorisio, M.S., Summers, M., Robinson, M., Bonthius, D.J., 2003.** VIP receptor 1 (VPAC1) promoter targets the expression of a reporter gene to cerebellum and adrenal medulla in transgenic mice. *Regulatory peptides* 116, 1–12.
- Katafuchi, T., Takaki, A., Take, S., Kondo, T., Yoshimura, M., 2003.** Endotoxin inhibitor blocks heat exposure-induced expression of brain cytokine mRNA in aged rats. *Brain research. Molecular brain research* 118, 24–32.
- Katayama, M., Nogami, H., Nishiyama, J., Kawase, T., Kawamura, K., 2000.** Developmentally and regionally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor mRNA in rat brain and pituitary gland. *Neuroendocrinology* 72, 333–40.
- Katoh-Semba, R., Semba, R., Takeuchi, I.K., Kato, K., 1998.** Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neuroscience research* 31, 227–34.
- Katoh-Semba, R., Takeuchi, I.K., Semba, R., Kato, K., 1997.** Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *Journal of neurochemistry* 69, 34–42.

- Kawamoto, Y., Nakamura, S., Nakano, S., Oka, N., Akiguchi, I., Kimura, J., 1996.** Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74, 1209–26.
- Kazanis, I., Giannakopoulou, M., Philippidis, H., Stylianopoulou, F., 2004.** Alterations in IGF-I, BDNF and NT-3 levels following experimental brain trauma and the effect of IGF-I administration. *Experimental neurology* 186, 221–34.
- Kelly, P.A., Djiane, J., Postel-Vinay, M.C., Edery, M., 1991.** The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine reviews* 12, 235–51.
- Kemper, T.L., 1993.** The relationship of cerebral cortical changes to nuclei in the brainstem. *Neurobiology of aging* 14, 659–60.
- Kemper, T.L., 1994.** Neuroanatomical and neuropathological changes during aging and dementia., in: Albert M.L., Knoefel J.E. (Eds.), *Clinical Neurology of Aging*. Oxford University Press, New York, pp. 3–67.
- Kenchappa, P., Yadav, A., Singh, G., Nandana, S., Banerjee, K., 2004.** Rescue of TNF α -inhibited neuronal cells by IGF-1 involves Akt and c-Jun N-terminal kinases. *Journal of neuroscience research* 76, 466–74.
- Kermani, P., Hempstead, B., 2007.** Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 17, 140–3.
- Kim, D.S., Lee, S.J., Cho, H.J., 2001.** Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoter in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injuries and inflammation. *Brain research. Molecular brain research* 92, 167–71.
- Kim, M.S., Yoon, C.Y., Jang, P.G., Park, Y.J., Shin, C.S., Park, H.S., Ryu, J.W., Pak, Y.K., Park, J.Y., Lee, K.U., Kim, S.Y., Lee, H.K., Kim, Y.B., Park, K.S., 2004.** The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18, 2291–301.
- Kim, S.W., Her, S.J., Park, S.J., Kim, D., Park, K.S., Lee, H.K., Han, B.H., Kim, M.S., Shin, C.S., Kim, S.Y., 2005.** Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 37, 359–69.
- Kineman, R.D., Kamegai, J., Frohman, L.A., 1999.** Growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) and the GH secretagogue (GHS), L692,585, differentially modulate rat pituitary GHS receptor and GHRH receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 140, 3581–6.
- Kirschner, D.A., Ganser, A.L., Caspar, D.L., 1984.** Diffraction studies of molecular organization and membrane interactions in myelin., in: Morell P. (Ed.), *Myelin*. Plenum, New York, pp. 51–95.
- Klein, R.S., Rubin, J.B., 2004.** Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends in immunology* 25, 306–14.
- Knox, C.A., Kokmen, E., Dyck, P.J., 1989.** Morphometric alteration of rat myelinated fibers with aging. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 48, 119–39.
- Koda, M., Murakami, M., Ino, H., Yoshinaga, K., Ikeda, O., Hashimoto, M., Yamazaki, M., Nakayama, C., Moriya, H., 2002.** Brain-derived neurotrophic factor suppresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats. *Journal of neurotrauma* 19, 777–85.

- Koenig, J.I., Snow, K., Clark, B.D., Toni, R., Cannon, J.G., Shaw, A.R., Dinarello, C.A., Reichlin, S., Lee, S.L., Lechan, R.M., 1990.** Intrinsic pituitary interleukin-1 beta is induced by bacterial lipopolysaccharide. *Endocrinology* 126, 3053–8.
- Koike, K., Masumoto, N., Kasahara, K., Yamaguchi, M., Tasaka, K., Hirota, K., Miyake, A., Tanizawa, O., 1991.** Tumor necrosis factor-alpha stimulates prolactin release from anterior pituitary cells: a possible involvement of intracellular calcium mobilization. *Endocrinology* 128, 2785–90.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., Kangawa, K., 1999.** Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–60.
- Kokaia, Z., Metsis, M., Kokaia, M., Bengzon, J., Elmér, E., Smith, M.L., Timmusk, T., Siesjö, B.K., Persson, H., Lindvall, O., 1994.** Brain insults in rats induce increased expression of the BDNF gene through differential use of multiple promoters. *The European journal of neuroscience* 6, 587–96.
- Kononen, J., Hökfelt, T., Pelto-Huikko, M., 1995.** Effects of aging on the expression of neurotrophins and their receptors in the rat pituitary gland. *Neuroreport* 6, 2429–34.
- Kononen, J., Soinila, S., Persson, H., Honkaniemi, J., Hökfelt, T., Pelto-Huikko, M., 1994.** Neurotrophins and their receptors in the rat pituitary gland: regulation of BDNF and trkB mRNA levels by adrenal hormones. *Brain research. Molecular brain research* 27, 347–54.
- Konturek, P.C., Brzozowski, T., Walter, B., Burnat, G., Hess, T., Hahn, E.G., Konturek, S.J., 2006.** Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *European journal of pharmacology* 536, 171–81.
- Kooijman, R., Berus, D., Malur, A., Delhase, M., Hooghe-Peters, E.L., 1997.** Human neutrophils express GH-N gene transcripts and the pituitary transcription factor Pit-1b. *Endocrinology* 138, 4481–4.
- Kooijman, R., Hooghe-Peters, E.L., Hooghe, R., 1996.** Prolactin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I in the immune system. *Advances in immunology* 63, 377–454.
- Kooijman, R., Lauf, J.J., Kappers, A.C., Rijkers, G.T., 1995.** Insulin-like growth factor induces phosphorylation of immunoreactive insulin receptor substrate and its association with phosphatidylinositol-3 kinase in human thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 182, 593–7.
- Koopmans, G.C., Brans, M., Gómez-Pinilla, F., Duis, S., Gispen, W.H., Torres-Aleman, I., Joosten, E.A.J., Hamers, F.P.T., 2006.** Circulating insulin-like growth factor I and functional recovery from spinal cord injury under enriched housing conditions. *The European journal of neuroscience* 23, 1035–46.
- Korbonits, M., Kojima, M., Kangawa, K., Grossman, A.B., 2001.** Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14, 101–4.
- Kornhauser, J.M., Greenberg, M.E., 1997.** A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* 18, 839–42.
- Kovalovsky, D., Paez Pereda, M., Labour, M., Renner, U., Holsboer, F., Stalla, G.K., Arzt, E., 2004.** Nur77 induction and activation are necessary for interleukin-1 stimulation of proopiomelanocortin in AtT-20 corticotrophs. *FEBS letters* 563, 229–33.

- Krajnak, K., Kashon, M.L., Rosewell, K.L., Wise, P.M., 1998.** Aging alters the rhythmic expression of vasoactive intestinal polypeptide mRNA but not arginine vasopressin mRNA in the suprachiasmatic nuclei of female rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 4767–74.
- Kristensson, K., Zeller, N.K., Dubois-Dalcq, M.E., Lazzarini, R.A., 1986.** Expression of myelin basic protein gene in the developing rat brain as revealed by in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 34, 467–73.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., Avruch, J., 1992.** Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417–21.
- Laburthe, M., Couvineau, A., Tan, V., 2007.** Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28, 1631–9.
- Lage, R., Vázquez, M.J., Varela, L., Saha, A.K., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Diéguez, C., López, M., 2010.** Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 2670–9.
- Lai, M., Hibberd, C.J., Gluckman, P.D., Seckl, J.R., 2000.** Reduced expression of insulin-like growth factor 1 messenger RNA in the hippocampus of aged rats. *Neuroscience letters* 288, 66–70.
- Lai, Z., Roos, P., Zhai, O., Olsson, Y., Fhølenhag, K., Larsson, C., Nyberg, F., 1993.** Age-related reduction of human growth hormone-binding sites in the human brain. *Brain research* 621, 260–6.
- Lai, Z.N., Emtner, M., Roos, P., Nyberg, F., 1991.** Characterization of putative growth hormone receptors in human choroid plexus. *Brain research* 546, 222–6.
- Lamberts, S.W., van den Beld, A.W., van der Lely, A.J., 1997.** The endocrinology of aging. *Science (New York, N.Y.)* 278, 419–24.
- Lange, K.H., Isaksson, F., Juul, A., Rasmussen, M.H., Bülow, J., Kjaer, M., 2000.** Growth hormone enhances effects of endurance training on oxidative muscle metabolism in elderly women. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 279, E989–96.
- Lanzi, R., Tannenbaum, G.S., 1992.** Time course and mechanism of growth hormone's negative feedback effect on its own spontaneous release. *Endocrinology* 130, 780–8.
- Lara, J.I., Lorenzo, M.J., Cacicedo, L., Tolón, R.M., Balsa, J.A., López-Fernández, J., Sánchez-Franco, F., 1994.** Induction of vasoactive intestinal peptide gene expression and prolactin secretion by insulin-like growth factor I in rat pituitary cells: evidence for an autocrine regulatory system. *Endocrinology* 135, 2526–32.
- Laron, Z., 1999.** Natural history of the classical form of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome). *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 12 Suppl 1, 231–49.
- Larsson, L.I., Fahrenkrug, J., Schaffalitzky De Muckadell, O., Sundler, F., Håkanson, R., Rehfeld, J.R., 1976.** Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3197–200.

- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009.** Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10, 895–926.
- Le Grevès, M., Steensland, P., Le Grevès, P., Nyberg, F., 2002.** 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7119–23.
- Le Grevès, M., Zhou, Q., Berg, M., Le Grevès, P., Fhølenhag, K., Meyerson, B., Nyberg, F., 2006.** Growth hormone replacement in hypophysectomized rats affects spatial performance and hippocampal levels of NMDA receptor subunit and PSD-95 gene transcript levels. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* 173, 267–73.
- Lee, C.K., Weindruch, R., Prolla, T.A., 2000.** Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nature genetics* 25, 294–7.
- Lee, F.S., Kim, A.H., Khursigara, G., Chao, M.V., 2001.** The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Current opinion in neurobiology* 11, 281–6.
- Lee, J., Lim, E., Kim, Y., Li, E., Park, S., 2010.** Ghrelin attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *The Journal of endocrinology* 205, 263–70.
- Lee, J.Y., Chung, H., Yoo, Y.S., Oh, Y.J., Oh, T.H., Park, S., Yune, T.Y., 2010.** Inhibition of apoptotic cell death by ghrelin improves functional recovery after spinal cord injury. *Endocrinology* 151, 3815–26.
- Lee, J.Y., Oh, T.H., Yune, T.Y., 2011.** Ghrelin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death of oligodendrocytes via ERK and p38MAPK signaling. *Endocrinology* 152, 2377–86.
- Lee, Y., Kim, J.M., Lee, E.J., 2008.** Functional expression of CXCR4 in somatotrophs: CXCL12 activates GH gene, GH production and secretion, and cellular proliferation. *The Journal of endocrinology* 199, 191–9.
- Lehman, D.M., Hale, D.E., Cody, J.T., Harrison, J.M., Leach, R.J., 1999.** Molecular, morphometric and functional analyses demonstrate that the growth hormone deficient little mouse is not hypomyelinated. *Brain research. Developmental brain research* 116, 191–9.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., Barde, Y.A., 1989.** Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149–52.
- Leonard, W.J., O’Shea, J.J., 1998.** Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology* 16, 293–322.
- Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J., Wood, W.I., 1987.** Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330, 537–43.
- Levine, J.M., Reynolds, R., 1999.** Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Experimental neurology* 160, 333–47.
- Lewis, U.J., 1992.** Growth Hormone What is it and what does it do? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 3, 117–21.

- Li, W.G., Gavrilu, D., Liu, X., Wang, L., Gunnlaugsson, S., Stoll, L.L., McCormick, M.L., Sigmund, C.D., Tang, C., Weintraub, N.L., 2004.** Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 109, 2221–6.
- Liang, L., Jiang, J., Frank, S.J., 2000.** Insulin receptor substrate-1-mediated enhancement of growth hormone-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 141, 3328–36.
- Lieberman, S.A., Mitchell, A.M., Marcus, R., Hintz, R.L., Hoffman, A.R., 1994.** The insulin-like growth factor I generation test: resistance to growth hormone with aging and estrogen replacement therapy. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 26, 229–33.
- Light, L.L., Valencia-Laver, D., Zavis, D., 1991.** Instantiation of general terms in young and older adults. *Psychology and aging* 6, 337–51.
- Linnarsson, S., Björklund, A., Ernfors, P., 1997.** Learning deficit in BDNF mutant mice. *The European journal of neuroscience* 9, 2581–7.
- Lintl, P., Braak, H., 1983.** Loss of intracortical myelinated fibers: a distinctive age-related alteration in the human striate area. *Acta neuropathologica* 61, 178–82.
- Liu, H., Bravata, D.M., Olkin, I., Nayak, S., Roberts, B., Garber, A.M., Hoffman, A.R., 2007.** Systematic review: the safety and efficacy of growth hormone in the healthy elderly. *Annals of internal medicine* 146, 104–15.
- Liu, J.L., Yakar, S., LeRoith, D., 2000.** Mice deficient in liver production of insulin-like growth factor I display sexual dimorphism in growth hormone-stimulated postnatal growth. *Endocrinology* 141, 4436–41.
- Liu, Y.L., Yakar, S., Otero-Corchon, V., Low, M.J., Liu, J.L., 2002.** Ghrelin gene expression is age-dependent and influenced by gender and the level of circulating IGF-I. *Molecular and cellular endocrinology* 189, 97–103.
- Liuzzi, G.M., Riccio, P., Dal Canto, M.C., 1995.** Release of myelin basic protein-degrading proteolytic activity from microglia and macrophages after infection with Theiler's murine encephalomyelitis virus: comparison between susceptible and resistant mice. *Journal of neuroimmunology* 62, 91–102.
- Loane, D.J., Deighan, B.F., Clarke, R.M., Griffin, R.J., Lynch, A.M., Lynch, M.A., 2009.** Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain. *Neurobiology of aging* 30, 920–31.
- Lobie, P.E., Allevato, G., Nielsen, J.H., Norstedt, G., Billestrup, N., 1995.** Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH-stimulated function. *The Journal of biological chemistry* 270, 21745–50.
- Lobie, P.E., García-Aragón, J., Lincoln, D.T., Barnard, R., Wilcox, J.N., Waters, M.J., 1993.** Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain research. Developmental brain research* 74, 225–33.
- Lobie, P.E., Zhu, T., Graichen, R., Goh, E.L., 2000.** Growth hormone, insulin-like growth factor I and the CNS: localization, function and mechanism of action. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 10 Suppl B, S51–6.

- Locatelli, V., Grilli, R., Torsello, A., Cella, S.G., Wehrenberg, W.B., Müller, E.E., 1994.** Growth hormone-releasing hexapeptide is a potent stimulator of growth hormone gene expression and release in the growth hormone-releasing hormone-deprived infant rat. *Pediatric research* 36, 169–74.
- Loddick, S.A., Turnbull, A.V., Rothwell, N.J., 1998.** Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 18, 176–9.
- Lommatzsch, M., Zingler, D., Schuhbaeck, K., Schloetcke, K., Zingler, C., Schuff-Werner, P., Virchow, J.C., 2005.** The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiology of aging* 26, 115–23.
- Lonze, B.E., Ginty, D.D., 2002.** Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605–23.
- Lorenzo, M.J., Sánchez-Franco, F., de los Frailes, M.T., Reichlin, S., Fernández, G., Cacicedo, L., 1989.** Synthesis and secretion of vasoactive intestinal peptide by rat fetal cerebral cortical and hypothalamic cells in culture. *Endocrinology* 125, 1983–90.
- Lorén, I., Emson, P.C., Fahrenkrug, J., Björklund, A., Alumets, J., Håkanson, R., Sundler, F., 1979.** Distribution of vasoactive intestinal polypeptide in the rat and mouse brain. *Neuroscience* 4, 1953–76.
- Lu, B., Figurov, A., 1997.** Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Reviews in the neurosciences* 8, 1–12.
- Lu, M., Grove, E.A., Miller, R.J., 2002.** Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7090–5.
- Ludwin, S.K., 1997.** The pathobiology of the oligodendrocyte. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56, 111–24.
- Luellen, B.A., Bianco, L.E., Schneider, L.M., Andrews, A.M., 2007.** Reduced brain-derived neurotrophic factor is associated with a loss of serotonergic innervation in the hippocampus of aging mice. *Genes, brain, and behavior* 6, 482–90.
- Lynch, A.M., Lynch, M.A., 2002.** The age-related increase in IL-1 type I receptor in rat hippocampus is coupled with an increase in caspase-3 activation. *The European journal of neuroscience* 15, 1779–88.
- 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* 142, 506–9.
- Lynch, M.A., 2002.** Interleukin-1 beta exerts a myriad of effects in the brain and in particular in the hippocampus: analysis of some of these actions. *Vitamins and hormones* 64, 185–219.
- Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., Tessarollo, L., 1999.** Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15239–44.

- López-Fernández, J., Sánchez-Franco, F., Velasco, B., Tolón, R.M., Pazos, F., Cacicedo, L., 1996.** Growth hormone induces somatostatin and insulin-like growth factor I gene expression in the cerebral hemispheres of aging rats. *Endocrinology* 137, 4384–91.
- Ma, L., Zhang, D., Tang, Y., Lu, Y., Zhang, Y., Gao, Y., Xia, L., Zhao, K., Chai, L.-Y., Xiao, Q., 2011.** Ghrelin-attenuated cognitive dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Alzheimer disease and associated disorders* 25, 352–63.
- Mabley, J.G., Belin, V., John, N., Green, I.C., 1997.** Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1beta inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of Langerhans. *FEBS letters* 417, 235–8.
- Magistretti, P.J., 1986.** Intercellular communication mediated by VIP in the cerebral cortex. *Peptides* 7 Suppl 1, 169–73.
- Magistretti, P.J., Cardinaux, J.R., Martin, J.L., 1998.** VIP and PACAP in the CNS: regulators of glial energy metabolism and modulators of glutamatergic signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 865, 213–25.
- Maher, F.O., Martin, D.S.D., Lynch, M.A., 2004.** Increased IL-1beta in cortex of aged rats is accompanied by downregulation of ERK and PI-3 kinase. *Neurobiology of aging* 25, 795–806.
- Maher, F.O., Nolan, Y., Lynch, M.A., 2005.** Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiology of aging* 26, 717–28.
- Maimone, D., Cioni, C., Rosa, S., Macchia, G., Aloisi, F., Annunziata, P., 1993.** Norepinephrine and vasoactive intestinal peptide induce IL-6 secretion by astrocytes: synergism with IL-1 beta and TNF alpha. *Journal of neuroimmunology* 47, 73–81.
- Makar, T.K., Bever, C.T., Singh, I.S., Royal, W., Sahu, S.N., Sura, T.P., Sultana, S., Sura, K.T., Patel, N., Dhib-Jalbut, S., Trisler, D., 2009.** Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle. *Journal of neuroimmunology* 210, 40–51.
- Malagón, M.M., Luque, R.M., Ruiz-Guerrero, E., Rodríguez-Pacheco, F., García-Navarro, S., Casanueva, F.F., Gracia-Navarro, F., Castaño, J.P., 2003.** Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 144, 5372–80.
- Malcangio, M., Lessmann, V., 2003.** A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends in pharmacological sciences* 24, 116–21.
- Maletti, M., Besson, J., Bataille, D., Laburthe, M., Rosselin, G., 1980.** Ontogeny and immunoreactive forms of vasoactive intestinal peptide (VIP) in rat brain. *Acta endocrinologica* 93, 479–87.
- Markowska, A.L., Mooney, M., Sonntag, W.E., 1998.** Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience* 87, 559–69.
- Marner, L., Nyengaard, J.R., Tang, Y., Pakkenberg, B., 2003.** Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *The Journal of comparative neurology* 462, 144–52.
- Martenson, R.E., 1980.** Myelin basic protein: What does it do?, in: Kumar S. (Ed.), *Biochemistry of Brain*. Pergamon, Oxford, pp. 49–79.

- Martin, J.L., Gasser, D., Magistretti, P.J., 1995.** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide potentiate c-fos expression induced by glutamate in cultured cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 65, 1–9.
- Martinez, C., Delgado, M., Pozo, D., Leceta, J., Calvo, J.R., Ganea, D., Gomariz, R.P., 1998.** VIP and PACAP enhance IL-6 release and mRNA levels in resting peritoneal macrophages: in vitro and in vivo studies. *Journal of neuroimmunology* 85, 155–67.
- Martinoli, M.G., Ouellet, J., Rhéaume, E., Pelletier, G., 1991.** Growth hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 54, 607–15.
- Mason, J.L., Suzuki, K., Chaplin, D.D., Matsushima, G.K., 2001.** Interleukin-1beta promotes repair of the CNS. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 7046–52.
- Mason, J.L., Toews, A., Hostettler, J.D., Morell, P., Suzuki, K., Goldman, J.E., Matsushima, G.K., 2004.** Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *The American journal of pathology* 164, 1673–82.
- Mason, J.L., Ye, P., Suzuki, K., D'Ercole, A.J., Matsushima, G.K., 2000.** Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 5703–8.
- Massa, A., Casagrande, S., Bajetto, A., Porcile, C., Barbieri, F., Thellung, S., Arena, S., Pattarozzi, A., Gatti, M., Corsaro, A., Robello, M., Schettini, G., Florio, T., 2006.** SDF-1 controls pituitary cell proliferation through the activation of ERK1/2 and the Ca²⁺-dependent, cytosolic tyrosine kinase Pyk2. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1090, 385–98.
- Mathews, L.S., Enberg, B., Norstedt, G., 1989.** Regulation of rat growth hormone receptor gene expression. *The Journal of biological chemistry* 264, 9905–10.
- Matsuda, S., Wen, T.C., Morita, F., Otsuka, H., Igase, K., Yoshimura, H., Sakanaka, M., 1996.** Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils. *Neuroscience letters* 204, 109–12.
- Matsumoto, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Morozumi, N., Minamitake, Y., Tanaka, S., Matsuo, H., Kojima, M., Hayashi, Y., Kangawa, K., 2001.** Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 287, 142–6.
- Matsunaga, W., Shirokawa, T., Isobe, K., 2004.** BDNF is necessary for maintenance of noradrenergic innervations in the aged rat brain. *Neurobiology of aging* 25, 341–8.
- Matsuyama, T., Shiosaka, S., Matsumoto, M., Yoneda, S., Kimura, K., Abe, H., Hayakawa, T., Inoue, H., Tohyama, M., 1983.** Overall distribution of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves on the wall of cerebral arteries: an immunohistochemical study using whole-mounts. *Neuroscience* 10, 89–96.
- Mattson, M.P., Magnus, T., 2006.** Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews. Neuroscience* 7, 278–94.
- Mayer-Proschel, M., Kalyani, A.J., Mujtaba, T., Rao, M.S., 1997.** Isolation of lineage-restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 19, 773–85.

- Maylor, E.A., 1990.** Recognizing and naming faces: aging, memory retrieval, and the tip of the tongue state. *Journal of gerontology* 45, P215–26.
- Mayo, K.E., Godfrey, P.A., Suhr, S.T., Kulik, D.J., Rahal, J.O., 1995.** Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent progress in hormone research* 50, 35–73.
- Mayo, K.E., Miller, T.L., DeAlmeida, V., Zheng, J., Godfrey, P.A., 1996.** The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 805, 184–203.
- Mayr, B., Montminy, M., 2001.** Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 599–609.
- Maysami, S., Nguyen, D., Zobel, F., Pitz, C., Heine, S., Höpfner, M., Stangel, M., 2006.** Modulation of rat oligodendrocyte precursor cells by the chemokine CXCL12. *Neuroreport* 17, 1187–90.
- McAllister, A.K., 1999.** Subplate neurons: a missing link among neurotrophins, activity, and ocular dominance plasticity? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13600–2.
- McGauley, G.A., 1989.** Quality of life assessment before and after growth hormone treatment in adults with growth hormone deficiency. *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement* 356, 70–2; discussion 73–4.
- McGauley, G.A., Cuneo, R.C., Salomon, F., Sönksen, P.H., 1990.** Psychological well-being before and after growth hormone treatment in adults with growth hormone deficiency. *Hormone research* 33 Suppl 4, 52–4.
- McGurk JF, Pong S-S, Chaung L-YP, Gall M, Butler BS, A.J., 1993.** Growth hormone secretagogues modulate potassium currents in rat somatotrophs, in: *Proceedings of the 23rd Annual Meeting of The Society of Neuroscience*. Whashington, D.C., p. Vol 19:1559.
- McKay, R., 1997.** Stem cells in the central nervous system. *Science (New York, N.Y.)* 276, 66–71.
- McKee, K.K., Palyha, O.C., Feighner, S.D., Hreniuk, D.L., Tan, C.P., Phillips, M.S., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., 1997.** Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 11, 415–23.
- McLenachan, S., Lum, M.-G., Waters, M.J., Turnley, A.M., 2009.** Growth hormone promotes proliferation of adult neurosphere cultures. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 19, 212–8.
- McMahon, S.B., Malcangio, M., 2009.** Current challenges in glia-pain biology. *Neuron* 64, 46–54.
- McMorris, F.A., Dubois-Dalcq, M., 1988.** Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing in vitro. *Journal of neuroscience research* 21, 199–209.
- McMorris, F.A., Mozell, R.L., Carson, M.J., Shinar, Y., Meyer, R.D., Marchetti, N., 1993.** Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 692, 321–34.

- McTigue, D.M., Horner, P.J., Stokes, B.T., Gage, F.H., 1998.** Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 5354–65.
- Medina, D.L., Sciarretta, C., Calella, A.M., Von Bohlen Und Halbach, O., Unsicker, K., Minichiello, L., 2004.** TrkB regulates neocortex formation through the Shc/PLCgamma-mediated control of neuronal migration. *The EMBO journal* 23, 3803–14.
- Mendelson, W.B., Slater, S., Gold, P., Gillin, J.C., 1980.** The effect of growth hormone administration on human sleep: a dose-response study. *Biological psychiatry* 15, 613–8.
- Merighi, A., Salio, C., Ghirri, A., Lossi, L., Ferrini, F., Betelli, C., Bardoni, R., 2008.** BDNF as a pain modulator. *Progress in neurobiology* 85, 297–317.
- Merriam, G.R., Schwartz, R.S., Vitiello, M.V., 2003.** Growth hormone-releasing hormone and growth hormone secretagogues in normal aging. *Endocrine* 22, 41–8.
- Merrill, J.E., 1991.** Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on astrocytes, microglia, oligodendrocytes, and glial precursors in vitro. *Developmental neuroscience* 13, 130–7.
- Mertani, H.C., Zhu, T., Goh, E.L., Lee, K.O., Morel, G., Lobie, P.E., 2001.** Autocrine human growth hormone (hGH) regulation of human mammary carcinoma cell gene expression. Identification of CHOP as a mediator of hGH-stimulated human mammary carcinoma cell survival. *The Journal of biological chemistry* 276, 21464–75.
- Mesco, E.R., Joseph, J.A., Blake, M.J., Roth, G.S., 1991.** Loss of D2 receptors during aging is partially due to decreased levels of mRNA. *Brain research* 545, 355–7.
- Mesulam, M., 2000.** Brain, mind, and the evolution of connectivity. *Brain and cognition* 42, 4–6.
- Meyer, M., Matsuoka, I., Wetmore, C., Olson, L., Thoenen, H., 1992.** Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *The Journal of cell biology* 119, 45–54.
- Miao, Y., Xia, Q., Hou, Z., Zheng, Y., Pan, H., Zhu, S., 2007.** Ghrelin protects cortical neuron against focal ischemia/reperfusion in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 359, 795–800.
- Michael, G.J., Averill, S., Shortland, P.J., Yan, Q., Priestley, J.V., 1999.** Axotomy results in major changes in BDNF expression by dorsal root ganglion cells: BDNF expression in large trkB and trkC cells, in pericellular baskets, and in projections to deep dorsal horn and dorsal column nuclei. *The European journal of neuroscience* 11, 3539–51.
- Micic, D., Popovic, V., Doknic, M., Macut, D., Dieguez, C., Casanueva, F.F., 1998.** Preserved growth hormone (GH) secretion in aged and very old subjects after testing with the combined stimulus GH-releasing hormone plus GH-releasing hexapeptide-6. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 2569–72.
- Milenkovic, L., Rettori, V., Snyder, G.D., Beutler, B., McCann, S.M., 1989.** Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2418–22.

- Miller, D.B., Bartke, A., O'Callaghan, J.P., 1995.** Increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) levels in the brains of transgenic mice expressing the bovine growth hormone (bGH) gene. *Experimental gerontology* 30, 383–400.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kühn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H.P., Bonhoeffer, T., Klein, R., 1999.** Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24, 401–14.
- Miskimins, R., Yu, R.K., 1986.** Developmental expression of myelin basic protein mRNA in a hypermyelinating mouse. *Journal of neuroscience research* 16, 219–25.
- Mitrovic, B., Ignarro, L.J., Vinters, H.V., Akers, M.A., Schmid, I., Uittenbogaart, C., Merrill, J.E., 1995.** Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 65, 531–9.
- Miura, M., Tamura, T., Aoyama, A., Mikoshiba, K., 1989.** The promoter elements of the mouse myelin basic protein gene function efficiently in NG108-15 neuronal/glial cells. *Gene* 75, 31–8.
- Mol, J.A., Henzen-Logmans, S.C., Hageman, P., Misdorp, W., Blankenstein, M.A., Rijnberk, A., 1995.** Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80, 3094–6.
- Moll, N.M., Cossoy, M.B., Fisher, E., Staugaitis, S.M., Tucky, B.H., Rietsch, A.M., Chang, A., Fox, R.J., Trapp, B.D., Ransohoff, R.M., 2009.** Imaging correlates of leukocyte accumulation and CXCR4/CXCL12 in multiple sclerosis. *Archives of neurology* 66, 44–53.
- Monteggia, L.M., Barrot, M., Powell, C.M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R.W., Nestler, E.J., 2004.** Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10827–32.
- Monti, B., Berteotti, C., Contestabile, A., 2005.** Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment. *Hippocampus* 15, 1041–9.
- Montminy, M., 1997.** Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annual review of biochemistry* 66, 807–22.
- Moon, M., Choi, J.G., Nam, D.W., Hong, H.-S., Choi, Y.-J., Oh, M.S., Mook-Jung, I., 2011.** Ghrelin ameliorates cognitive dysfunction and neurodegeneration in intrahippocampal amyloid- β 1-42 oligomer-injected mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 23, 147–59.
- Mora, F., Segovia, G., del Arco, A., 2007.** Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. *Brain research reviews* 55, 78–88.
- Morales, F.R., Boxer, P.A., Fung, S.J., Chase, M.H., 1987.** Basic electrophysiological properties of spinal cord motoneurons during old age in the cat. *Journal of neurophysiology* 58, 180–94.
- Mori, K., Yoshimoto, A., Takaya, K., Hosoda, K., Ariyasu, H., Yahata, K., Mukoyama, M., Sugawara, A., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K., 2000.** Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS letters* 486, 213–6.

- Morisawa, K., Sugisaki, T., Kanamatsu, T., Aoki, T., Noguchi, T., 1989.** Factors contributing to cerebral hypomyelination in the growth hormone-deficient little mouse. *Neurochemical research* 14, 173–7.
- Morley, J.E., Flood, J.F., Perry, H.M., Kumar, V.B., 1997.** Peptides, memory, food intake and aging. *Aging (Milan, Italy)* 9, 17–8.
- Moro, J.A., Carretero, J., Alonso, M.I., Martín, C., Gato, A., Mano, A. de la, 2008.** Prenatal expression of interleukin 1beta and interleukin 6 in the rat pituitary gland. *Cytokine* 44, 315–22.
- Moss, M.B., Rosene, D.L., Peters, A., 1988.** Effects of aging on visual recognition memory in the rhesus monkey. *Neurobiology of aging* 9, 495–502.
- Mouton, P.R., Long, J.M., Lei, D.-L., Howard, V., Jucker, M., Calhoun, M.E., Ingram, D.K., 2002.** Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain research* 956, 30–5.
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., Murphy, R.A., 2001.** Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry* 276, 12660–6.
- Mu, J.S., Li, W.P., Yao, Z.B., Zhou, X.F., 1999.** Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain research* 835, 259–65.
- Muccioli, G., Ghè, C., Ghigo, M.C., Papotti, M., Arvat, E., Boghen, M.F., Nilsson, M.H., Deghenghi, R., Ong, H., Ghigo, E., 1998.** Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *The Journal of endocrinology* 157, 99–106.
- Muccioli, G., Papotti, M., Locatelli, V., Ghigo, E., Deghenghi, R., 2001.** Binding of 125I-labeled ghrelin to membranes from human hypothalamus and pituitary gland. *Journal of endocrinological investigation* 24, RC7–9.
- Muccioli, G., Tschöp, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, M., Ghigo, E., 2002.** Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European journal of pharmacology* 440, 235–54.
- Mujtaba, T., Piper, D.R., Kalyani, A., Groves, A.K., Lucero, M.T., Rao, M.S., 1999.** Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. *Developmental biology* 214, 113–27.
- Murer, M.G., Boissiere, F., Yan, Q., Hunot, S., Villares, J., Faucheux, B., Agid, Y., Hirsch, E., Raisman-Vozari, R., 1999.** An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 88, 1015–32.
- Murer, M.G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R., 2001.** Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 63, 71–124.
- Murialdo, G., Barreca, A., Nobili, F., Rollero, A., Timossi, G., Gianelli, M.V., Copello, F., Rodriguez, G., Polleri, A., 2001.** Relationships between cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate and insulin-like growth factor-I system in dementia. *Journal of endocrinological investigation* 24, 139–46.

- Murphy, L.J., Friesen, H.G., 1988.** Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology* 122, 325–32.
- Murphy, P.G., Borthwick, L.A., Altares, M., Gauldie, J., Kaplan, D., Richardson, P.M., 2000.** Reciprocal actions of interleukin-6 and brain-derived neurotrophic factor on rat and mouse primary sensory neurons. *The European journal of neuroscience* 12, 1891–9.
- Murray, C.A., McGahon, B., McBennett, S., Lynch, M.A., 1997.** Interleukin-1 beta inhibits glutamate release in hippocampus of young, but not aged, rats. *Neurobiology of aging* 18, 343–8.
- Muzyka, V.I., Moks, M.A., 1984.** [Binding of delta-aminolevulinic acid by myelin proteins]. *Biokhimiia (Moscow, Russia)* 49, 1647–9.
- Myers, M.G., Backer, J.M., Sun, X.J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., White, M.F., 1992.** IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10350–4.
- Möller, C., Hansson, A., Enberg, B., Lobie, P.E., Norstedt, G., 1992.** Growth hormone (GH) induction of tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in cells transfected with rat GH receptor cDNA. *The Journal of biological chemistry* 267, 23403–8.
- Müller, E.E., 1987.** Neural control of somatotropic function. *Physiological reviews* 67, 962–1053.
- Müller, E.E., Locatelli, V., Cocchi, D., 1999.** Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological reviews* 79, 511–607.
- Nagaya, N., Kangawa, K., 2003.** Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regulatory peptides* 114, 71–7.
- Nagaya, N., Miyatake, K., Uematsu, M., Oya, H., Shimizu, W., Hosoda, H., Kojima, M., Nakanishi, N., Mori, H., Kangawa, K., 2001.** Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 5854–9.
- Nakajima, T., Fukamizu, A., Takahashi, J., Gage, F.H., Fisher, T., Blenis, J., Montminy, M.R., 1996.** The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* 86, 465–74.
- Nakanishi, H., 2003.** Microglial functions and proteases. *Molecular neurobiology* 27, 163–76.
- Nakao, Y., Otani, H., Yamamura, T., Hattori, R., Osako, M., Imamura, H., 2001.** Insulin-like growth factor 1 prevents neuronal cell death and paraplegia in the rabbit model of spinal cord ischemia. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 122, 136–43.
- Narisawa-Saito, M., Nawa, H., 1996.** Differential regulation of hippocampal neurotrophins during aging in rats. *Journal of neurochemistry* 67, 1124–31.
- Nass, R., Pezzoli, S.S., Oliveri, M.C., Patrie, J.T., Harrell, F.E., Clasey, J.L., Heymsfield, S.B., Bach, M.A., Vance, M.L., Thorner, M.O., 2008.** Effects of an oral ghrelin mimetic on body composition and clinical outcomes in healthy older adults: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 149, 601–11.

- Natsume, H., Tokuda, H., Mizutani, J., Adachi, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Minamitani, C., Kato, K., Kozawa, O., Otsuka, T., 2010.** Synergistic effect of vasoactive intestinal peptides on TNF-alpha-induced IL-6 synthesis in osteoblasts: amplification of p44/p42 MAP kinase activation. *International journal of molecular medicine* 25, 813–7.
- Neary, N.M., Small, C.J., Wren, A.M., Lee, J.L., Druce, M.R., Palmieri, C., Frost, G.S., Ghatei, M.A., Coombes, R.C., Bloom, S.R., 2004.** Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 2832–6.
- Neill, J.D., Frawley, L.S., 1983.** Detection of hormone release from individual cells in mixed populations using a reverse hemolytic plaque assay. *Endocrinology* 112, 1135–7.
- Niall, H.D., Hogan, M.L., Tregear, G.W., Segre, G.V., Hwang, P., Friesen, H., 1973.** The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. *Recent progress in hormone research* 29, 387–416.
- Nicoll, C.S., Mayer, G.L., Russell, S.M., 1986.** Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrine reviews* 7, 169–203.
- Nishiyama, A., Lin, X.H., Giese, N., Heldin, C.H., Stallcup, W.B., 1996.** Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *Journal of neuroscience research* 43, 299–314.
- Noguchi, T., 1996.** Effects of growth hormone on cerebral development: morphological studies. *Hormone research* 45, 5–17.
- Noguchi, T., Sekiguchi, M., Sugisaki, T., Tsukada, Y., Shimai, K., 1983.** Faulty development of cortical neurons in the Snell dwarf cerebrum. *Brain research* 312, 125–38.
- Noguchi, T., Sugiasaki, T., Tsukada, Y., 1985.** Microcephalic cerebrum with hypomyelination in the growth hormone-deficient mouse (lit). *Neurochemical research* 10, 1097–106.
- Noguchi, T., Sugisaki, T., Nishikawa, N., Tsukada, Y., 1988.** Restoration of microcephalic cerebrum with hypomyelination in the growth hormone-deficient mouse (lit): stimulatory effects of GH restricted to the first 20 days of postnatal life. *Neurochemical research* 13, 249–52.
- Noguchi, T., Sugisaki, T., Tsukada, Y., 1982.** Postnatal action of growth and thyroid hormones on the retarded cerebral myelinogenesis of Snell dwarf mice (dw). *Journal of neurochemistry* 38, 257–63.
- Noguchi, T., Sugisaki, T., Watanabe, M., Kohsaka, S., Tsukada, Y., 1982.** Effects of bovine growth hormone on the retarded cerebral development induced by neonatal hydrocortisone intoxication. *Journal of neurochemistry* 38, 246–56.
- Nolan, Y., Maher, F.O., Martin, D.S., Clarke, R.M., Brady, M.T., Bolton, A.E., Mills, K.H.G., Lynch, M.A., 2005.** Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry* 280, 9354–62.
- Norton, W.T., 1981.** Biochemistry of myelin. *Advances in neurology* 31, 93–121.
- Norton, W.T., Poduslo, S.E., 1973.** Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *Journal of neurochemistry* 21, 759–73.
- Notterpek, L., 2003.** Neurotrophins in myelination: a new role for a puzzling receptor. *Trends in neurosciences* 26, 232–4.

- Novikova, L., Novikov, L., Kellerth, J.O., 1996.** Brain-derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats. *Neuroscience letters* 220, 203–6.
- Nyberg, F., 1997.** Aging effects on growth hormone receptor binding in the brain. *Experimental gerontology* 32, 521–8.
- Nyberg, F., 2000.** Growth hormone in the brain: characteristics of specific brain targets for the hormone and their functional significance. *Frontiers in neuroendocrinology* 21, 330–48.
- Nyberg, F., Burman, P., 1996.** Growth hormone and its receptors in the central nervous system--location and functional significance. *Hormone research* 45, 18–22.
- Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tachibana, T., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Yoshikawa, H., Noguchi, K., 2003.** Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase in primary afferent neurons regulates brain-derived neurotrophic factor expression after peripheral inflammation and nerve injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 4117–26.
- Obata-Tsuto, H.L., Okamura, H., Tsuto, T., Terubayashi, H., Fukui, K., Yanaihara, N., Iyata, Y., 1983.** Distribution of the VIP-like immunoreactive neurons in the cat central nervous system. *Brain research bulletin* 10, 653–60.
- Obay, B.D., Tasdemir, E., Tümer, C., Bilgin, H.M., Sermet, A., 2007.** Antiepileptic effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced seizures in rats. *Peptides* 28, 1214–9.
- Obay, B.D., Taşdemir, E., Tümer, C., Bilgin, H.M., Atmaca, M., 2008.** Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides* 29, 448–55.
- Ojeda, S.R., Jameson, H.E., 1977.** Developmental patterns of plasma and pituitary growth hormone (GH) in the female rat. *Endocrinology* 100, 881–9.
- Oka, A., Belliveau, M.J., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., 1993.** Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13, 1441–53.
- Olchovsky, D., Bruno, J.F., Gelato, M.C., Song, J., Berelowitz, M., 1991.** Pituitary insulin-like growth factor-I content and gene expression in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for tissue-specific regulation. *Endocrinology* 128, 923–8.
- Olszewski, P.K., Schiöth, H.B., Levine, A.S., 2008.** Ghrelin in the CNS: from hunger to a rewarding and memorable meal? *Brain research reviews* 58, 160–70.
- Omlin, F.X., Webster, H.D., Palkovits, C.G., Cohen, S.R., 1982.** Immunocytochemical localization of basic protein in major dense line regions of central and peripheral myelin. *The Journal of cell biology* 95, 242–8.
- Ong, W.Y., Garey, L.J., 1991.** Distribution of GABA and neuropeptides in the human cerebral cortex. A light and electron microscopic study. *Anatomy and embryology* 183, 397–413.
- O’Sullivan, M., Jones, D.K., Summers, P.E., Morris, R.G., Williams, S.C., Markus, H.S., 2001.** Evidence for cortical “disconnection” as a mechanism of age-related cognitive decline. *Neurology* 57, 632–8.

- Pacold, S.T., Kirsteins, L., Hojvat, S., Lawrence, A.M., 1978.** Biologically active pituitary hormones in the rat brain amygdaloid nucleus. *Science (New York, N.Y.)* 199, 804–6.
- Paganelli, R., Di Iorio, A., Patricelli, L., Ripani, F., Sparvieri, E., Faricelli, R., Iarlori, C., Porreca, E., Di Gioacchino, M., Abate, G., 2002.** Proinflammatory cytokines in sera of elderly patients with dementia: levels in vascular injury are higher than those of mild-moderate Alzheimer's disease patients. *Experimental gerontology* 37, 257–63.
- Pagani, S., Meazza, C., Travaglino, P., Moretta, A., Bozzola, M., 2005.** Effect of growth hormone therapy on the proinflammatory cytokine profile in growth hormone-deficient children. *European cytokine network* 16, 65–9.
- Pakkenberg, B., Gundersen, H.J., 1997.** Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *The Journal of comparative neurology* 384, 312–20.
- Palacios, N., Sánchez-Franco, F., Fernández, M., Sánchez, I., Cacicedo, L., 2005.** Intracellular events mediating insulin-like growth factor I-induced oligodendrocyte development: modulation by cyclic AMP. *Journal of neurochemistry* 95, 1091–107.
- Pan, W., Yu, Y., Cain, C.M., Nyberg, F., Couraud, P.O., Kastin, A.J., 2005.** Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 146, 4898–904.
- Pang, P.T., Lu, B., 2004.** Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing research reviews* 3, 407–30.
- Paolisso, G., Ammendola, S., Del Buono, A., Gambardella, A., Riondino, M., Tagliamonte, M.R., Rizzo, M.R., Carella, C., Varricchio, M., 1997.** Serum levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 in healthy centenarians: relationship with plasma leptin and lipid concentrations, insulin action, and cognitive function. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 2204–9.
- Papadakis, M.A., Grady, D., Black, D., Tierney, M.J., Gooding, G.A., Schambelan, M., Grunfeld, C., 1996.** Growth hormone replacement in healthy older men improves body composition but not functional ability. *Annals of internal medicine* 124, 708–16.
- Papadakis, M.A., Grady, D., Tierney, M.J., Black, D., Wells, L., Grunfeld, C., 1995.** Insulin-like growth factor 1 and functional status in healthy older men. *Journal of the American Geriatrics Society* 43, 1350–5.
- Park, S.-E., Lawson, M., Dantzer, R., Kelley, K.W., McCusker, R.H., 2011.** Insulin-like growth factor-I peptides act centrally to decrease depression-like behavior of mice treated intraperitoneally with lipopolysaccharide. *Journal of neuroinflammation* 8, 179.
- Parnet, P., Kelley, K.W., Bluthé, R.M., Dantzer, R., 2002.** Expression and regulation of interleukin-1 receptors in the brain. Role in cytokines-induced sickness behavior. *Journal of neuroimmunology* 125, 5–14.
- Passemard, S., Sokolowska, P., Schwendimann, L., Gressens, P., 2011.** VIP-induced neuroprotection of the developing brain. *Current pharmaceutical design* 17, 1036–9.
- Pasteels, J.L., Gausset, P., Danguy, A., Ectors, P., Nicoll, C.S., Varavudhi, P., 1972.** Morphology of the lactotropes and somatotropes of man and rhesus monkeys. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 34, 959–67.

- Patchett, A.A., Nargund, R.P., Tata, J.R., Chen, M.H., Barakat, K.J., Johnston, D.B., Cheng, K., Chan, W.W., Butler, B., Hickey, G., 1995.** Design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent, orally active growth hormone secretagogue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7001–5.
- Patel, J.R., McCandless, E.E., Dorsey, D., Klein, R.S., 2010.** CXCR4 promotes differentiation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11062–7.
- Pawelzik, H., Dodt, H.U., Ziegglänsberger, W., 1992.** Actions of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on neocortical neurons of the rat in vitro. *Neuroscience letters* 147, 167–70.
- Pañeda, C., Arroba, A.I., Frago, L.M., Holm, A.M., Rømer, J., Argente, J., Chowen, J.A., 2003.** Growth hormone-releasing peptide-6 inhibits cerebellar cell death in aged rats. *Neuroreport* 14, 1633–5.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153–83.
- Pellegrini, G., Magistretti, P.J., Martin, J.L., 1998.** VIP and PACAP potentiate the action of glutamate on BDNF expression in mouse cortical neurones. *The European journal of neuroscience* 10, 272–80.
- Pelton, E.W., Grindeland, R.E., Young, E., Bass, N.H., 1977.** Effects of immunologically induced growth hormone deficiency on myelinogenesis in developing rat cerebrum. *Neurology* 27, 282–8.
- Pelton E.W., Young E., Bass N.H., Grindeland R.E., 1974.** Defective myelinogenesis in developing rat cerebrum induced by selective growth hormone deficiency. *Neurology* 24, 3777–3781.
- Pende, M., Fisher, T.L., Simpson, P.B., Russell, J.T., Blenis, J., Gallo, V., 1997.** Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 1291–301.
- Persson, E., Voznesensky, O.S., Huang, Y.-F., Lerner, U.H., 2005.** Increased expression of interleukin-6 by vasoactive intestinal peptide is associated with regulation of CREB, AP-1 and C/EBP, but not NF-kappaB, in mouse calvarial osteoblasts. *Bone* 37, 513–29.
- Peters, A., 1996.** Age-related changes in oligodendrocytes in monkey cerebral cortex. *The Journal of comparative neurology* 371, 153–63.
- Peters, A., Josephson, K., Vincent, S.L., 1991.** Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the rhesus monkey cerebral cortex. *The Anatomical record* 229, 384–98.
- Peters, A., Moss, M.B., Sethares, C., 2000.** Effects of aging on myelinated nerve fibers in monkey primary visual cortex. *The Journal of comparative neurology* 419, 364–76.
- Peters, A., Sethares, C., 2002.** Aging and the myelinated fibers in prefrontal cortex and corpus callosum of the monkey. *The Journal of comparative neurology* 442, 277–91.

- Peterson, P.K., Chao, C.C., Carson, P., Hu, S., Nichol, K., Janoff, E.N., 1994.** Levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, interleukin 10, and transforming growth factor beta are normal in the serum of the healthy elderly. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 19, 1158–9.
- Pezet, S., Malcangio, M., McMahon, S.B., 2002.** BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain research. Brain research reviews* 40, 240–9.
- Pickering, M., O'Connor, J.J., 2007.** Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Progress in brain research* 163, 339–54.
- Piehl, F., Frisé, J., Risling, M., Hökfelt, T., Cullheim, S., 1994.** Increased trkB mRNA expression by axotomized motoneurons. *Neuroreport* 5, 697–700.
- Pilzer, I., Gozes, I., 2006.** VIP provides cellular protection through a specific splice variant of the PACAP receptor: a new neuroprotection target. *Peptides* 27, 2867–76.
- Pong S-S., C.L.-Y., Leonard R.J., 1993.** The involvement of ions in the activity of a novel growth hormone secretagogue L-692,429 in rat pituitary cell culture. , in: *Proceedings of the 75th Annual Meeting of The Endocrine Society. Las Vegas, NV, p. Abstract 487.*
- Pong S-S., C.L.-Y., Smith R.G., Ertel E.A., Smith M.M., Cohen C.J., 1992.** Role of calcium channels in growth hormone secretion induced by GHRP-6 (His-D-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) and other secretagogues in rat somatotrops., in: *Proceedings of the 74th Annual Meeting of The Endocrine Society. San Antonio, TX, p. Abstract 255.*
- Poo, M.M., 2001.** Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 24–32.
- Popovic, V., Damjanovic, S., Micic, D., Djurovic, M., Dieguez, C., Casanueva, F.F., 1995.** Blocked growth hormone-releasing peptide (GHRP-6)-induced GH secretion and absence of the synergic action of GHRP-6 plus GH-releasing hormone in patients with hypothalamopituitary disconnection: evidence that GHRP-6 main action is exerted at the hypothala. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80, 942–7.
- Porte, Y., Buhot, M.-C., Mons, N., 2008.** Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. *Neurobiology of aging* 29, 1533–46.
- Postel-Vinay, M.C., Finidori, J., 1995.** Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 133, 654–9.
- Pozo, D., Delgado, M., Martínez, M., Guerrero, J.M., Leceta, J., Gomariz, R.P., Calvo, J.R., 2000.** Immunobiology of vasoactive intestinal peptide (VIP). *Immunology today* 21, 7–11.
- Probert, L., Akassoglou, K., Pasparakis, M., Kontogeorgos, G., Kollias, G., 1995.** Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11294–8.
- Pujol, F., Kitabgi, P., Boudin, H., 2005.** The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *Journal of cell science* 118, 1071–80.
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., Temple, S., 2000.** Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69–80.

- Qiao, L.-Y., Gulick, M.A., Bowers, J., Kuemmerle, J.F., Grider, J.R., 2008.** Differential changes in brain-derived neurotrophic factor and extracellular signal-regulated kinase in rat primary afferent pathways with colitis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 20, 928–38.
- Raff, M.C., Miller, R.H., Noble, M., 1983.** A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303, 390–6.
- Rage, F., Silhol, M., Binamé, F., Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., 2007.** Effect of aging on the expression of BDNF and TrkB isoforms in rat pituitary. *Neurobiology of aging* 28, 1088–98.
- Rage, F., Silhol, M., Tapia-Arancibia, L., 2006.** IL-1beta regulation of BDNF expression in rat cultured hypothalamic neurons depends on the presence of glial cells. *Neurochemistry international* 49, 433–41.
- Rahim, A., Shalet, S.M., 1998.** Does desensitization to hexarelin occur? *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 8 Suppl B, 141–3.
- Raible, D.W., McMorris, F.A., 1989.** Cyclic AMP regulates the rate of differentiation of oligodendrocytes without changing the lineage commitment of their progenitors. *Developmental biology* 133, 437–46.
- Ramsey, M.M., Weiner, J.L., Moore, T.P., Carter, C.S., Sonntag, W.E., 2004.** Growth hormone treatment attenuates age-related changes in hippocampal short-term plasticity and spatial learning. *Neuroscience* 129, 119–27.
- Rangon, C.-M., Goursaud, S., Medja, F., Lelièvre, V., Mounien, L., Husson, I., Brabet, P., Jégou, S., Janet, T., Gressens, P., 2005.** VPAC2 receptors mediate vasoactive intestinal peptide-induced neuroprotection against neonatal excitotoxic brain lesions in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314, 745–52.
- Rao, M.S., 1999.** Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *The Anatomical record* 257, 137–48.
- Rapp, P.R., Amaral, D.G., 1989.** Evidence for task-dependent memory dysfunction in the aged monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 9, 3568–76.
- Rayan, G.M., Johnson, C., Pitha, J., Cahill, S., Said, S., 1995.** Vasoactive intestinal peptide and nerve growth factor effects on nerve regeneration. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association* 88, 337–41.
- Rayan, G.M., Said, S.I., Cahill, S.L., Duke, J., 1991.** Vasoactive intestinal peptide and nerve regeneration. *Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland)* 16, 515–8.
- Redwine, J.M., Armstrong, R.C., 1998.** In vivo proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFalphaR during early remyelination. *Journal of neurobiology* 37, 413–28.
- Reichardt, L.F., 2006.** Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361, 1545–64.
- Reinhardt, R.R., Bondy, C.A., 1994.** Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* 135, 1753–61.

- Ren, K., Torres, R., 2009.** Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain research reviews* 60, 57–64.
- Renner, U., Newton, C.J., Pagotto, U., Sauer, J., Arzt, E., Stalla, G.K., 1995.** Involvement of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in rat pituitary cell growth regulation. *Endocrinology* 136, 3186–93.
- Rex, C.S., Kramár, E.A., Colgin, L.L., Lin, B., Gall, C.M., Lynch, G., 2005.** Long-term potentiation is impaired in middle-aged rats: regional specificity and reversal by adenosine receptor antagonists. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 5956–66.
- Rex, C.S., Lauterborn, J.C., Lin, C.-Y., Kramár, E.A., Rogers, G.A., Gall, C.M., Lynch, G., 2006.** Restoration of long-term potentiation in middle-aged hippocampus after induction of brain-derived neurotrophic factor. *Journal of neurophysiology* 96, 677–85.
- Reynolds, R., Wilkin, G.P., 1991.** Oligodendroglial progenitor cells but not oligodendroglia divide during normal development of the rat cerebellum. *Journal of neurocytology* 20, 216–24.
- Reynolds, R., Wilkin, G.P., 1993.** Cellular reaction to an acute demyelinating/remyelinating lesion of the rat brain stem: localisation of GD3 ganglioside immunoreactivity. *Journal of neuroscience research* 36, 405–22.
- Rieutort, M., 1974.** Pituitary content and plasma levels of growth hormone in foetal and weanling rats. *The Journal of endocrinology* 60, 261–8.
- Rieutort, M., 1981.** Ontogenetic development of the inhibition of growth hormone release by somatostatin in the rat: in-vivo and in-vitro (perifusion) study. *The Journal of endocrinology* 89, 355–63.
- Rigamonti, A.E., Pincelli, A.I., Corrà, B., Viarengo, R., Bonomo, S.M., Galimberti, D., Scacchi, M., Scarpini, E., Cavagnini, F., Müller, E.E., 2002.** Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *The Journal of endocrinology* 175, R1–5.
- Rivera, V.M., Miranti, C.K., Misra, R.P., Ginty, D.D., Chen, R.H., Blenis, J., Greenberg, M.E., 1993.** A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Molecular and cellular biology* 13, 6260–73.
- Roher, A.E., Weiss, N., Kokjohn, T.A., Kuo, Y.-M., Kalback, W., Anthony, J., Watson, D., Luehrs, D.C., Sue, L., Walker, D., Emmerling, M., Goux, W., Beach, T., 2002.** Increased A beta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 41, 11080–90.
- Rollero, A., Murialdo, G., Fonzi, S., Garrone, S., Gianelli, M.V., Gazzero, E., Barreca, A., Polleri, A., 1998.** Relationship between cognitive function, growth hormone and insulin-like growth factor I plasma levels in aged subjects. *Neuropsychobiology* 38, 73–9.
- Romijn, H.J., van Uum, J.F., Emmering, J., Goncharuk, V., Buijs, R.M., 1999.** Colocalization of VIP with AVP in neurons of the human paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nucleus. *Brain research* 832, 47–53.
- Rosczyk, H.A., Sparkman, N.L., Johnson, R.W., 2008.** Neuroinflammation and cognitive function in aged mice following minor surgery. *Experimental gerontology* 43, 840–6.

- Rosenfeld, R.G., Bengtsson, B.A., 1994.** Effects of growth hormone and insulin-like growth factors on the central nervous system. *Acta paediatrica* (Oslo, Norway : 1992). Supplement 406, 89–91.
- Rosenfeld, R.G., Rosenbloom, A.L., Guevara-Aguirre, J., 1994.** Growth hormone (GH) insensitivity due to primary GH receptor deficiency. *Endocrine reviews* 15, 369–90.
- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A., 2003.** Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in neurobiology* 69, 143–79.
- Roth, G.S., Ingram, D.K., Joseph, J.A., 1984.** Delayed loss of striatal dopamine receptors during aging of dietarily restricted rats. *Brain research* 300, 27–32.
- Rowitch, D.H., 2004.** Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nature reviews. Neuroscience* 5, 409–19.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbamalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li, W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P.G., 1992.** Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689–92.
- Rudman, D., 1985.** Growth hormone, body composition, and aging. *Journal of the American Geriatrics Society* 33, 800–7.
- 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 growth hormone in men over 60 years old. *The New England journal of medicine* 323, 1–6.
- Rudman, D., Kutner, M.H., Rogers, C.M., Lubin, M.F., Fleming, G.A., Bain, R.P., 1981.** Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *The Journal of clinical investigation* 67, 1361–9.
- Russell, J.W., Windebank, A.J., Schenone, A., Feldman, E.L., 1998.** Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *Journal of neurobiology* 36, 455–67.
- Russell-Aulet, M., Dimaraki, E.V., Jaffe, C.A., DeMott-Friberg, R., Barkan, A.L., 2001.** Aging-related growth hormone (GH) decrease is a selective hypothalamic GH-releasing hormone pulse amplitude mediated phenomenon. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 56, M124–9.
- Russo, S.J., Mazei-Robison, M.S., Ales, J.L., Nestler, E.J., 2009.** Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 73–82.
- Saarelainen, T., Lukkarinen, J.A., Koponen, S., Gröhn, O.H., Jolkkonen, J., Koponen, E., Haapasalo, A., Alhonen, L., Wong, G., Koistinaho, J., Kauppinen, R.A., Castrén, E., 2000.** Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Molecular and cellular neurosciences* 16, 87–96.
- Saarelainen, T., Pussinen, R., Koponen, E., Alhonen, L., Wong, G., Sirviö, J., Castrén, E., 2000.** Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP. *Synapse (New York, N.Y.)* 38, 102–4.

- Said, S.I., Mutt, V., 1970.** Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science (New York, N.Y.)* 169, 1217–8.
- Salomon, F., Cuneo, R.C., Hesp, R., Sönksen, P.H., 1989.** The effects of treatment with recombinant human growth hormone on body composition and metabolism in adults with growth hormone deficiency. *The New England journal of medicine* 321, 1797–803.
- Sandell, J.H., Peters, A., 2002.** Effects of age on the glial cells in the rhesus monkey optic nerve. *The Journal of comparative neurology* 445, 13–28.
- Sanders, E.J., Harvey, S., 2004.** Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. *Anatomy and embryology* 209, 1–9.
- Sandhir, R., Puri, V., Klein, R.M., Berman, N.E.J., 2004.** Differential expression of cytokines and chemokines during secondary neuron death following brain injury in old and young mice. *Neuroscience letters* 369, 28–32.
- Sarter, M., Bodewitz, G., Stephens, D.N., 1988.** Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology* 94, 491–5.
- Sartorio, A., Conti, A., Molinari, E., Riva, G., Morabito, F., Faglia, G., 1996.** Growth, growth hormone and cognitive functions. *Hormone research* 45, 23–9.
- Sato, M., Frohman, L.A., 1993.** Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133, 793–9.
- Sato-Bigbee, C., Chan, E.L., Yu, R.K., 1994.** Oligodendroglial cyclic AMP response element-binding protein: a member of the CREB family of transcription factors. *Journal of neuroscience research* 38, 621–8.
- Sato-Bigbee, C., DeVries, G.H., 1996.** Treatment of oligodendrocytes with antisense deoxyoligonucleotide directed against CREB mRNA: effect on the cyclic AMP-dependent induction of myelin basic protein expression. *Journal of neuroscience research* 46, 98–107.
- Sato-Bigbee, C., Pal, S., Chu, A.K., 1999.** Different neuroligands and signal transduction pathways stimulate CREB phosphorylation at specific developmental stages along oligodendrocyte differentiation. *Journal of neurochemistry* 72, 139–47.
- Sato-Bigbee, C., Yu, R.K., 1993.** Presence of cyclic AMP response element-binding protein in oligodendrocytes. *Journal of neurochemistry* 60, 2106–10.
- Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T., 1999.** Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *Journal of neurochemistry* 72, 1466–71.
- Scarborough, D.E., 1990.** Cytokine modulation of pituitary hormone secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 594, 169–87.
- Schaaf, M.J., Workel, J.O., Lesscher, H.M., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., de Kloet, E.R., 2001.** Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain research* 915, 227–33.

- Scheepens, A., Sirimanne, E., Beilharz, E., Breier, B.H., Waters, M.J., Gluckman, P.D., Williams, C.E., 1999.** Alterations in the neural growth hormone axis following hypoxic-ischemic brain injury. *Brain research. Molecular brain research* 68, 88–100.
- Scheepens, A., Sirimanne, E.S., Breier, B.H., Clark, R.G., Gluckman, P.D., Williams, C.E., 2001.** Growth hormone as a neuronal rescue factor during recovery from CNS injury. *Neuroscience* 104, 677–87.
- Scheepens, A., Williams, C.E., Breier, B.H., Guan, J., Gluckman, P.D., 2000.** A role for the somatotrophic axis in neural development, injury and disease. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 13 Suppl 6, 1483–91.
- Schini, V.B., Catovsky, S., Schray-Utz, B., Busse, R., Vanhoutte, P.M., 1994.** Insulin-like growth factor I inhibits induction of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 74, 24–32.
- Schneider-Rivas, S., Paredes-Carbajal, C., Mascher, D., Angoa-Pérez, M., Jaramillo-González, E., Borgonio-Pérez, G., Rivas-Arancibia, S., 2007.** Effects of testosterone and growth hormone on long-term retention and extinction of a passive avoidance response in young and aged rats. *The International journal of neuroscience* 117, 1443–56.
- Schneider-Rivas, S., Rivas-Arancibia, S., Vázquez-Pereyra, F., Vázquez-Sandoval, R., Borgonio-Pérez, G., 1995.** Modulation of long-term memory and extinction responses induced by growth hormone (GH) and growth hormone releasing hormone (GHRH) in rats. *Life sciences* 56, PL433–41.
- Schuman, E.M., 1999.** Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Current opinion in neurobiology* 9, 105–9.
- Schwab, C., McGeer, P.L., 2002.** Complement activated C4d immunoreactive oligodendrocytes delineate small cortical plaques in multiple sclerosis. *Experimental neurology* 174, 81–8.
- Schwab, M.E., Schnell, L., 1989.** Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *Journal of neurocytology* 18, 161–9.
- Schwander, J.C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E.R., 1983.** Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113, 297–305.
- Schwartz, J., 2000.** Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine reviews* 21, 488–513.
- Schwartz, M., Moalem, G., Leibowitz-Amit, R., Cohen, I.R., 1999.** Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends in neurosciences* 22, 295–9.
- Schäfers, M., Sorkin, L., 2008.** Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neuroscience letters* 437, 188–93.
- Seger, R., Krebs, E.G., 1995.** The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 726–35.
- Selmaj, K., Cross, A.H., Farooq, M., Brosnan, C.F., Raine, C.S., 1991.** Non-specific oligodendrocyte cytotoxicity mediated by soluble products of activated T cell lines. *Journal of neuroimmunology* 35, 261–71.

- Selmaj, K., Raine, C.S., Farooq, M., Norton, W.T., Brosnan, C.F., 1991.** Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 147, 1522–9.
- Selmaj, K.W., Farooq, M., Norton, W.T., Raine, C.S., Brosnan, C.F., 1990.** Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines. A primary role for tumor necrosis factor. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 144, 129–35.
- Selmaj, K.W., Raine, C.S., 1988.** Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Annals of neurology* 23, 339–46.
- Sempowski, G.D., Hale, L.P., Sundy, J.S., Massey, J.M., Koup, R.A., Douek, D.C., Patel, D.D., Haynes, B.F., 2000.** Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 164, 2180–7.
- Seoane, L.M., Tovar, S., Baldelli, R., Arvat, E., Ghigo, E., Casanueva, F.F., Dieguez, C., 2000.** Ghrelin elicits a marked stimulatory effect on GH secretion in freely-moving rats. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 143, R7–9.
- Servoss, S.J., Lee, S.J., Gibney, G., Gozes, I., Breneman, D.E., Hill, J.M., 2001.** IGF-I as a mediator of VIP/activity-dependent neurotrophic factor-stimulated embryonic growth. *Endocrinology* 142, 3348–53.
- Settembrini, B., Figueroa, J., Gallardo, M., Chiochio, S., 1998.** Growth Hormone (GH) but not IGF-I-Secretion is Stimulated in Aged Rats by Chronic Hexarelin and GHRP-6 administration. *Endocrine regulations* 32, 17–26.
- Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1999.** CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry* 68, 821–61.
- Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E., 1991.** CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* (New York, N.Y.) 252, 1427–30.
- Shepherd, P.R., Withers, D.J., Siddle, K., 1998.** Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *The Biochemical journal* 333 (Pt 3, 471–90.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T., Ghosh, A., 1998.** Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20, 727–40.
- Shields, S.A., Gilson, J.M., Blakemore, W.F., Franklin, R.J., 1999.** Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia* 28, 77–83.
- Shin, D.H., Lee, E., Kim, J.-W., Kwon, B.-S., Jung, M.K., Jee, Y.H., Kim, J., Bae, S., Chang, Y.P., 2004.** Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neuroscience letters* 354, 64–8.
- Shoba, L., An, M.R., Frank, S.J., Lowe, W.L., 1999.** Developmental regulation of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor gene expression. *Molecular and cellular endocrinology* 152, 125–36.
- Sierra, A., Gottfried-Blackmore, A.C., McEwen, B.S., Bulloch, K., 2007.** Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55, 412–24.

- Silberstein, F.C., De Simone, R., Levi, G., Aloisi, F., 1996.** Cytokine-regulated expression of platelet-derived growth factor gene and protein in cultured human astrocytes. *Journal of neurochemistry* 66, 1409–17.
- Silhol, M., Bonnichon, V., Rage, F., Tapia-Arancibia, L., 2005.** Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132, 613–24.
- Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S., 1998.** CREB and memory. *Annual review of neuroscience* 21, 127–48.
- Sim, F.J., Hinks, G.L., Franklin, R.J., 2000.** The re-expression of the homeodomain transcription factor Gtx during remyelination of experimentally induced demyelinating lesions in young and old rat brain. *Neuroscience* 100, 131–9.
- Sims, K.B., Hoffman, D.L., Said, S.I., Zimmerman, E.A., 1980.** Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain research* 186, 165–83.
- Skoff, R.P., Price, D.L., Stocks, A., 1976.** Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. I. Cell proliferation. *The Journal of comparative neurology* 169, 291–312.
- Sloane, J.A., Hinman, J.D., Lubonia, M., Hollander, W., Abraham, C.R., 2003.** Age-dependent myelin degeneration and proteolysis of oligodendrocyte proteins is associated with the activation of calpain-1 in the rhesus monkey. *Journal of neurochemistry* 84, 157–68.
- Sloane, J.A., Hollander, W., Moss, M.B., Rosene, D.L., Abraham, C.R., 1999.** Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiology of aging* 20, 395–405.
- Sloane, J.A., Hollander, W., Rosene, D.L., Moss, M.B., Kemper, T., Abraham, C.R., 2000.** Astrocytic hypertrophy and altered GFAP degradation with age in subcortical white matter of the rhesus monkey. *Brain research* 862, 1–10.
- Smit L.S., M.D.J., Argentsinger L.S., Schwartz J., Carter-Su C., 1999.** Molecular events in growth hormone-receptor interaction and signaling., *Hand. Handbook of Physiology (Vol. V)*.
- Smith, M.A., Makino, S., Kim, S.Y., Kvetnansky, R., 1995.** Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136, 3743–50.
- Smith, R.G., 2005.** Development of growth hormone secretagogues. *Endocrine reviews* 26, 346–60.
- Smith, R.G., Pong, S.S., Hickey, G., Jacks, T., Cheng, K., Leonard, R., Cohen, C.J., Arena, J.P., Chang, C.H., Drisko, J., Wyvratt, M., Fisher, M., Nargund, R., Patchett, A., 1996.** Modulation of pulsatile GH release through a novel receptor in hypothalamus and pituitary gland. *Recent progress in hormone research* 51, 261–85; discussion 285–6.
- Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Feighner, S.D., Cheng, K., Hickey, G.J., Wyvratt, M.J., Fisher, M.H., Nargund, R.P., Patchett, A.A., 1997.** Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocrine reviews* 18, 621–45.
- Sonntag, W.E., Gottschall, P.E., Meites, J., 1986.** Increased secretion of somatostatin-28 from hypothalamic neurons of aged rats in vitro. *Brain research* 380, 229–34.

- Sonntag, W.E., Lenham, J.E., Ingram, R.L., 1992.** Effects of aging and dietary restriction on tissue protein synthesis: relationship to plasma insulin-like growth factor-1. *Journal of gerontology* 47, B159–63.
- Sonntag, W.E., Lynch, C., Thornton, P., Khan, A., Bennett, S., Ingram, R., 2000.** The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain ageing. *Journal of anatomy* 197 Pt 4, 575–85.
- Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Bennett, S.A., Khan, A.S., Thornton, P.L., Cooney, P.T., Ingram, R.L., McShane, T., Brunso-Bechtold, J.K., 1999.** Alterations in insulin-like growth factor-1 gene and protein expression and type 1 insulin-like growth factor receptors in the brains of ageing rats. *Neuroscience* 88, 269–79.
- Sonntag, W.E., Lynch, C.D., Cooney, P.T., Hutchins, P.M., 1997.** Decreases in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 138, 3515–20.
- Sonntag, W.E., Ramsey, M., Carter, C.S., 2005.** Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing research reviews* 4, 195–212.
- Sonntag, W.E., Steger, R.W., Forman, L.J., Meites, J., 1980.** Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* 107, 1875–9.
- Sorg, O., Magistretti, P.J., 1992.** Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 4923–31.
- Soto, J.L., Castrillo, J.L., Dominguez, F., Dieguez, C., 1995.** Regulation of the pituitary-specific transcription factor GHF-1/Pit-1 messenger ribonucleic acid levels by growth hormone-secretagogues in rat anterior pituitary cells in monolayer culture. *Endocrinology* 136, 3863–70.
- Souza, S.C., Frick, G.P., Yip, R., Lobo, R.B., Tai, L.R., Goodman, H.M., 1994.** Growth hormone stimulates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *The Journal of biological chemistry* 269, 30085–8.
- Spangelo, B.L., Judd, A.M., MacLeod, R.M., Goodman, D.W., Isakson, P.C., 1990.** Endotoxin-induced release of interleukin-6 from rat medial basal hypothalami. *Endocrinology* 127, 1779–85.
- Spies, M., Nestic, O., Barrow, R.E., Perez-Polo, J.R., Herndon, D.N., 2001.** Liposomal IGF-1 gene transfer modulates pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA expression in the burn wound. *Gene therapy* 8, 1409–15.
- Spitznagel, M.B., Benitez, A., Updegraff, J., Potter, V., Alexander, T., Glickman, E., Gunstad, J., 2010.** Serum ghrelin is inversely associated with cognitive function in a sample of non-demented elderly. *Psychiatry and clinical neurosciences* 64, 608–11.
- Spong, C.Y., Lee, S.J., McCune, S.K., Gibney, G., Abebe, D.T., Alvero, R., Breneman, D.E., Hill, J.M., 1999.** Maternal regulation of embryonic growth: the role of vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 140, 917–24.
- Stepień, H., Zerek-Melen, G., Mucha, S., Winczyk, K., Fryczak, J., 1994.** Interleukin-1 beta stimulates cell proliferation in the intermediate lobe of the rat pituitary gland. *The Journal of endocrinology* 140, 337–41.

- Sternberger, N.H., Itoyama, Y., Kies, M.W., Webster, H.D., 1978.** Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 2521–4.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., Hawkins, P.T., 1997.** Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science (New York, N.Y.)* 277, 567–70.
- Strle, K., Zhou, J.H., Shen, W.H., Broussard, S.R., Johnson, R.W., Freund, G.G., Dantzer, R., Kelley, K.W., 2001.** Interleukin-10 in the brain. *Critical reviews in immunology* 21, 427–49.
- Strosser, M.T., Mialhe, P., 1975.** Growth hormone secretion in the rat as a function of age. *Hormone and metabolic research .Hormon- und Stoffwechselforschung. Hormones et métabolisme* 7, 275–8.
- Stumm, R.K., Zhou, C., Ara, T., Lazarini, F., Dubois-Dalcq, M., Nagasawa, T., Höllt, V., Schulz, S., 2003.** CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 5123–30.
- Sturm, K., MacIntosh, C.G., Parker, B.A., Wishart, J., Horowitz, M., Chapman, I.M., 2003.** Appetite, food intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88, 3747–55.
- Sugisaki, T., Noguchi, T., Tsukada, Y., 1985.** Cerebral myelinogenesis in the Snell dwarf mouse: stimulatory effects of GH and T4 restricted to the first 20 days of postnatal life. *Neurochemical research* 10, 767–78.
- Sugiyama, I., Tanaka, K., Akita, M., Yoshida, K., Kawase, T., Asou, H., 2002.** Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old-rats. *Journal of neuroscience research* 70, 309–17.
- Sun, L.Y., Al-Regaiey, K., Masternak, M.M., Wang, J., Bartke, A., 2005.** Local expression of GH and IGF-1 in the hippocampus of GH-deficient long-lived mice. *Neurobiology of aging* 26, 929–37.
- Sun, Q.-Q., Prince, D.A., Huguenard, J.R., 2003.** Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activate hyperpolarization-activated cationic current and depolarize thalamocortical neurons in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 2751–8.
- Sun, W., Hong, J., Zang, Y.C.Q., Liu, X., Zhang, J.Z., 2006.** Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. *International immunology* 18, 1691–700.
- Sun, Y., Garcia, J.M., Smith, R.G., 2007.** Ghrelin and growth hormone secretagogue receptor expression in mice during aging. *Endocrinology* 148, 1323–9.
- Sánchez-Muñoz, I., Sánchez-Franco, F., Vallejo, M., Fernández, A., Palacios, N., Fernández, M., Cacicedo, L., 2010.** Activity-dependent somatostatin gene expression is regulated by cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺-calmodulin kinase pathways. *Journal of neuroscience research* 88, 825–36.
- Taaffe, D.R., Jin, I.H., Vu, T.H., Hoffman, A.R., Marcus, R., 1996.** Lack of effect of recombinant human growth hormone (GH) on muscle morphology and GH-insulin-like growth

factor expression in resistance-trained elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 421–5.

Taaffe, D.R., Pruitt, L., Reim, J., Hintz, R.L., Butterfield, G., Hoffman, A.R., Marcus, R., 1994. Effect of recombinant human growth hormone on the muscle strength response to resistance exercise in elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 79, 1361–6.

Taaffe, D.R., Thompson, J.L., Butterfield, G.E., Hoffman, A.R., Marcus, R., 2001. Recombinant human growth hormone, but not insulin-like growth factor-I, enhances central fat loss in postmenopausal women undergoing a diet and exercise program. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 33, 156–62.

Taishi, P., Churchill, L., De, A., Obal, F., Krueger, J.M., 2008. Cytokine mRNA induction by interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Brain research* 1226, 89–98.

Takadera, T., Matsuda, I., Ohyashiki, T., 1999. Apoptotic cell death and caspase-3 activation induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and their prevention by insulin-like growth factor I. *Journal of neurochemistry* 73, 548–56.

Takahashi, S., Gottschall, P.E., Quigley, K.L., Goya, R.G., Meites, J., 1987. Growth hormone secretory patterns in young, middle-aged and old female rats. *Neuroendocrinology* 46, 137–42.

Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K., 2000. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85, 4908–11.

Tamura, H., Kamegai, J., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., Oikawa, S., 2002. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* 143, 3268–75.

Tamura, T., Miura, M., Ikenaka, K., Mikoshiba, K., 1988. Analysis of transcription control elements of the mouse myelin basic protein gene in HeLa cell extracts: demonstration of a strong NFI-binding motif in the upstream region. *Nucleic acids research* 16, 11441–59.

Tang, Y., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J., 1997. Age-induced white matter changes in the human brain: a stereological investigation. *Neurobiology of aging* 18, 609–15.

Taniuchi, M., Clark, H.B., Johnson, E.M., 1986. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4094–8.

Taniuchi, M., Clark, H.B., Schweitzer, J.B., Johnson, E.M., 1988. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrastructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8, 664–81.

Tannenbaum, G.S., Bowers, C.Y., 2001. Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin. *Endocrine* 14, 21–7.

Tannenbaum, G.S., Epelbaum, J., Bowers, C.Y., 2003. Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. *Endocrinology* 144, 967–74.

- Tannenbaum, G.S., Martin, J.B., 1976.** Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98, 562–70.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E., 1998.** Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20, 709–26.
- Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., Arancibia, S., 2004.** Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Frontiers in neuroendocrinology* 25, 77–107.
- Tarsa, L., Bałkowiec-Iskra, E., Kratochvil, F.J., Jenkins, V.K., McLean, A., Brown, A.L., Smith, J.A., Baumgartner, J.C., Balkowiec, A., 2010.** Tooth pulp inflammation increases brain-derived neurotrophic factor expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 167, 1205–15.
- Taub, D.D., 2008.** Novel connections between the neuroendocrine and immune systems: the ghrelin immunoregulatory network. *Vitamins and hormones* 77, 325–46.
- Taub, D.D., Longo, D.L., 2005.** Insights into thymic aging and regeneration. *Immunological reviews* 205, 72–93.
- Taub, D.D., Murphy, W.J., Longo, D.L., 2010.** Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. *Current opinion in pharmacology* 10, 408–24.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., Ihle, J.N., 1998.** Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841–50.
- Temple, S., Qian, X., 1996.** Vertebrate neural progenitor cells: subtypes and regulation. *Current opinion in neurobiology* 6, 11–7.
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M.L., González, L.C., Gaytán, F., Zhang, F.-P., Caminos, J.E., Pinilla, L., Casanueva, F.F., Diéguez, C., Aguilar, E., 2002.** Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143, 717–25.
- Terao, A., Apte-Deshpande, A., Dousman, L., Morairty, S., Eynon, B.P., Kilduff, T.S., Freund, Y.R., 2002.** Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *Journal of neuroimmunology* 132, 99–112.
- Theil, M.-M., Miyake, S., Mizuno, M., Tomi, C., Croxford, J.L., Hosoda, H., Theil, J., von Hörsten, S., Yokote, H., Chiba, A., Lin, Y., Oki, S., Akamizu, T., Kangawa, K., Yamamura, T., 2009.** Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 183, 2859–66.
- Thompson, N.M., Davies, J.S., Mode, A., Houston, P.A., Wells, T., 2003.** Pattern-dependent suppression of growth hormone (GH) pulsatility by ghrelin and GH-releasing peptide-6 in moderately GH-deficient rats. *Endocrinology* 144, 4859–67.
- Tian, C., Ye, F., Xu, T., Wang, S., Wang, X., Wang, H., Wan, F., Lei, T., 2010.** GHRP-6 induces CREB phosphorylation and growth hormone secretion via a protein kinase Csigma-dependent pathway in GH3 cells. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban* 30, 183–7.

- Tolle, V., Zizzari, P., Tomasetto, C., Rio, M.C., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T., 2001.** In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 73, 54–61.
- Tolman, E., 1925.** Purpose and cognition: the determiners of animal learning. *Psychol Rev* 32, 285–297.
- Tolwani, R.J., Cosgaya, J.M., Varma, S., Jacob, R., Kuo, L.E., Shooter, E.M., 2004.** BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *Journal of neuroscience research* 77, 662–9.
- Tomobe, K., Okuma, Y., Nomura, Y., 2007.** Impairment of CREB phosphorylation in the hippocampal CA1 region of the senescence-accelerated mouse (SAM) P8. *Brain research* 1141, 214–7.
- Tongiorgi, E., Righi, M., Cattaneo, A., 1997.** Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 9492–505.
- Torsello, A., Grilli, R., Luoni, M., Guidi, M., Ghigo, M.C., Wehrenberg, W.B., Deghenghi, R., Müller, E.E., Locatelli, V., 1996.** Mechanism of action of Hexarelin. I. Growth hormone-releasing activity in the rat. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 135, 481–8.
- Tripathy, D., Yin, X., Sanchez, A., Luo, J., Martinez, J., Grammas, P., 2010.** Cerebrovascular expression of proteins related to inflammation, oxidative stress and neurotoxicity is altered with aging. *Journal of neuroinflammation* 7, 63.
- Tseng, Y.H., Kessler, M.A., Schuler, L.A., 1997.** Regulation of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , and IL-6 expression by growth hormone and prolactin in bovine thymic stromal cells. *Molecular and cellular endocrinology* 128, 117–27.
- Turnley, A.M., Faux, C.H., Rietze, R.L., Coonan, J.R., Bartlett, P.F., 2002.** Suppressor of cytokine signaling 2 regulates neuronal differentiation by inhibiting growth hormone signaling. *Nature neuroscience* 5, 1155–62.
- Tyler, J.A., 1989.** Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *The Biochemical journal* 260, 543–8.
- Tyler, W.J., Alonso, M., Bramham, C.R., Pozzo-Miller, L.D., 2002.** From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 9, 224–37.
- Udy, G.B., Towers, R.P., Snell, R.G., Wilkins, R.J., Park, S.H., Ram, P.A., Waxman, D.J., Davey, H.W., 1997.** Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7239–44.
- Uehara, A., Gillis, S., Arimura, A., 1987.** Effects of interleukin-1 on hormone release from normal rat pituitary cells in primary culture. *Neuroendocrinology* 45, 343–7.
- Uronen-Hansson, H., Allen, M.L., Lichtarowicz-Krynska, E., Aynsley-Green, A., Cole, T.J., Höidén-Guthenberg, I., Fryklund, L., Klein, N., 2003.** Growth hormone enhances proinflammatory cytokine production by monocytes in whole blood. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 13, 282–6.

- Vacher, M., Nicot, C., Pflumm, M., Luchins, J., Beychok, S., Waks, M., 1984.** A heme binding site on myelin basic protein: characterization, location, and significance. *Archives of biochemistry and biophysics* 231, 86–94.
- Van Golen, C.M., Feldman, E.L., 2000.** Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *Journal of cellular physiology* 182, 24–32.
- Vanderkuur, J.A., Butch, E.R., Waters, S.B., Pessin, J.E., Guan, K.L., Carter-Su, C., 1997.** Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 138, 4301–7.
- Van't Veer, A., Du, Y., Fischer, T.Z., Boetig, D.R., Wood, M.R., Dreyfus, C.F., 2009.** Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. *Journal of neuroscience research* 87, 69–78.
- Velasco, B., Cacicedo, L., Escalada, J., Lopez-Fernandez, J., Sanchez-Franco, F., 1998.** Growth hormone gene expression and secretion in aging rats is age dependent and not age-associated weight increase related. *Endocrinology* 139, 1314–20.
- Velasco, B., Cacicedo, L., Melian, E., Fernández-Vázquez, G., Sánchez-Franco, F., 2001.** Sensitivity to exogenous GH and reversibility of the reduced IGF-I gene expression in aging rats. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 145, 73–85.
- Vemuri, G.S., McMorris, F.A., 1996.** Oligodendrocytes and their precursors require phosphatidylinositol 3-kinase signaling for survival. *Development (Cambridge, England)* 122, 2529–37.
- Venters, H.D., Tang, Q., Liu, Q., VanHoy, R.W., Dantzer, R., Kelley, K.W., 1999.** A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 9879–84.
- Vermeulen, A., 1987.** Nyctohemeral growth hormone profiles in young and aged men: correlation with somatomedin-C levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 64, 884–8.
- Villuendas, G., Sánchez-Franco, F., Palacios, N., Fernández, M., Cacicedo, L., 2001.** Involvement of VIP on BDNF-induced somatostatin gene expression in cultured fetal rat cerebral cortical cells. *Brain research. Molecular brain research* 94, 59–66.
- Virgintino, D., Benagiano, V., Maiorano, E., Rizzi, A., Errede, M., Bertossi, M., Roncali, L., Ambrosi, G., 1996.** Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in astrocytes of the human brain. *Neuroreport* 7, 1577–81.
- Visser, M., Pahor, M., Taaffe, D.R., Goodpaster, B.H., Simonsick, E.M., Newman, A.B., Nevitt, M., Harris, T.B., 2002.** Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 57, M326–32.
- Vitkovic, L., Bockaert, J., Jacque, C., 2000.** “Inflammatory” cytokines: neuromodulators in normal brain? *Journal of neurochemistry* 74, 457–71.

- Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F., 1994.** A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry* 269, 5241–8.
- Vondran, M.W., Clinton-Luke, P., Honeywell, J.Z., Dreyfus, C.F., 2010.** BDNF[±] mice exhibit deficits in oligodendrocyte lineage cells of the basal forebrain. *Glia* 58, 848–56.
- Walker, R.F., Yang, S.W., Bercu, B.B., 1991.** Robust growth hormone (GH) secretion in aged female rats co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and GH-releasing hormone (GHRH). *Life sciences* 49, 1499–504.
- Wang, D.-S., Bennett, D.A., Mufson, E.J., Mattila, P., Cochran, E., Dickson, D.W., 2004.** Contribution of changes in ubiquitin and myelin basic protein to age-related cognitive decline. *Neuroscience research* 48, 93–100.
- Wang, Y.D., Wood, W.I., 1995.** Amino acids of the human growth hormone receptor that are required for proliferation and Jak-STAT signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 9, 303–11.
- Waxman, S.G., 1977.** Conduction in myelinated, unmyelinated, and demyelinated fibers. *Archives of neurology* 34, 585–9.
- Waxman, S.G., Utzschneider, D.A., Kocsis, J.D., 1994.** Enhancement of action potential conduction following demyelination: experimental approaches to restoration of function in multiple sclerosis and spinal cord injury. *Progress in brain research* 100, 233–43.
- Webster, M.J., Weickert, C.S., Herman, M.M., Kleinman, J.E., 2002.** BDNF mRNA expression during postnatal development, maturation and aging of the human prefrontal cortex. *Brain research. Developmental brain research* 139, 139–50.
- Wei, J., Xu, H., Davies, J.L., Hemmings, G.P., 1992.** Increase of plasma IL-6 concentration with age in healthy subjects. *Life sciences* 51, 1953–6.
- Weigent, D.A., Baxter, J.B., Wear, W.E., Smith, L.R., Bost, K.L., Blalock, J.E., 1988.** Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2, 2812–8.
- Werther, G.A., Abate, M., Hogg, A., Cheesman, H., Oldfield, B., Hards, D., Hudson, P., Power, B., Freed, K., Herington, A.C., 1990.** Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization--relationship to IGF-I receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 4, 773–8.
- West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E., 2001.** Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11024–31.
- West, R.L., Crook, T.H., Barron, K.L., 1992.** Everyday memory performance across the life span: effects of age and noncognitive individual differences. *Psychology and aging* 7, 72–82.
- White, H.K., Petrie, C.D., Landschulz, W., MacLean, D., Taylor, A., Lyles, K., Wei, J.Y., Hoffman, A.R., Salvatori, R., Ettinger, M.P., Morey, M.C., Blackman, M.R., Merriam, G.R., 2009.** Effects of an oral growth hormone secretagogue in older adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94, 1198–206.

- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., Sundler, F., 2002.** The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regulatory peptides* 107, 63–9.
- Wiggins, R.C., Gorman, A., Rolsten, C., Samorajski, T., Ballinger, W.E., Freund, G., 1988.** Effects of aging and alcohol on the biochemical composition of histologically normal human brain. *Metabolic brain disease* 3, 67–80.
- Williams, C.M., El Mohsen, M.A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L.T., Ellis, J.A., Whiteman, M., Spencer, J.P.E., 2008.** Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free radical biology & medicine* 45, 295–305.
- Wilson, C.J., Finch, C.E., Cohen, H.J., 2002.** Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *Journal of the American Geriatrics Society* 50, 2041–56.
- Wolf, M., Böhm, S., Brand, M., Kreymann, G., 1996.** Proinflammatory cytokines interleukin 1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 135, 729–37.
- Woller, M.J., Everson-Binotto, G., Nichols, E., Acheson, A., Keen, K.L., Bowers, C.Y., Terasawa, E., 2002.** Aging-related changes in release of growth hormone and luteinizing hormone in female rhesus monkeys. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 5160–7.
- Wollert, K.C., Drexler, H., 2003.** Growth hormone and proinflammatory cytokine activation in heart failure. Just a new verse to an old sirens' song? *European heart journal* 24, 2164–5.
- Wong, I., Liao, H., Bai, X., Zaknic, A., Zhong, J., Guan, Y., Li, H.-Y., Wang, Y.-J., Zhou, X.-F., 2010.** ProBDNF inhibits infiltration of ED1+ macrophages after spinal cord injury. *Brain, behavior, and immunity* 24, 585–97.
- Wood, T.L., Berelowitz, M., Gelato, M.C., Roberts, C.T., LeRoith, D., Millard, W.J., McKelvy, J.F., 1991.** Hormonal regulation of rat hypothalamic neuropeptide mRNAs: effect of hypophysectomy and hormone replacement on growth-hormone-releasing factor, somatostatin and the insulin-like growth factors. *Neuroendocrinology* 53, 298–305.
- Woodruff, R.H., Franklin, R.J., 1999.** The expression of myelin protein mRNAs during remyelination of lysolecithin-induced demyelination. *Neuropathology and applied neurobiology* 25, 226–35.
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2000.** The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141, 4325–8.
- Wu, D., Chen, C., Zhang, J., Bowers, C.Y., Clarke, I.J., 1996.** The effects of GH-releasing peptide-6 (GHRP-6) and GHRP-2 on intracellular adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) levels and GH secretion in ovine and rat somatotrophs. *The Journal of endocrinology* 148, 197–205.
- Wu, R., Zhou, M., Das, P., Dong, W., Ji, Y., Yang, D., Miksa, M., Zhang, F., Ravikumar, T.S., Wang, P., 2007.** Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293, E1697–702.

- Wyss, J.M., Chambless, B.D., Kadish, I., van Groen, T., 2000.** Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences. *Neurobiology of aging* 21, 671–81.
- Xi, M.C., Liu, R.H., Engelhardt, J.K., Morales, F.R., Chase, M.H., 1999.** Changes in the axonal conduction velocity of pyramidal tract neurons in the aged cat. *Neuroscience* 92, 219–25.
- Xiao, J., Wong, A.W., Willingham, M.M., Kaasinen, S.K., Hendry, I.A., Howitt, J., Putz, U., Barrett, G.L., Kilpatrick, T.J., Murray, S.S., 2009.** BDNF exerts contrasting effects on peripheral myelination of NGF-dependent and BDNF-dependent DRG neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 4016–22.
- Xiao, J., Wong, A.W., Willingham, M.M., van den Buuse, M., Kilpatrick, T.J., Murray, S.S., 2010.** Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neuro-Signals* 18, 186–202.
- Xie, Z., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Finch, C.E., 2003.** Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity. *Experimental neurology* 182, 135–41.
- Xin, Z., Sriram, S., 1998.** Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-12 and nitric oxide production in murine macrophages. *Journal of neuroimmunology* 89, 206–12.
- Xing, J., Ginty, D.D., Greenberg, M.E., 1996.** Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science (New York, N.Y.)* 273, 959–63.
- Xing, J., Kornhauser, J.M., Xia, Z., Thiele, E.A., Greenberg, M.E., 1998.** Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Molecular and cellular biology* 18, 1946–55.
- Xu, J., Rong, S., Xie, B., Sun, Z., Deng, Q., Wu, H., Bao, W., Wang, D., Yao, P., Huang, F., Liu, L., 2010.** Memory impairment in cognitively impaired aged rats associated with decreased hippocampal CREB phosphorylation: reversal by procyanidins extracted from the lotus seedpod. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 65, 933–40.
- Xu, J., Wang, S., Lin, Y., Cao, L., Wang, R., Chi, Z., 2009.** Ghrelin protects against cell death of hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures in rats. *Neuroscience letters* 453, 58–61.
- Xu, X., Bennett, S.A., Ingram, R.L., Sonntag, W.E., 1995.** Decreases in growth hormone receptor signal transduction contribute to the decline in insulin-like growth factor I gene expression with age. *Endocrinology* 136, 4551–7.
- Xu, X., Sonntag, W.E., 1996.** Growth hormone and aging: Regulation, signal transduction and replacement therapy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 7, 145–50.
- Yakovlev P.I., Lecours A.R., 1966.** The myelinogenic cycles of regional maturation of the brain., in: Minokouski A. (Ed.), *Regional Development of the Brain Early Life*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 3–70.
- Yamada, K., Mizuno, M., Nabeshima, T., 2002.** Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life sciences* 70, 735–44.

- Yamada, K., Nabeshima, T., 2003.** Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *Journal of pharmacological sciences* 91, 267–70.
- Yamada, M., Hatanaka, H., 1994.** Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death. *Brain research* 643, 173–80.
- Yamada, T., Akiyama, H., McGeer, P.L., 1990.** Complement-activated oligodendroglia: a new pathogenic entity identified by immunostaining with antibodies to human complement proteins C3d and C4d. *Neuroscience letters* 112, 161–6.
- Yamashita, S., Melmed, S., 1986.** Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118, 176–82.
- Yamauchi, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Tsuji, Y., Stark, G.R., Kerr, I.M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Tobe, K., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1998.** Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *The Journal of biological chemistry* 273, 15719–26.
- Yan, M., Jones, M.E.E., Hernandez, M., Liu, D., Simpson, E.R., Chen, C., 2004.** Functional modification of pituitary somatotropes in the aromatase knockout mouse and the effect of estrogen replacement. *Endocrinology* 145, 604–12.
- Yan, Q., Radeke, M.J., Matheson, C.R., Talvenheimo, J., Welcher, A.A., Feinstein, S.C., 1997.** Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *The Journal of comparative neurology* 378, 135–57.
- Yang, J., Siao, C.-J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z.-Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F.S., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009.** Neuronal release of proBDNF. *Nature neuroscience* 12, 113–5.
- Yao, D.L., Liu, X., Hudson, L.D., Webster, H.D., 1995.** Insulin-like growth factor I treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6190–4.
- Yarwood, S.J., Kilgour, E., Anderson, N.G., 1998.** Cyclic AMP potentiates growth hormone-dependent differentiation of 3T3-F442A preadipocytes: possible involvement of the transcription factor CREB. *Molecular and cellular endocrinology* 138, 41–50.
- Ye, P., Carson, J., D'Ercole, A.J., 1995.** In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on brain myelination: studies of IGF-I and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) transgenic mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15, 7344–56.
- Ye, P., D'Ercole, A.J., 1999.** Insulin-like growth factor I protects oligodendrocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced injury. *Endocrinology* 140, 3063–72.
- Ye, P., Kollias, G., D'Ercole, A.J., 2007.** Insulin-like growth factor-I ameliorates demyelination induced by tumor necrosis factor-alpha in transgenic mice. *Journal of neuroscience research* 85, 712–22.
- Ye, P., Price, W., Kassiotis, G., Kollias, G., D'Ercole, A.J., 2003.** Tumor necrosis factor-alpha regulation of insulin-like growth factor-I, type 1 IGF receptor, and IGF binding protein expression in cerebellum of transgenic mice. *Journal of neuroscience research* 71, 721–31.

- Ye, S.M., Johnson, R.W., 1999.** Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *Journal of neuroimmunology* 93, 139–48.
- Ye, S.M., Johnson, R.W., 2001.** An age-related decline in interleukin-10 may contribute to the increased expression of interleukin-6 in brain of aged mice. *Neuroimmunomodulation* 9, 183–92.
- Yin, J.C., Del Vecchio, M., Zhou, H., Tully, T., 1995.** CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81, 107–15.
- Yin, X., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Tu, P. h, Lee, V.M., Li, C., Roder, J., Trapp, B.D., 1998.** Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18, 1953–62.
- Yirmiya, R., Winocur, G., Goshen, I., 2002.** Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiology of learning and memory* 78, 379–89.
- Yong, V.W., 2004.** Prospects for neuroprotection in multiple sclerosis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, 864–72.
- Yoshizato, H., Fujikawa, T., Soya, H., Tanaka, M., Nakashima, K., 1998.** The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* 139, 2545–51.
- Zadik, Z., Chalew, S.A., McCarter, R.J., Meistas, M., Kowarski, A.A., 1985.** The influence of age on the 24-hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 60, 513–6.
- Zamenhof, S., Mosley, J., Schuller, E., 1966.** Stimulation of the proliferation of cortical neurons by prenatal treatment with growth hormone. *Science (New York, N.Y.)* 152, 1396–7.
- Zeller, N.K., Behar, T.N., Dubois-Dalcq, M.E., Lazzarini, R.A., 1985.** The timely expression of myelin basic protein gene in cultured rat brain oligodendrocytes is independent of continuous neuronal influences. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5, 2955–62.
- Zhai, Q., Lai, Z., Roos, P., Nyberg, F., 1994.** Characterization of growth hormone binding sites in rat brain. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. Supplement 406, 92–5.
- Zhang, J., Geula, C., Lu, C., Koziel, H., Hatcher, L.M., Roisen, F.J., 2003.** Neurotrophins regulate proliferation and survival of two microglial cell lines in vitro. *Experimental neurology* 183, 469–81.
- Zhang, J.Y., Luo, X.G., Xian, C.J., Liu, Z.H., Zhou, X.F., 2000.** Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *The European journal of neuroscience* 12, 4171–80.
- Zhang, Q.-L., Liu, J., Lin, P.-X., Webster, H. deF, 2002.** Local administration of vasoactive intestinal peptide after nerve transection accelerates early myelination and growth of regenerating axons. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 7, 118–27.
- Zhang, W., Lin, T.R., Hu, Y., Fan, Y., Zhao, L., Stuenkel, E.L., Mulholland, M.W., 2004.** Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *The Journal of physiology* 559, 729–37.

- Zhang, X., Miskimins, R., 1993.** Binding at an NFI site is modulated by cyclic AMP-dependent activation of myelin basic protein gene expression. *Journal of neurochemistry* 60, 2010–7.
- Zhen, X., Uryu, K., Cai, G., Johnson, G.P., Friedman, E., 1999.** Age-associated impairment in brain MAPK signal pathways and the effect of caloric restriction in Fischer 344 rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 54, B539–48.
- Zhou, R., Assouline, J.G., Abbas, P.J., Messing, A., Gantz, B.J., 1995.** Anatomical and physiological measures of auditory system in mice with peripheral myelin deficiency. *Hearing research* 88, 87–97.
- Zhou, X.F., 1999.** Peripheral projections of primary sensory neurons immunoreactive for brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters* 261, 151–4.
- Zhou, Y., He, L., Baumann, G., Kopchick, J.J., 1997.** Deletion of the mouse GH-binding protein (mGHBP) mRNA polyadenylation and splicing sites does not abolish production of mGHBP. *Journal of molecular endocrinology* 19, 1–13.
- Ziegenhorn, A.A., Schulte-Herbrüggen, O., Danker-Hopfe, H., Malbranc, M., Hartung, H.-D., Anders, D., Lang, U.E., Steinhagen-Thiessen, E., Schaub, R.T., Hellweg, R., 2007.** Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiology of aging* 28, 1436–45.
- Zietz, B., Hrach, S., Schölmerich, J., Straub, R.H., 2001.** Differential age-related changes of hypothalamus - pituitary - adrenal axis hormones in healthy women and men - role of interleukin 6. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology and German Diabetes Association* 109, 93–101.
- Zornetzer, S.F., Thompson, R., Rogers, J., 1982.** Rapid forgetting in aged rats. *Behavioral and neural biology* 36, 49–60.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., Littman, D.R., 1998.** Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595–9.
- van Dam, P.S., Aleman, A., de Vries, W.R., Deijen, J.B., van der Veen, E.A., de Haan, E.H., Koppeschaar, H.P., 2000.** Growth hormone, insulin-like growth factor I and cognitive function in adults. *Growth hormone & IGF research: official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* 10 Suppl B, S69–73.